A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI

BALOGH JÁNOS

XXIII. KÖTET 1—2. SZÁM

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

1980

BIOL. OSZT. KÖZL.

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK
KÖZLEMÉNYEI

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI
ALFÖLDI LAJOS, TIGYI JÓZSEF, FARKAS GÁBOR SZENTÁGOTHAI JÁNOS

SZERKESZTŐ
BALOGH JÁNOS

TECHNIKAI SZERKESZTŐ
DÉZSI LÁSZLÓ

SZERKESZTŐSÉG: MTA BIOLÓGIAI OSZTÁLYA BUDAPEST 1051 MÜNNICH FERENC U. 7.

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST 1363 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:

1051 Budapest Münnich F. u. 7. Dézsi László technikai szerkesztő.

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 84,— forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (Budapest 1363 Alkotmány u. 21. Pénzforgalmi jelzőszám: 215-11488), külföldre a „KULTÚRA" Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest 1389 Fő utca 32. Pénzforgalmi jelzőszám: 218-10909) 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, az összefoglalók pedig további egy, ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven az alábbi címekre kell beküldeni:

Acta Biochimica et Biophysica szerkesztősége, 1113 Budapest Karolina út 29. (Dr. Sajgó Mihály) és 7624 Pécs Szigeti út 12. (Dr. Niedetzky Antal).

Acta Biologica szerkesztősége, 8237 Tihany MTA Biológiai Kutatóintézete (Dr. Salánki János).

Acta Botanica szerkesztősége, 2163 Vácrátót, MTA Botanikai Kutató Intézet (Dr. Borhidi Attila).

Acta Chirurgica szerkesztősége, 1082 Budapest Üllői út 78/b. Urológiai Klinika (Dr. Rényi-Vámos Ferenc).

Acta Medica szerkesztősége, 1083 Budapest Szigony u. 43. KOKI (Dr. Stark Ervin).

Acta Microbiologica szerkesztősége, 1097 Budapest Gyáli út 4. OKI (Dr. Lányi Béla).

Acta Morphologica szerkesztősége, 1094 Budapest Tűzoltó u. 58. Szövet- és Fejlődéstani Intézet (Dr. Somogyi Endre).

Acta Paediatrica szerkesztősége, 1083 Budapest Bókay János u. 53. I. sz. Gyermekklinika (Dr. Véghelyi Péter)

Acta Physiologica szerkesztősége, 7622 Pécs, Rákóczi út 80. (Dr. Hartmann Géza).

Acta Zoologica szerkesztősége, 1088 Budapest Baross u. 13. Természettudományi Múzeum (Dr. Soós Árpád).

AZ MTA BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK KÖZLEMÉNYEI

XXIII. 1—4. SZÁMÁNAK TARTALOMJEGYZÉKE

Megemlékezés 1

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

Kövér András és *Geszthelyi István:* Primycin hatása a vázizom elektromos sajátságaira és az elektromechanikai csatolásra 5

Szabolcs Márton: Kalcium-transzport vizsgálatok fragmentált szarkoplazmatikus retikulumon 15

Kériné Fülöp Ildikó, Jóna István és *Kónya László:* A vázizom Ca-kompartmentalizációjának matematikai analízise számítógépes programmal 29

Kónya László: A koffein kontraktúrák paramétereit befolyásoló tényezők vizsgálata béka vázizmon 37

Laczkó Jenő és *Varga Sándor:* A vörösvértest alak vizsgálatának néhány aspektusa konzervált és konzervált-rejuvenált vérmintákon 43

Tóth Ida: Biológiai minták előkészítése és qualitatív röntgensugár mikroanalízise 53

Ligeti Erzsébet: Mitchell kemiozmotikus elmélete és mitokondriális ion-transzport folyamatok tükrében 67

Szász Ilma, Sarkadi Balázs, Hasitz Mária, Enyedi Ágnes és *Gárdos György:* A Ca-pumpa sajátságainak vizsgálata ép emberi vörösvérsejteken izolált membrán fragmentumokon és kifordított membrán vezikulákon 93

Hasitz Mária: Az emberi trombocita membrán glükoproteinjeiről 109

Török Tamás és *Vizi E. Szilveszter:* Nátrium-pumpa (Na + K-aktivált membrán ATPáz) jelentősége a neurokémiai transzmisszió posztszinaptikus szabályozásában 123

Ábrahám Ambrus: Fény és elektronmikroszkópos vizsgálatok emberi carotis testeken 143

Baranyi Ilona: Citológiai változások a p-bróm-metamfetamin (V—111) hatására a tavikagyló (*Anodonta-cygnea* L.) központi idegrendszerében 179

Menyhárt János és *Marcsek Zoltán:* A tüdőszövet sejtjeinek in vivo DNS szintézisét specifikusan gátló fehérje természetű faktor részleges tisztítása marhatüdőből .. 189

Ifj. Gáspár Rezső, Damjanovich Sándor és *Somogyi Béla:* Sejtpopulációk automatizált analízise és szeparálása 205

Gergely Pál és *Bot György:* Fehérjék foszforilációs és defoszforilációs átalakulásának szabályozása 223

Czakó József: Adatok a gazdasági állatok viselkedésének vizsgálati módszereihez 239

Tigyi József: A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztálya 1980. évi közgyűlési beszámolója 257

Hozzászólások 265

A MATEMATIKAI ÉS FIZIKAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK, AZ ORVOSI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK, VALAMINT A BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

EGYÜTTES TUDOMÁNYOS ÜLÉSE

1980. május 7—8.

ÚJ VONÁSOK A BIOFIZIKÁBAN

Az előadások programja 273

Tarján Imre: Megnyitó 274

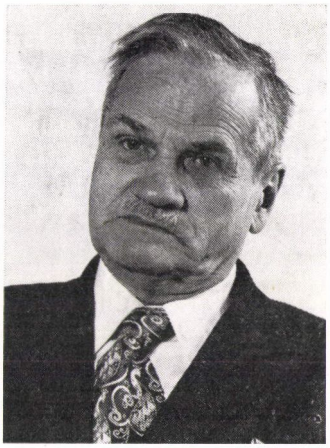
Straub F. Brunó: Biológiai makromolekulák szerkezete és funkciója 275

Závodszky Péter: Az immunglobulin — különböző tevékenységek összehangolása egy makromolekulában 289

Cser László: Az immunglobulinok konformációjának vizsgálata 309
Damjanovich Sándor, Somogyi Béla és *Trón Lajos:* A fehérje matrix dinamikája és az enzimfunkció közötti kapcsolat 319
Venetianer Pál: Génműködés és nukleinsavszerkezet 327
Rontó Györgyi: Pontszerű sérülések fágokban 337
Keszthelyi Lajos: Membránhoz kötött fehérjék működése 347
Györgyi Sándor: Szerkezeti átalakulások lipidmembránokban 379
Salánki János: Az idegsejt elektromos aktivitása 389
Fehér Ottó: Tanulás az idegsejt szintjén 403
Lábos Elemér: Neuronális rendszerek analízise és szintézise 421
Zimányi József: Neuronhálózatok önszerveződésének egy matematikai modellje 429
Vámos Tibor: A mesterséges és természetes intelligencia 441
Tigyi József: Távlati lehetőségek 445
Berényi Dénes: Elektronspektroszkópia: Új lehetőségek a biológiai-orvosi problémák kutatására 453
Kapuy Ede: Kvantumkémiai módszerek 463
Szlávik Ferenc: Számítógépes kardiológiai módszerek 471

Hírek 479

MEGEMLÉKEZÉS



1903—1980.

Soó Rezső a magyar és nemzetközi botanikai tudománynak kimagasló vezéralakja, Székelyudvarhelyen 1903. augusztus 1-én született székely családból. Már gyerek korától utolérhetetlen becsvággyal és energiával száguld meredeken ívelő pályáján. 14 éves korában kezdi meg gyűjteséit (növények, bélyegek) és 17 éves korában megjelenik első publikációja. Magasra törő ambíciói szakadatlanul és fáradhatatlanul újabb és újabb alkotásokra sarkallják. Kolozsváron kezdett iskoláit a budapesti egyetemen folytatja, mint az Eötvös Kollégium tagja 1925-ben kitűnő eredményű tanári szakvizsgát, valamint summa cum laude doktorátust tesz (növénytan, ásványkőzettan, kémia). 1926-ban sub auspiciis doktorrá avatják; értekezése a „saisonpolymorphismus" fajkeletkezési problémáját oldja meg.

Első könyve az erdélyi magyar iskolák számára írt növénytan volt (1926). 1925—27-ig a berlini Collegium Hungaricum tagja; Dahlenben a Botanikai Intézetben és Botanikus Kertben dolgozik; előadásokat tart a Botan. Verein d. Provinz Brandenburg-ban. Ekkor kezdi meg külföldi tudományos intézeteket látogató útjait és botanikai exkurzióit.

1927—29. a tihanyi Biológiai Kutatóintézet adjunktusa. 1929 végén 27 éves korában elnyeri a Debreceni Egyetem Növénytani Tanszékét. Megszervezi az egyetemi Növénytani Intézetet és Botanikus Kertet. Itt válik számára lehetővé, hogy új irányzatként kialakítsa cönológiai- és ökológiai „iskoláját", mely csakhamar az országhatáron túl is mint Soó-féle cönológiai iskola vált ismertté. 1935-ben hivatalos kiküldött az amszterdami botanikai kongresszuson, 1936—37-ben bölcsészkari dékán, 1939-ben félévig vendég professzor Königsbergben.

Debrecenben az Alföld természetvédelmének harcosa, az Ő nevéhez fűződik Bátorliget rezervációjának létesítése. Mint a debreceni Tudományos Társaság természettudományi osztályának titkára annak folyóiratát a „Tisia"-t szerkeszti, ezenkívül saját intézeti folyóiratot ad ki az Acta Geobotanica Hungaricá-t (1936—1949).

1940 őszén a kolozsvári egyetemre a növényrendszertan tanárává nevezik ki s egyben a Botanikus Kert és az Erdélyi Múzeum Növénytárának igazgatója. 1945 őszén átélve Budapest ostromát visszatér Debrecenbe és újra átveszi régi intézetét. Kolozsvárott megindított új kiadványsorozatai (a Scripta Botanica Museum Transsilvanici 3 kötet, Fontes Florae Hungaricae 2 kötet) megszakadnak, de az intézeti Acta és a Magyar Flóraművek továbbra is megjelennek. Növényföldrajza mint egyetemi tankönyv a felszabadulás után megjelent első természettudományi munkák egyike volt.

1947-ben a Magyar Tudományos Akadémia levelező tagjává választja. Az Akadémia megbízásából Jávorka Sándorral Magyarország növényvilága kézikönyvét állítják össze (1951), ennek alcíme „Magyarország vadontermő és termesztett növényeinek meghatározója, ökológiai és gazdasági útmutatója", melyet Jávorka Sándor flóraművei alapján a magyar botanikusok közreműködésével írt. E kollektív munka olyan kézikönyv hiányát pótolta, mely nemcsak a szakembereknek, hanem mindazok számára megadja a növényekről a sokoldalú ismereteket, akik hivatásuk vagy munkájuk során a növényvilággal foglalkoznak és számukra lehetőséget nyújt a Magyarországon termő és termesztett növények és életfeltételeik megismerésére.

1951-ben a Tudományos Akadémia rendes tagjává választja, a Biológiai Osztály elnöke (1952—53). 1951-ben Kossuth-díjat kap „a magyar növénytani kutatásban és szervezésben kifejtett kimagasló érdemeiért". A Vallás- és Közoktatási Minisztérium megbízásából 1952-ben „Fejlődéstörténeti Növényrendszertan" tankönyvet ír, melyért újból Kossuth-díjat kap 1954-ben.

1952—55-ig a Budapesti Egyetemen is előad, majd 1955-től 1969-ig az ELTE Növényrendszertani-Növényföldrajzi Tanszék és Botanikus Kert igazgató professzora.

Nagyszámú tanulmányai, monográfiái közül kiemelkednek Orchideae feldolgozásai. Ő az európai Orchideák egyik legjobb specialistája. Elkészíti a Flora Europaea számára több genus korszerű feldolgozását.

1964-től készült el a 6 kötetes közel 4000 oldal terjedelmű „Magyar flóra és vegetáció, rendszertani, növényföldrajzi kézikönyve", mely világirodalmi viszonylatban is a legrészletesebb mikroszisztematikai-cönológiai flóramű. Benne kritikai szintézisben foglalja össze a magyar flórakutatásnak több évszázados eredményeit és a magyarországi növénytakaró fajokra bontott adatait.

Már erősen betegeskedése alatt készült több mint 10 szakember közreműködésével az 1978-ban megjelenő „Bibliography of Hungarian Synecolo-

gical Scientific Literature 1900—1972" c. munkája. Ez magába foglalja közel 3/4 évszázad növény és állatökológiai és cönológiai irodalmunkat, valamint a magyar bioklimatológiai, talaj- és hidrobiológiai munkák teljességre törekvő felsorolását. Fontos áttekintést és segítséget ad több tudományterület számára.

Könyveinek, tanulmányainak részletezése helyett utalok a Soó Professzor 70 éves születésnapja alkalmából megjelent méltatásra*, (ahol életrajzi adatain kívül részletesen idézettek legfontosabb önálló könyvei, folyóirat és sorozat-publikációi; tanítványai száma, a róla elnevezett növények felsorolása stb.). Összefoglalásként csak néhány számadattal érzékeltetem páratlan gazdagságú alkotásait. Megjelent könyveinek száma 29, tudományos dolgozatainak száma 400-nál több és mintegy 3000 népszerű cikkek, előadások, ismertetések, útleírások, lexikon címszók tartoznak bibliográfiai adataihoz. Cikkei, előadásai 7 nyelven, 16 országban jelentek meg.

Külföldi útjai során bejárja egész Európát, eljutott Marokkóba, Egyiptomba, Anatóliába, Transkaukáziába, Szovjet Közép-Ázsiába.

Sikeres élete során külföldi és hazai elismerés is bőségesen jutott osztályrészéül. A Magyar Tudományos Akadémián kívül a Kelet-Németországi Akadémia Leopoldino-Caroliniana is rendes tagjává választotta (itt is fél évig vendég professzorként működik). Tiszteleti tagja a Magyar Biológiai Társaságnak, a Botanikai Szakosztálynak, az Össz-szövetségi Botanikai Társaságnak, az osztrák, finn, bajor, bolgár, svéd társaságoknak. Alelnök volt több nemzetközi botanikai kongresszuson, 4 külföldi szakfolyóirat szerkesztőbizottsági tagja, és ezenkívül még számos társadalmi egyesületnek is tiszteletbeli tagja, ill. díszelnöke.

Nevét 50 növény viseli.

Kétszer kapott aranyfokozatú Munka Érdemrendet. 70. születésnapján a Debreceni Kossuth L. Tudományegyetem díszdoktorrá avatta. 1979-ben pedig Debrecen város díszpolgára lett.

Amilyen páratlan botanikai munkássága, olyan páratlan és lenyűgöző több irányú gyűjtési szenvedélye. Gyermekkora óta gyűjtött herbáriumát, mely mintegy 50 000 lapból áll a Kolozsvári, ma Babes-Bolyai Egyetemnek ajándékozta.

Szoros szálak fűzték az irodalomhoz és képzőművészetekhez. Ezt bizonyítja a több mint 10 000 kötetből álló könyv gyűjteménye, a mintegy 80 000 lapból álló kisgrafikai gyűjteménye, mely világviszonylatban is a harmadik legnagyobb magánkézben levő gyűjtemény és birtokában volt a kb. 170 000 darabból álló bélyeggyűjteménynek is, mely szintén a legnagyobb és legértékesebb magánkézben levő ilyen jellegű gyűjtemény.

* Prof. Rezső Soó Academician on his Seventhieth Birthday Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae, Tom. **19**, 1—4 pp. III—XI. (1973).

Több írásában hivatkozott arra, hogy élete legfőbb eredményének és büszkeségének nem dolgozatait, gyűjteményeit tekinti, hanem azt, hogy iskolát nevelt és mintegy 60 biológus kutatót nevezhet tanítványának, akik közül számosan magas, sőt legmagasabb tudományos kvalifikációt is elértek.

Tanítványai és munkatársai iránt igényes volt. De a tudást, szorgalmat nemcsak igényelte, de értékelte is és munkatársai előre haladására büszke volt. Az emberi érintkezésben nem volt mindennapi mércével mérhető.

Életének mintegy hitvallásaként tekinti az általa eszményképnek tekintett Ady „Köszönet az Életért" c. versét, melyet így idéz:

„Az élet egyszeri kivételes szent örömül adatik,
örülni kell az életnek és élni szépen,
szép alkotásokkal körülvéve"

Így élve Soó professzor alkotásaival a magyar botanikában korszakalkotó lett, a florisztikai korszakot lezárta, a cönológiai-ökológiai korszakot megnyitotta. Neve és emléke azonban nemcsak a botanikában maradandó, de sokoldalú egyéb tevékenységében, gyűjteményeiben is tovább él.

Saját magáról így vallott „Életem örök küzdelem volt önmagammal, feladataimmal, környezetemmel, a mind jobban fogyó idővel, erővel. Ám bevallom kis diákkorom óta rettenetes hiúság, ambíció gyötört, minél többet tenni, alkotni, gyűjteni.". Hogy sikerült-e Ő maga adja meg a választ: „A sors megengedte az életcélom megvalósítását" ezt Ady versének szavaival így köszöni:

„És akármi is fog már jönni
Mielőtt végleg elmegyek
Meg fogom ezt szépen köszönni"

A vég 1980. február 10-én, életének 77. évében eljött és most búcsúzáskor mi is mindent köszönünk, mindent amit Soó professzor gazdag örökségként ránk hagyott, melyből még generációk egész sora sok tudás forrását lelheti kegyelettel Reá emlékezve.

MÁTHÉ IMRE

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

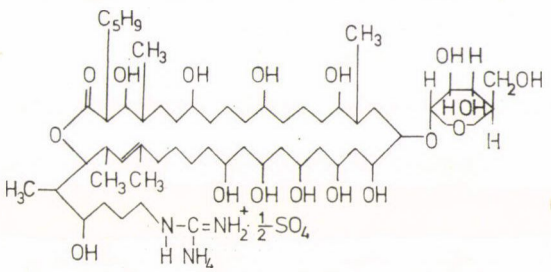
PRIMYCIN HATÁSA A VÁZIZOM ELEKTROMOS SAJÁTSÁGAIRA ÉS AZ ELEKTROMECHANIKAI CSATOLÁSRA*

KÖVÉR ANDRÁS és GESZTELYI ISTVÁN

Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma és Bessenyei György Tanárképző Főiskola, Nyíregyháza

Ismeretes, hogy a VÁLYI-NAGY és mtsai által egy streptomyces törzsből izolált quanidin típusú antibiotikum (VÁLYI-NAGY és mtsai 1954), a primycin toxicitása miatt (VÁLYI-NAGY és KELENTEY 1960) csak lokálisan alkalmazva használható terápiás célra. Nyúlon 2—3 mg/kg primycin intravénásan beadva általános tremort okoz, mely a spontán légzés leállásával egyidejűleg szűnik meg. A primycinnel kiváltható vazokonstrikció, hemolízis, bélmotilitás növekedés, s az előbb említett megfigyelések arra utalnak, hogy a primycin toxikus hatásait különféle membránstruktúrákon fejtheti ki. A primycin kémiai szerkezete alapján (ABERHART és mtsai 1970, 1974, BLUM 1965) trimodális molekulának fogható fel, vagyis a molekula két végén levő egy-egy poláris rész (guanidin és l-arabinóz), valamint a poláris csoportok közötti ciklikus lipofil rész sajátságai meghatározhatják a molekula membrán-aktív tulajdonságait, ill. orientálódását a membránban (1. ábra). Feltételezésünk szerint a szénhidrát komponens a membrán külső vizes környezete, a guanidin rész a membrán belső víztere felé, a lipofil rész pedig a

A PRIMYCIN SZERKEZETI KÉPLETE

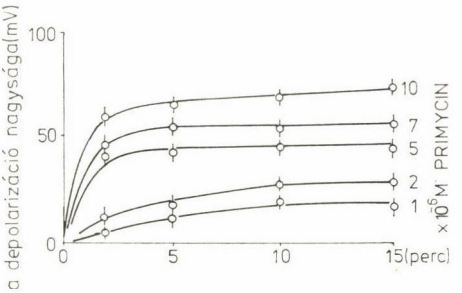


1. ábra. Primycin kémiai szerkezete

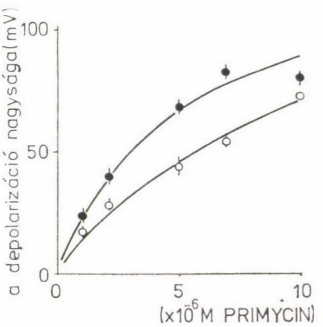
* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

membrán lipidjébe orientálódik. Az utóbbi következménye lehet a mesterséges lipidmembránokon megfigyelt perturbáló, detergensszerű hatása a molekulának (BLASKÓ és mtsai 1979). Jelen munkánkban korábbi megfigyelések alapján (DARÓCZI és GESZTELYI 1970) a primycin béka vázizomra kifejtett hatását tanulmányoztuk. Kísérleteinkhez béka *(Rana esculenta)* sartorius és semitendinosus izmait használtuk.

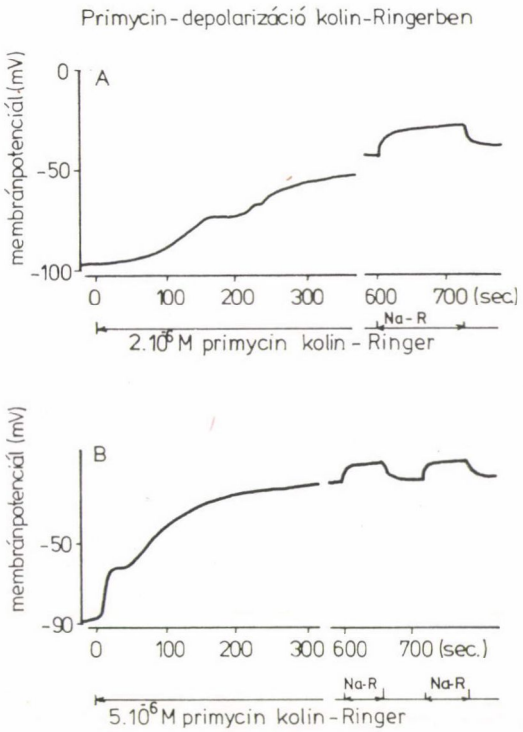
A korábbi adatoktól eltérően (DARÓCZI és GESZTELYI 1970), intracelluláris elvezetés alkalmazásával kimutattuk, hogy a primycin az előzetesen Na^+-mentes Ringer oldatban inkubált vázizom felszíni membránjának nyugalmi potenciálját is csökkenti, azaz depolarizációt okoz (2. ábra). A depolarizáció koncentráció és időfüggést mutat, s egy viszonylag gyors és egy lassú szakaszra különíthető el. A gyors szakasz meredeksége nagyobb primycin koncentrációknál kifejezettebb. A lassú szakasz idő és koncentráció függő telítést mutat. Az irodalomból ismeretes, hogy a depolarizáció növeli



2. ábra. Primycin hatása a béka sartorius izom membránpotenciáljára kolin-klorid Ringerben. Ordináta a depolarizáció mértékét mV-ban, az abszcissza az inkubációs időt percekben mutatja. A görbék jobb oldalán a primycin koncentrációk vannak feltüntetve. Nyugalmi potenciál 91,5 ± 1,8 mV. A görbéken az 50—50 mérés átlaga mV ± SD-ben van feltüntetve



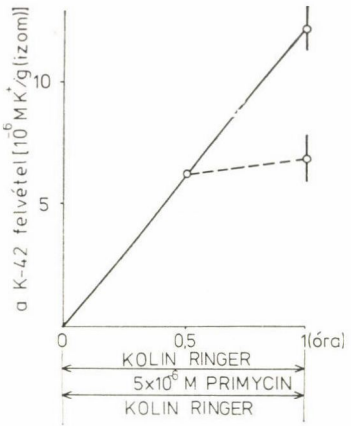
3. ábra. Na-ionok hatása a primycinnel kolin-klorid Ringerben béka sartorius izmon kiváltott depolarizációra. Nyugalmi potenciál 92,4 ± 2,3 mV. Ordináta a depolarizáció mértékét mV-ban, az abszcissza az alkalmazott primycin koncentrációkat mutatja. A görbék a különböző primycin koncentrációknál kolin-klorid Ringerben (○——○, az inkubálás 14—15. percében), ill. ezt követően 3 perces NaCl Ringerben végzett inkubálás után (●——●) mért membránpotenciál értékeket mutatja. Egyéb részleteket l. a 2. ábra szövegében



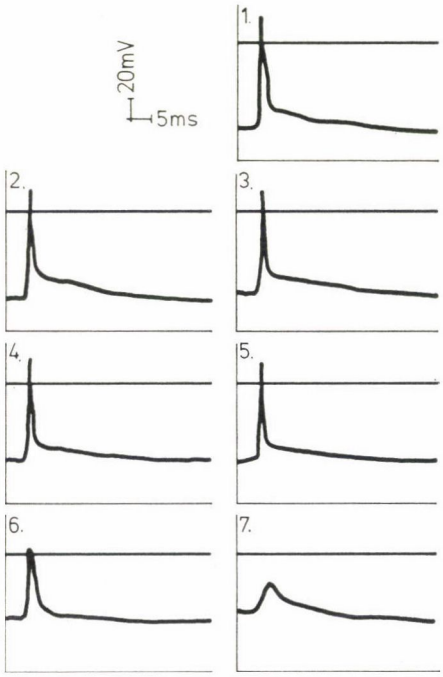
4. ábra. Na-ionok hatása a primycinnel kolin-klorid Ringerben kiváltott depolarizációra (folyamatos intracelluláris regisztrálási technikával). Az abszcissza alatt az inkubálás feltételeit adtuk meg. A nyilak az oldatcserék időpontját jelzik. Az A görbe a 2×10^{-6}, B görbe a 4×10^{-6} M primycin hatását mutatja be

a vezető membránok Na^+-permeabilitását. Kísérleteinkben a kolin-klorid Ringerben kiváltott primycin depolarizáció mértéke fokozódott, ha a primycint tartalmazó kolin-klorid Ringert 15 perces kezelést követően primycint ugyanabban a koncentrációban tartalmazó NaCl Ringerre cseréltük (3. ábra). A membránpotenciál folyamatos regisztrálása során hasonló megfigyelést tettünk (4. ábra). Ez esetben a depolarizáció során fellépő mechanikus reakciók elkerülésére az inkubáló közeg ozmomolaritását szacharózzal kétszeresére növeltük. A 4. ábrán jól megfigyelhető a depolarizáció gyors és lassú fázisa, valamint az a tény, hogy a Na^+-tartalmú Ringer oldatra való áttéréskor a depolarizáció mértéke nő, majd Na^+-mentes Ringerre történő visszatérésre a membránpotenciál a kolin-klorid Ringerben megfigyelt értékre csökken. A változások jellege arra mutat, hogy jelen kísérleti körülmények között a Na^+-potenciál kifejlődéséért felelős Na-csatornák tartósan nyitva maradnak, vagyis Na^+-inaktiváció nem következik be.

Eredményeink alapján feltételeztük, hogy a primycin elsődlegesen a K^+-csatornák működését érinti, feltehetően azok gátlása útján váltja ki



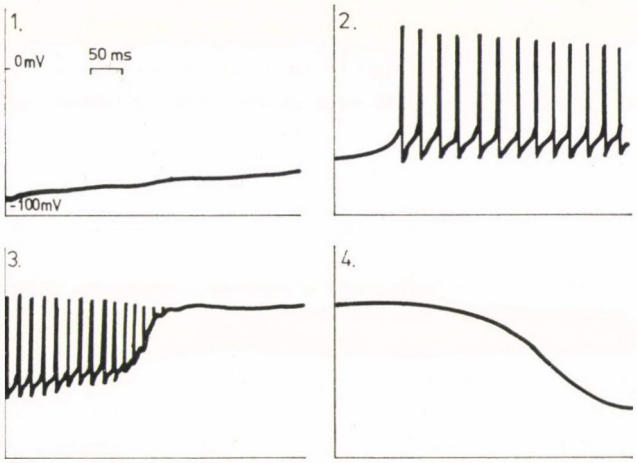
5. ábra. Primycin hatása béka semitendinosus izmából készített izomrostkötegek ^{42}K felvételére. Az ordinátán a ^{42}K felvételt, az abszcisszán az inkubálás idejét, a diagram alatt a kolin Ringerben primycinnel, ill. anélkül végzett inkubálások tartamát tüntettük fel. A kísérletekhez ugyanazon békák semitendinosus izompárjait használtuk kontroll, ill. tesztobjektumként. Az izmokat párhuzamosan ^{42}K-kolin-Ringerben fél óráig primycin nélkül inkubáltuk, majd a kontroll izmokat ugyanolyan összetételű Ringerbe (———), a teszt izmokat hasonló összetételű, de primycint 5×10^{-6} M-ban tartalmazó Ringerbe vittük át (– – – –). Átlagok ± SD feltüntetve



6. ábra. Primycin hatása a négyszögimpulzusokkal kiváltott akciós potenciálokra. Ingerfeszültség 5 V, impulzus-szélesség 0,5 msec. Az akciós potenciálokat a $0{,}35 \times 10^{-6}$ M primycinnel történt inkubálás során (NaCl Ringerben) a 0. (1); 3. (2); 15. (3); 30. (4); 45. (5); 60. (6) és 80. (7) percben regisztráltuk intracelluláris mikroelektród technikával

kolin-klorid Ringerben a nyugalmi potenciál csökkenését. E probléma további vizsgálatára $^{42}K^+$ felvételi kísérleteket végeztünk primycin jelenlétében és távollétében. Az 5. ábrából kitűnik, hogy a primycin már 5×10^{-6} M koncentrációban gyakorlatilag felfüggeszti az izom $^{42}K^+$ felvételét. Megvizsgáltuk továbbá a primycin hatását az izom négyszögimpulzusokkal kiváltott akciós potenciáljaira (6. ábra). Megfigyelhető, hogy az akciós potenciálok nagysága és meredeksége a primycin jelenlétében időben kifejlődő depolarizáció során egyre inkább csökken, majd ezek kiválthatósága adott membránpotenciálértéknél megszűnik. Tekintettel arra, hogy NaCl Ringerben a primycin depolarizáció hatására fellépő fokozott Na^+ belépést Cl^- és víz beáramlás is kíséri, ami megváltoztathatja a membrán szabályozási folyamatait, a primycin hatását nem, vagy alig penetráló anionok jelenlétében, azaz Na-izetionat Ringer oldatban is tanulmányoztuk. Ezen esetben a KCl helyett K-glutamátot, $CaCl_2$ helyett Ca-glukonátot alkalmaztunk a Ringer oldat készítése során. A mechanikai válaszok elkerülésére a közeg ozmomolaritását szacharózzal megkétszereztük.

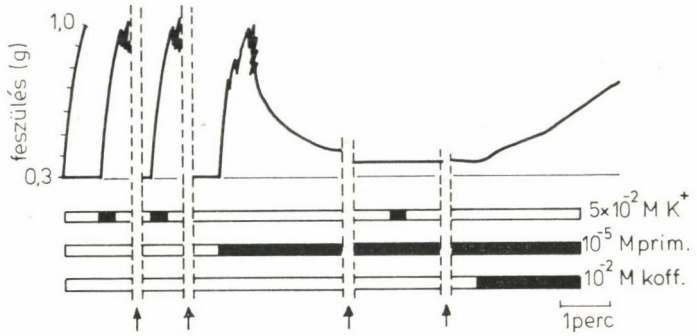
A 7. ábrán megfigyelhető, hogy Na-izetionát Ringerben az alacsony koncentrációban alkalmazott primycin hatására előbb lassú depolarizáció fejlődik ki, majd az elérve a Na^+-csatornák nyitásának küszöbértékét, akciós potenciál jellegű gyors potenciál változásokban folytatódik. Az egyes potenciál változások ún. potenciálvállal indulnak, mely azután hirtelen gyors potenciál csökkenésbe (Na^+-aktiváció) megy át, amit ugyancsak pillanatszerűen fellépő repolarizáció követ. A potenciáljel-sorozat alatt az alapdepolarizáció elmélyül, a potenciálvállak meredeksége nő, a kisülési frekvencia fokozódik, az egyes kisülések nagysága csökken, majd a jelgeneráció



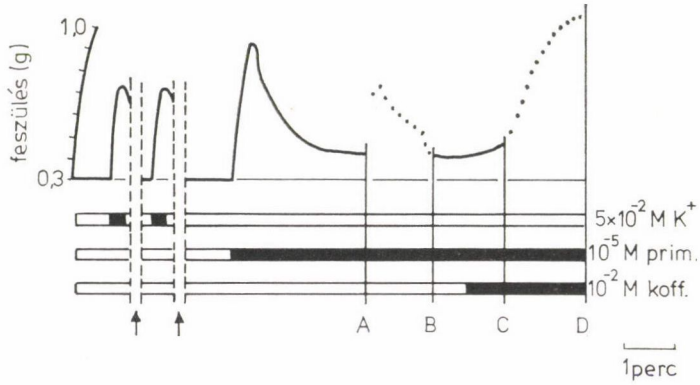
7. ábra. Primycinnel Na-izetionát Ringerben kiváltott akciós potenciál sorozat. Regisztrálás az 1. (1); 1,5 (2); 2. (3); 2,5 (4) percben a primycin alkalmazását követően történt

kb. 0 mV membránpotenciál értéknél teljesen megszűnik. Rövid idő múlva spontán repolarizáció következik be. Ha ez a Na^+-csatornák nyitásának potenciálküszöbét meghaladja, az előbbihez hasonló újabb potenciáljelsorozat indul el. Kísérleti adataink arra utalnak, hogy a primycinre fellépő esetenként ciklikusan ismétlődő folyamatokban különböző szabályozó mechanizmusok szerepelnek. A gyors jelgenerációért feltehetően a Na^+-permeabilitás ritmikus változása, a két jelsorozat közötti repolarizációért a membrán metastabil állapotát szabályozó mechanizmusok a felelősök. Felmerül az a lehetőség is, hogy mindkét folyamat szabályozásáért esetleg két, egymással szorosan csatolt, de strukturálisan más helyre (felszíni membrán és tubuláris membrán) lokalizálható rendszer felelős.

Ismeretes továbbá, hogy a felszíni membrán adott meredekséget meghaladó depolarizációja a kontraktilis rendszer aktiválódását, azaz az izom



8. ábra. Primycinnel (10^{-5} M) NaCl Ringerben kiváltott összehúzódás. Az ábrán az 5×10^{-2} M K^+ és 10^{-2} M koffein hatását is bemutatjuk. Üres nyilak a 20 perc időközöket jelzik, mikor regisztrálás nem történt. Az abszcisszán az időt és a különböző kezelések időtartamát (fekete szakaszok) tüntettük fel

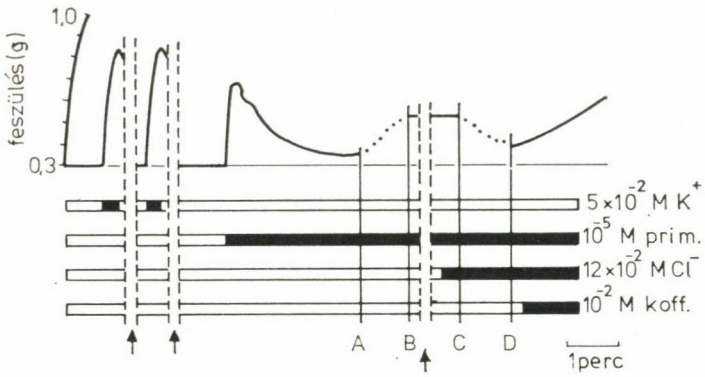


9. ábra. Primycinnel (10^{-5} M) kolin-klorid Ringerben kiváltott összehúzódás. A és B, valamint C és D között az összehúzódást nem regisztráltuk folyamatosan, annak mértékét csak minden 3. (A—B) és mindegyik (C—D) percben regisztráltuk, pontokkal jelezve. Egyebekben l. a 8. ábrát

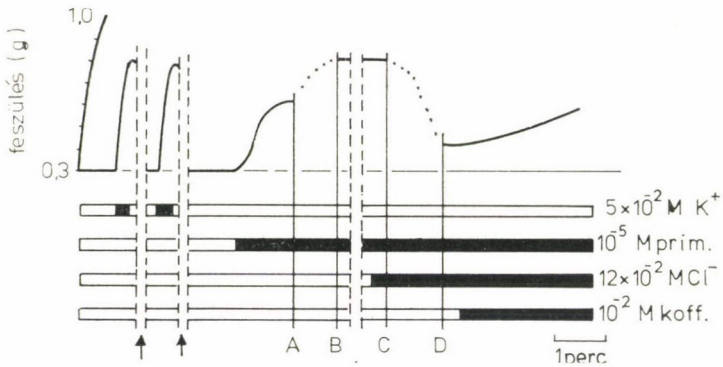
összehúzódását váltja ki (ha az ún. mechanikai küszöböt eléri), függetlenül attól, hogy a depolarizációt elektromos ingerrel vagy a külső közeg K^+-koncentrációjának növelésével hoztuk létre. Az elektromos jelgenerációval kiváltott gyors mechanikai választ rángásnak, a kémiai úton jelgeneráció nélkül kiváltott összehúzódást kontraktúrának nevezzük. A felszíni membrán depolarizációja vagy tovaterjedő ingerület, vagy elektrotónusos potenciál változás formájában terjed rá a vázizom rostokban a felszínre merőlegesen orientált csőrendszerre (T-tubulusok rendszere), majd a tubulusok depolarizációja a szarkoplazmatikus retikulumban tárolt Ca^{2+} felszabadulását eredményezi. Ennek révén nő a citoplazma szabad Ca^{2+} koncentrációja, s a kontraktilis rendszer aktiválódik. A Ca^{2+} mobilizációját (Ca^{2+} aktiváció, összehúzódás), azonban a Ca^{2+} szarkoplazmatikus retikulumba történő felvétele (Ca^{2+} inaktiváció, elernyedés) követi, függetlenül attól, hogy esetleg a körülményektől függően a Ca^{2+} mobilizációját kiváltó depolarizáció tartósan megmarad.

Már korábban említettük, hogy a primycin toxikus hatásai közé sorolható a tremor megjelenése. Ez alapján már eleve feltételezhető, hogy a primycin depolarizáció az izom összehúzódását váltja ki. Az alábbi kísérletekben az összes inkubáló oldat 0,05 mM d-tubokurarét tartalmazott a junkcionális hatások kizárása érdekében. NaCl Ringerben 1×10^{-5} M primycinre az izom valóban összehúzódott, majd azt elernyedés követte. A torziós írókarral regisztrált görbén (8. ábra) az izomfeszülés fokozódása alatt megfigyelhető tüskék arra utalnak, hogy Na^+ jelenlétében a primycin hatására akciós potenciálok keletkeznek, melyek fibrillációban megnyilvánuló rángásokat idéznek elő. Az izom elernyedését követően 10 mM koffeinnel újabb összehúzódás váltható ki, mely azt jelzi, hogy primycin depolarizáció alatt a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} tároló funkciója érintetlen. A koffein ui. a szarkoplazmatikus retikulumra kifejtett közvetlen hatása révén mobilizálja az abban tárolt Ca^{2+}-ot. Minthogy primycinnel depolarizált izmon K^+-kontraktúrát, ill. 50 vagy 120 mM K^+-ot tartalmazó Ringerrel depolarizált izmon primycin kontraktúrát nem lehetett kiváltani, arra következtettünk, hogy a primycin elsődleges hatása a felszíni, és az azzal közvetlen kapcsolatban levő T-tubulus membránon érvényesül.

Hasonló megfigyeléseket tettünk kolin-klorid Ringerben inkubált izmokon is (9. ábra). Eltérést csak annyiban tapasztaltunk, hogy 1. a feszülés fokozódás során fibrillációt nem észleltünk (Na^+-mentes közeg); 2. az első kontrakciós relexációs ciklust követően tartós inkubálás során egy később kifejlődő, majd megszűnő második összehúzódás is jelentkezett. Ez utóbbi összehúzódás a primycin depolarizáció lassú fázisával állítható párhuzamba. Az utóbbi feltételezést támasztja alá az a megfigyelésünk is (10. ábra), hogy kolin-glutamát Ringerben a 2. összehúzódást csak abban az esetben követi elernyedés, ha az inkubáló közegben visszavisszük a Cl^--ot,



10. ábra. Primycinnel (10^{-5} M) kolin-glutamát Ringerben kiváltott összehúzódás és a glutamát Ringer Cl^- Ringerrel való kicserélésének hatása. Az oldatcserét 20 perccel a 2. összehúzódás maximumának elérése után hajtottuk végre. A és B, valamint C és D között a pontok az izomösszehúzódás 3 percenként regisztrált mértékét jelzik. Egyebekben l. a 8. ábrát



11. ábra. Primycinnel (10^{-5} M) szacharóz Ringerben kiváltott összehúzódás, és a szacharóz Ringer kolin-klorid Ringerrel való cseréjének hatása. Az áttérés az összehúzódás maximumának elérést követően történt. Egyebekben l. a 8. ábrát

azaz kolin-klorid Ringerre térünk át. Míg a felszíni membrán közvetítésével a T-tubulusokra elektrotónusosan átterjedő depolarizációra felszabaduló Ca^{2+} visszavétele a szarkoplazmatikus retikulumba a tubulusok még érintetlen K^+ permeabilitása, s a T-TC junkcióban (tubulus-terminális ciszterna) még jelenlevő Cl ionok segítségével lehetővé válik, addig a 2. összehúzódás során (feltehetően a primycin T-tubulusokra kifejtett közvetlen hatása) felszabadult Ca^{2+} csak a Cl ionok külső közegbe való visszaadását követően akkumulálódhat a szarkoplazmatikus retikulumban. A Cl ionok további szerepére utal az a tény is, hogy szacharóz Ringerben (mely anionokat csak néhány mM koncentrációban tartalmaz) az első összehúzódást nem követi elernyedés (tökéletes Cl^--mentesítés esetén) (11. ábra). Elernyedés csak akkor figyelhető meg és azt követően a második összehúzódás teljes ciklusa is, ha a

kolin-klorid Ringerre térünk át a szacharóz Ringerről. A kérdés pontosabb analízise, s a Cl^- bonyolult szerepének tisztázása további kísérletes munkát igényel.

IRODALOM

ABERHART, J., FEHR, T., JAIN, R. C., DEMAYO, P., MOTL, O., BACZYNSKIJ, L., GRACEY, D. E. F., MAC LEAN, D. B., SZILÁGYI, I.: J. Am. Chem. Soc. **92**, 5816—5817 (1970).
ABERHART, J., JAIN, R. C., FEHR, T., DE MAYO, P., SZILÁGYI, I.: J. Chem. Soc. (Perkin Trans. I.) 816—826 (1974).
BLASKÓ, K., GYÖRGYI, S., HORVÁTH, I.: J. Antibiotics (Jap.) **32**, 408—413 (1979).
BLUM, J. J.: Arch. Biochem. Biophys. **111**, 353—361 (1965).
DARÓCZI, A., GESZTELYI, I.: Abstracts of Papers Reg. Congr. of IUPS, Brasov, No. 542 (1970).
VÁLYI-NAGY, T., URI, J., SZILÁGYI, I.: Nature **174**, 1105—1108 (1954).
VÁLYI-NAGY, T., KELENTEI, B.: Arch. Int. Pharm. **124**, 466—470 (1960).

KALCIUM-TRANSZPORT VIZSGÁLATOK FRAGMENTÁLT SZARKOPLAZMATIKUS RETIKULUMON*

SZABOLCS MÁRTON

Orvostudományi Egyetem, Központi Kutató Laboratóriuma, Debrecen

Jól ismert, hogy az izom szarkoplazmatikus retikulumának (SR) három fő funkciója van. 1. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szabályozása; 2. a belső ingervezetés; 3. az energiagazdag vegyületek glikolitikus úton megvalósuló szintézise.

Az SR a felsorolt funkcióknak megfelelően kb. 50% fehérjét, közöttük számos enzimet — főleg Ca^{2+}, Mg^{2+} aktivált ATPázt (MACLENNAN 1970, MACLENNAN és WONG 1971), kevés foszforilázt, foszforiláz b kinázt (WANSON és DROHMANS 1972), a foszfolipid szintézisért és lebontásért felelős enzimeket, így foszfolipáz A_1-t, aciltranszferázokat és CDP foszfotranszferázokat (SARZALA és PILARSKA 1972), acetilkolineszterázt (KARNOVSKY 1964, ULBRECHT és KRUCKENBERG 1965, SZABOLCS és mtsai 1966, 1967 a) — továbbá 55—65 000, 45—50 000, 28—32 000 dalton molekulasúlyú savanyú karakterű fehérjéket, melyek Ca^{2+}-kötő képességgel rendelkeznek, és igen kis mennyiségben egyéb fehérjéket tartalmaz (DUGGAN és MARTONOSI 1970, MCFARLAND és INESI 1971, HASSELBACH és MIGALA 1972, IKEMOTO és mtsai 1972, MACLENNAN és mtsai 1973). A tisztított SR a fehérjéken kívül 40% lipidet, melynek túlnyomó többsége foszfolipid (MEISSNER és FLEISCHER 1974, SARZALA és mtsai 1974), nukleinsavat (3—4%), nukleotidot (LÓRÁND és mtsai 1957), továbbá anorganikus foszfátot, kloridot, káliumot, kalciumot, magnéziumot és nátriumot tartalmaz (SCHUMAN és mtsai 1976, SOMLYO és mtsai 1977, 1978).

Az SR legfontosabb funkciójával, az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozásával, s ennek mechanizmusának kérdéseivel kapcsolatban az utóbbi időben már beszámoltunk (KÖVÉR és SZABOLCS 1975, CSABAI és mtsai 1975, KÖVÉR és SZABOLCS 1976, SZABOLCS és KÖVÉR 1978).

A többi között rámutattunk arra, hogy az SR izomból biokémiai módszerekkel történő izolálása alapvetően és véglegesen megváltoztatja azt az összerendezettséget, mely az izom egyes membránrendszerei, ill. a kontraktilis rendszer között in situ fennáll. Így a fragmentált SR-rel (továbbiakban

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

FSR) jó esetben is csak az SR egyes funkcionális sajátságaira következtethetünk. Az izolálási technika megváltoztatja az SR közvetlen környezetét jelentő közeg, sőt a fragmentumok belső terének összetételét is. Egyszerűen belátható, hogy a kb. 0,1 M-os KCl oldatban izolált vagy inkubált FSR membránja nem rendelkezhet pl. olyan elektromos sajátságokkal, amik jellemzők az SR-re a rostban. Az elmondottakkal két fontos szempontra szeretném a figyelmet felhívni. Az egyik az, hogy a biokémiai jellegű vizsgálatokban is törekedni kell a fiziológiás viszonyok megközelítésére, a másik szempont, hogy negatív eredményekhez juthatunk pusztán amiatt, hogy a kölcsönhatásokat nem a membránra in vivo jellemző metastabil állapotban vizsgáljuk.

Az utóbbi években számos szerző tanulmányozta a FSR kation és anion permeabilitását (KOMETANI és KASAI 1978), ionösszetételét (SHUMAN és mtsai 1976, SOMLYO és mtsai 1977, SOMLYO és mtsai 1978), a kalcium felszabadulás (release) mechanizmusát (OHNISHI 1978a), miközben a membrán potenciál változásokat is követték potenciál érzékeny festék alkalmazásával.

A fentiekkel összhangban tanulmányozzuk, hogy a FSR membránon különböző mértékben penetráló anionok (klorid, glutamát stb.) és kationok (K^+, Na^+, kolin stb.), továbbá a fehérjék hogyan befolyásolják a FSR funkcionális sajátságait (Ca^{2+} felvétel, ATPáz aktivitás, Ca^{2+} mobilizáció).

E kérdések vizsgálatánál az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérésénél az utóbbi időben már elterjedten alkalmazott (BROWN és mtsai 1975, DIPOLO és mtsai 1976, BROWN és mtsai 1977, THOMAS és GORMAN 1977, MILEDI és mtsai 1977, YINGST és HOFMAN 1978, OHNISHI 1978b), arzenazo III. Ca^{2+} indikátort, mely kinetikai mérésekre is alkalmas, használhatóságát tanulmányoztuk. A FSR Ca^{2+} felvételének arzenazo III. segítségével történő mérése mellett vizsgáltuk a Ca^{2+} felvétel körülményeinek biztosítása mellett — természetesen arzenazo III. nélkül — a FSR abszorpciónövekedésének sajátságait és mértékét 350 nm-nél. Korábban ugyanis azt tapasztaltuk (SZABOLCS és KERESZTES 1978), hogy ha az FSR SH-csoportjait 412 nm-nél a Ca^{2+} felvétel körülményeinek biztosítása mellett ELMAN módszere szerint (ELMAN 1959) titráljuk, akkor a kontroll kísérletek tanúsága szerint az FSR-nél az abszorpció fokozódik. Feltételeztük, hogy az abszorpció fokozódás alacsonyabb hullámhossznál még kifejezettebb.

Módszerek, anyagok

A kísérleteknél használt oldatok: Szuszpendáló oldat: 0,3 M szacharóz, 20 mM TRISZ-HCl puffer, pH 7. ATP tartalmú inkubáló oldat: 100 mM KCl, 20 mM TRISZ-maleát, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM K-oxalát, 0,3—0,4 mM EGTA, 0,0—0,5 mM $CaCl_2$, 5 mM ATP, pH 6,75. Acetiltiokolin inkubációs oldat: 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM hisztidin, 1,5 mM acetiltiokolin,

pH 7,0. Az oldatokat ionmentes vízzel készítettük, a pH-t Radelkisz OP—204/1 pH-mérővel mértük.

FSR izolálása: Kísérleteinkhez a FSR-t nyúlizomból Suko és Hasselbach (1976) módszerével izoláltuk. A módszer lényege a következő: a felaprított izmot 3 térfogat szuszpendáló oldatban 0—4 °C között Waring blendorban 3×15 másodpercig homogenizáltuk. A homogenátumból 1000 g-nél (20 perc, 2 °C) a fel nem tárt sejteket, kötőszöveti maradványokat, 12 000 g-nél (20 perc, 2 °C) a mitochondriumot távolítottuk el. A 12 000 g-vel történő centrifugáláskor nyert szupernatánsból 50 000 g mellett (60 perc, 2 °C) ülepítettük ki a nyers FSR-t, amelyet a miofibrilláris fehérjék eltávolítására 0,6 M KCl-ot, 0,3 M szacharózt, 2 mM MgATP-t, 20 mM TRISZ-HCl-t tartalmazó oldattal (pH 7,0) extraháltunk (30 perc, 2 °C), majd 60 000 g-vel (60 perc, 2 °C) centrifugáltuk. A szupernatánst elöntöttük, a csapadékot kétszer mostuk (60 000 g-nél 50—50 perc, 2 °C), a KCl eltávolítása céljából szuszpendáló oldatban. A mosások után a FSR csapadékot a hideg szuszpendáló oldatban — kb. 4—5 mg fehérje/ml koncentrációra beállítva — szuszpendáltuk. E szuszpenziók 1—1 ml-es részleteit műanyagcsövekbe mértük, lefagyasztottuk, a felhasználásig —20 °C-on tároltuk.

Na-dodecilszulfátos poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE): Az izolált FSR preparátumaink fehérje komponenseinek molekulasúlyát Weber és Osborn (1969) módszerével határoztuk meg.

ATPáz aktivitás meghatározás: A méréseknél az ismertetett összetételű 1 ml ATP tartalmú inkubáló oldat 0,1 mg FSR fehérjét tartalmazott. A mintákat 23 °C-on 5 percig inkubáltuk. Az inkubálás végén 0,1 ml 5%-os Na-dodecilszulfátot mértünk a mintákhoz az ATPáz inaktiválása és szolubilizálása céljából. Az anorganikus foszfát (P_i) tartalmat Taussky és Shorr (1953) módszerével mértük.

Kolineszteráz aktivitás meghatározás: A méréseknél az ismertetett összetételű 1 ml acetiltiokolin inkubációs oldat 0,4 mg FSR fehérjét tartalmazott. Az inkubálás 37 °C-on 60 percig történt. Az acetiltiokolinból az enzimes hidrolízis során felszabaduló tiokolin mennyiségét Ellman és mtsai (1961) módszerének némi módosításával határoztuk meg.

A FSR abszorpciónövekedésének mérése: A méréseket 350 nm-nél Opton PM 2 DL egysugaras fotométerrel a minták állandó keverése mellett végeztük. A kísérleteknél a 2 ml ATP tartalmú inkubáló oldat 0,2 mg FSR fehérjét tartalmazott. Az inkubálást vagy az ATP vagy a FSR bemérésével indítottuk, az extinkcióértékeket Radelkisz gyártmányú (OH-814/1) potenciometrikus rekorderrel folyamatosan regisztráltuk. A kontroll kísérleteket az előbbi módon, de Ca^{2+} nélküli inkubáló oldatokkal végeztük. Az ábrákon e kontroll kísérletek alapján korrigált regisztrogramokat tüntettük fel.

Ca^{2+} felvétel mérése arzenazo III. jelenlétében: A mérések elve ugyanaz mint az abszorpciónövekedés mérésénél, a különbség annyi, hogy a 2 ml

ATP tartalmú oldat a 0,2 mg FSR fehérje mellett 0,1 mM végkoncentrációban 20 mM TRISZ-HCl oldatban (pH 7,0) oldott arzenazo III.-at is tartalmazott. A méréseket 675 nm-nél, azaz nem az arzenazo III.-Ca komplex 650 nm-nél levő egyik abszorpciós maximumánál végeztük, mivel irodalmi adatok szerint (SCARPA és mtsai 1977) 675—685 nm között a Mg^{2+} és más kétértékű kationok nem zavarják a Ca^{2+} meghatározást.

A FSR fehérje tartalmat LOWRY (1951) módszerével mértük. A különböző vegyszerek, ill. inkubáló oldatok kalcium tartalmát atomabszorpciós fotométerrel (AASl Carl Zeiss, Jena) határoztuk meg.

A kísérleteknél a. lt. Reanal vegyszereket használtunk. A szacharóz és az arzenazo III. Merck gyártmányú volt.

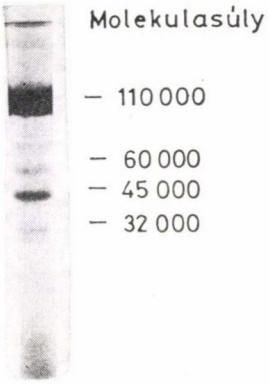
Eredmények, megbeszélés

Az általunk nyúlizomból izolált FSR a Na-dodecilszulfátos PAGE alapján 110 000, 60 000, 45 000 és 32 000 dalton molekulasúlyú fehérje komponenseket tartalmaz (1. ábra). Látható, hogy a főkomponens 110 000 dalton molekulasúlyú, mely az irodalmi adatok szerint (MACLENNAN 1970, MACLENNAN és WONG 1971) a Ca^{2+} transzport ATPáz-nak felel meg. A 60 000 dalton molekulasúlyú fehérje a „magas affinitású Ca^{2+} kötő fehérje", a 45 000 dalton molekulasúlyú fehérje a „kalszekvesztrin" (MACLENNAN és mtsai 1972).

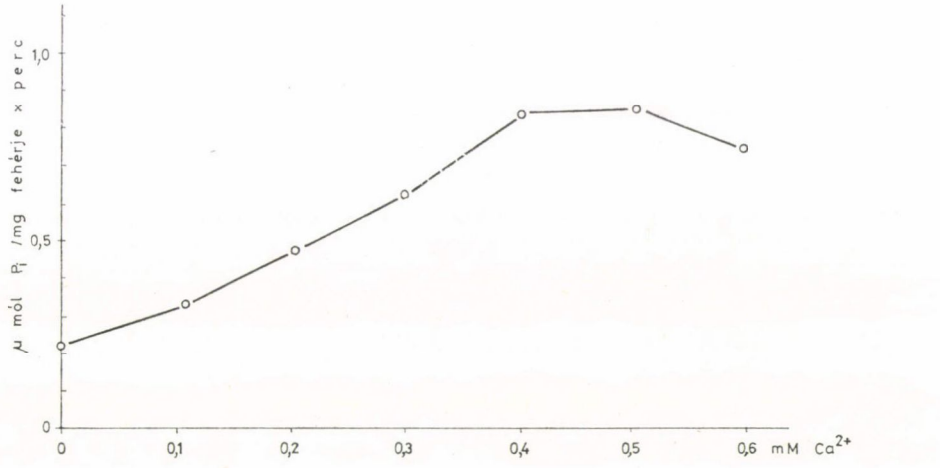
Mint ismeretes (MARTONOSI és FERETOS 1964) a FSR Ca^{2+}, Mg^{2+} aktivált ATPáz-a Ca ionokkal csak egy meghatározott koncentráció tartományban — 10—150 μM között — aktiválódik, az ez alatti, ill. e fölötti Ca^{2+} koncentrációknál csökken. Az izolált FSR preparátumainknál ezért megvizsgáltuk az ATPáz aktivitást különböző Ca^{2+} koncentráció mellett. Az egyik kísérlet mérési eredményeit mutatja a 2. ábra.

Kitűnik a 2. ábrából, hogy ha az ATP tartalmú inkubáló oldatban 0,4 mM EGTA van, akkor a legmagasabb — μmol P_i/mg FSR fehérje $\times$ perc egységben kifejezett — ATPáz aktivitás 0,4—0,5 mM Ca^{2+} koncentrációnál mérhető. (Itt jegyezzük meg, hogy az ATP tartalmú inkubáló oldatban levő vegyszerek — KCl, K-oxalát, $MgCl_2$, TRISZ-maleát, ATP, EGTA, szacharóz — Ca tartalma miatt az inkubáló oldatban — Ca^{2+} hozzáadása nélkül is — 0,12—0,13 mM a kalcium koncentráció.)

A Ca^{2+} transzport ATPáz Ca^{2+} ionokkal való aktiválhatóságának optimumát ismerve a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a FSR Ca^{2+} felvétele, ill. a 350 nm-nél mért abszorpciónövekedés, ha az ATP tartalmú inkubáló oldatban változtatjuk vagy az ATP, vagy a K-oxalát, vagy a Ca^{2+} koncentrációját. E kísérletek során 675 nm-nél, ill. 350 nm-nél regisztrált extinkciókat az ábrák B részén feltűntetett, s a kontroll kísérletek alapján korrigált regisztrogramokon tüntettük fel. Az ábrák A részén a re-



1. ábra. Na-dodecilszulfáttal és béta-merkaptoetanollal oldott FSR poliakrilamid gélelektroforetogramja



2. ábra. A FSR ATPáz aktivitás változása a Ca^{2+} koncentráció függvényében; a kísérletnél az ATP tartalmú inkubáló oldat 0,4 mM EGTA-t és az abszcisszán feltüntetett 0—0,6 mM $CaCl_2$-ot tartalmazott. További részletek a Módszerek, anyagok c. részben

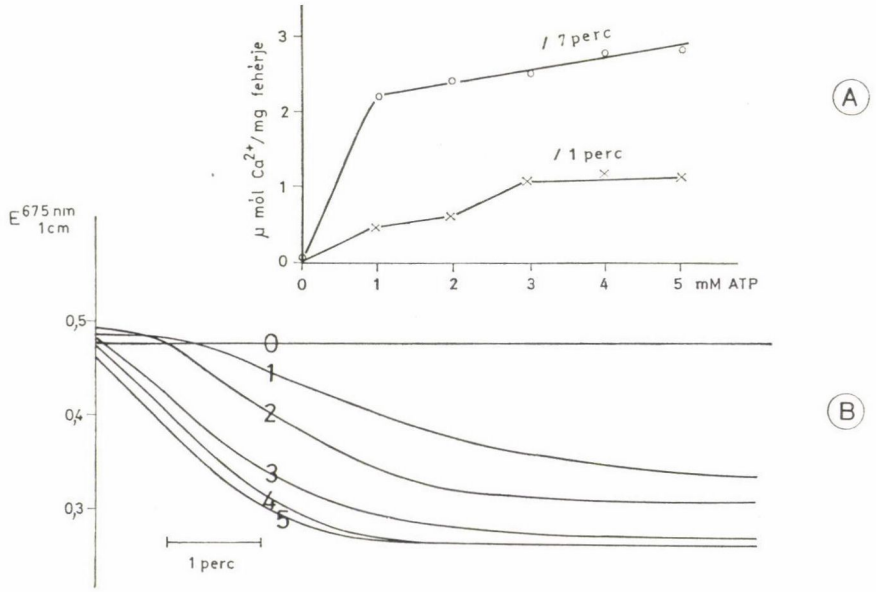
gisztrogramok adatai alapján, ha a mérés 675 nm-nél arzenazo III. jelenlétében történt, a kalibrációs görbe segítségével számított Ca^{2+} felvétel mértékét, s a Ca^{2+} felvétel sebességét tüntettük fel. Ez utóbbit a Ca^{2+} felvétel indításától számított 30—90 másodperc között regisztrált adatok alapján értékeltük. Amennyiben a mérés arzenazo III. nélkül 350 nm-nél történt, akkor az ábrák A részén a 7 perc alatt bekövetkező, a B regisztrogramok alapján értékelt, abszorpció növekedés nagyságát, ill. a 30—90 másodperc között bekövetkező abszorpció növekedés alapján a sebességet tüntettük fel.

Az ATP koncentráció hatása a Ca^{2+} felvételre: Látható a 3., 4. ábra B részein, hogy 675 nm-nél az FSR Ca^{2+} felvétele miatt az arzenazo III. ab-

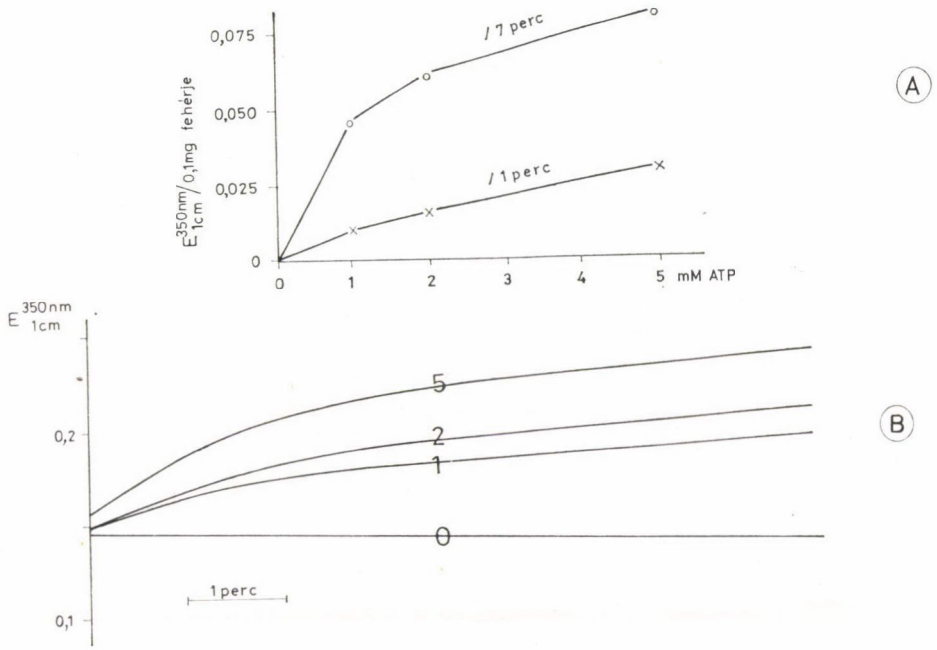
szorpció csökkenése, ill. 350 nm-nél a FSR abszorpciójának fokozódása az első 3—4 percben jelentős, ezután már alig változik (ugyanez látható az 5., 6., 7., 8., 9. ábra B részein is). A FSR Ca^{2+} felvételének nagysága (3. ábra A) 0—1 mM ATP koncentráció között jelentősen, 1—5 mM ATP koncentráció között már csak kissé fokozódik. A Ca^{2+} felvétel sebessége 0—3 mM ATP koncentráció között emelkedik, 3 mM ATP koncentrációnál elért 1,2 μmol Ca^{2+}/mg fehérje/perc sebesség az ATP koncentráció további növelésével már nem változik. Az FSR Ca^{2+} felvételekor arzenazo III. nélkül 350 nm-nél mért abszorpció növekedés nagysága és sebessége szintén függ az inkubáló oldat ATP koncentrációjától (4. ábra A).

A K-oxalát koncentráció hatása a Ca^{2+} felvételre: Kitűnik az 5., 6. ábra A részein, hogy a FSR Ca^{2+} felvételének arzenazo III. festékkel mért nagysága, ill. az arzenazo III. festék nélkül 350 nm-nél mért abszorpciónövekedésének mértéke 0—2 mM K-oxalát koncentráció között jelentősen, 2—5 mM K-oxalát koncentráció között csak kissé fokozódik. A Ca^{2+} felvétel, ill. az abszorpciónövekedés sebessége 0—3 mM K-oxalát koncentráció között emelkedik, 3 mM K-oxalát koncentráció fölött a sebességi konstansok már nem változnak.

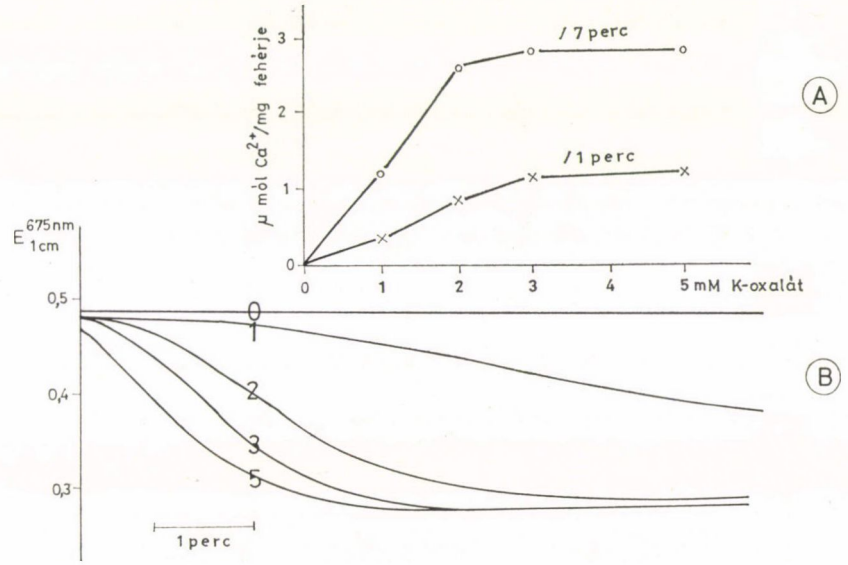
A Ca^{2+} koncentráció hatása a Ca^{2+} felvételre: Látható a 7. ábra A részén, hogy a FSR Ca^{2+} felvétele és a felvétel sebessége 0,3—0,4 mM Ca^{2+} koncentráció között — ha 0,4 mM EGTA van jelen — jelentősen, 0,4—0,5 mM Ca^{2+}



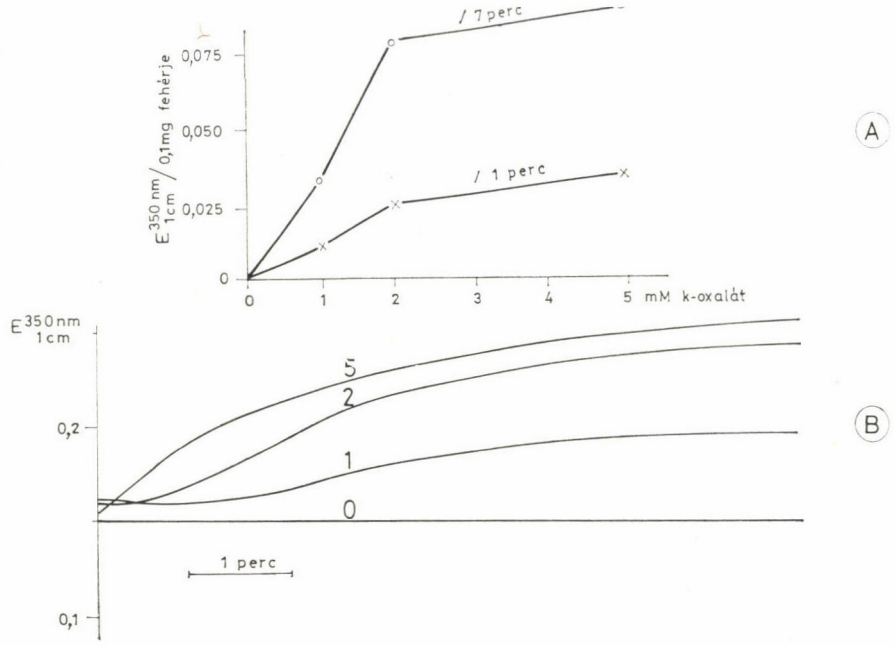
3. ábra. Az ATP koncentráció hatása a FSR Ca^{2+} felvételére; A kísérlet során az ATP tartalmú inkubáló oldat 0,4 mM EGTA-t, 0,4 mM $CaCl_2$-ot és az abszcisszán feltüntetett 0—5 mM ATP-t tartalmazott. További részletek a Módszerek, anyagok c. részben és a szövegben



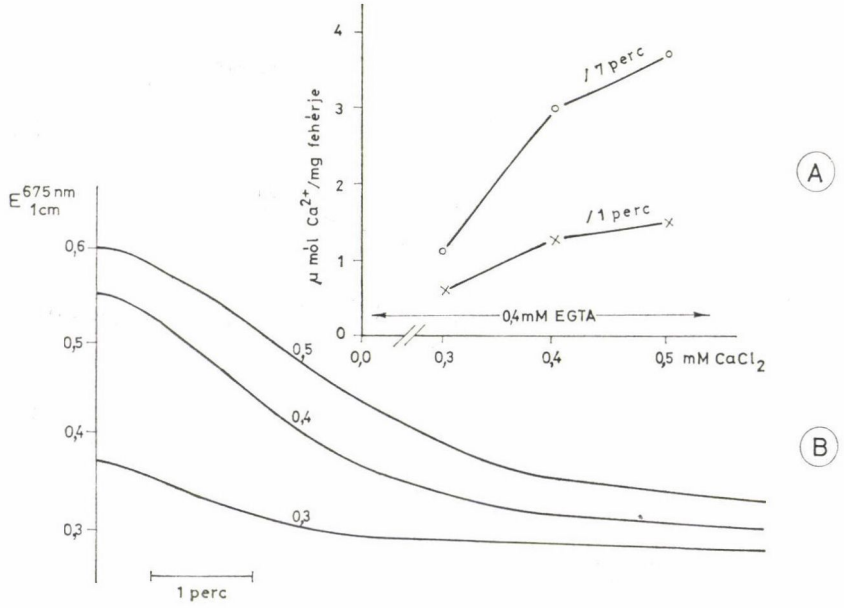
4. ábra. **Az ATP koncentráció hatása a FSR abszorpció növekedésére 350 nm-nél. A kísérleti körülmények azonosak a 3. ábra szövegében leírtakkal**



5. ábra. **A K-oxalát koncentráció hatása a FSR Ca^{2+} felvételére. A kísérletnél az ATP tartalmú inkubáló oldat 0,4 mM EGTA-t, 0,4 mM $CaCl_2$-ot és az abszcisszán feltüntetett 0—5 mM K-oxalátot tartalmazott. További részletek a Módszerek, anyagok c. részben és a szövegben**



6. ábra. A K-oxalát koncentráció hatása a FSR abszorpciónövekedésére 350 nm-nél. A kísérlet körülmények azonosak az 5. ábra szövegében leírtakkal



7. ábra. A Ca^{2+} koncentráció hatása a FSR Ca^{2+} felvételére. A kísérlet során az ATP tartalmú inkubáló oldat 0,4 mM EGTA-t s az abszcisszán feltüntetett 0—0,5 mM $CaCl_2$-ot tartalmazott. További részletek a Módszerek, anyagok c. részben és a szövegben

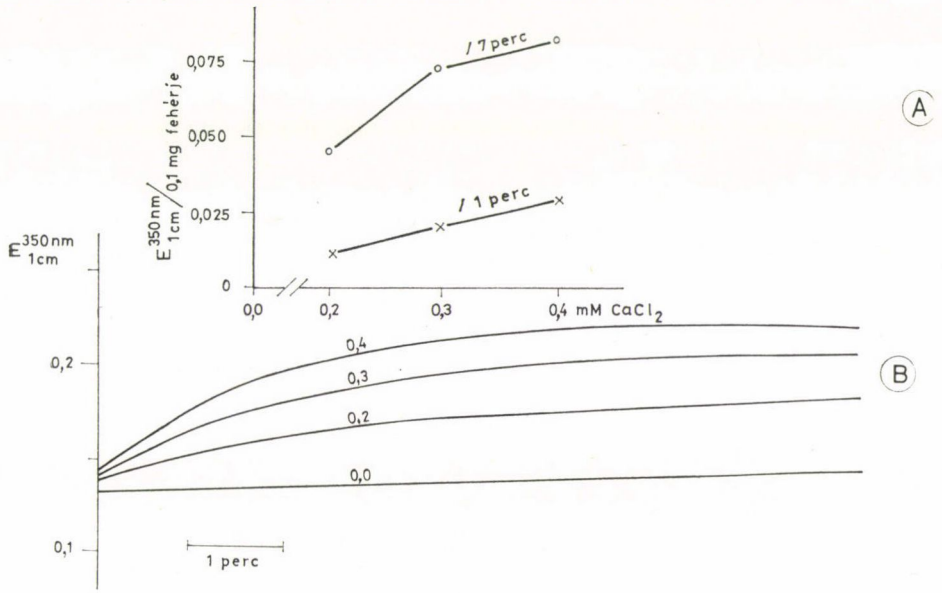
koncentráció között már csak kissé, ill. alig fokozódik. Hasonlóan függ a Ca^{2+} koncentrációtól az FSR arzenazo III. nélkül 350 nm-nél mért abszorpció-növekedésének nagysága, ill. sebessége (8. ábra A).

A Mg^{2+} koncentráció hatása a FSR abszorpciónövekedésére 350 nm-nél: A Ca^{2+} felvétel körülményeinek biztosítása mellett a FSR arzenazo III. nélkül mért abszorpció növekedésének nagysága, ill. sebessége 0—1 mM Mg^{2+} koncentráció fölött már csak kissé fokozódik (9. ábra A).

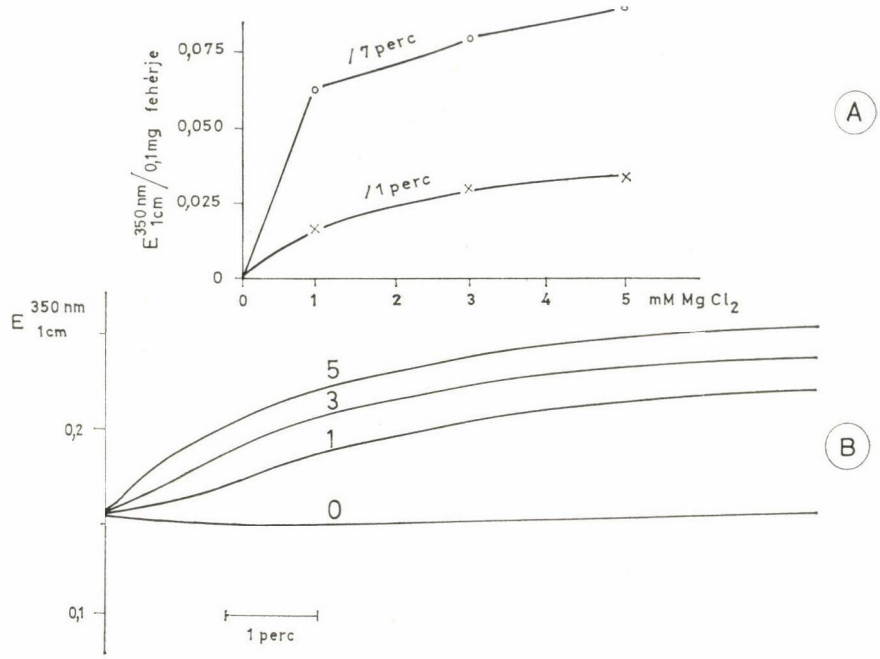
Az ismertetett eredmények egyrészt jól egyeznek azokkal az adatokkal, melyeket korábban ^{45}Ca felhasználásával mértünk (SZABOLCS és KÖVÉR 1966, SZABOLCS és mtsai 1966), másrészt azt is bizonyítják, hogy az arzenazo III. kinetikai paraméterek meghatározására is alkalmas, s jól helyettesíti a munkaigényesebb stb. Millipore technikát.

Az eddig bemutatott kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a FSR Ca^{2+} felvétele nemcsak az arzenazo III. jelenlétében, hanem a 350 nm-nél — arzenazo III. nélkül — mért abszorpció fokozódás alapján is jól meghatározható. A FSR Ca^{2+} felvételekor bekövetkező abszorpció fokozódás nem a kromofor csoportok megváltozását, hanem valószínűleg a FSR méretének duzzadás miatti növekedését jelzi.

Mindezek ismeretében a továbbiakban vizsgáltuk a koffein, fizosztigmin, K-glutamát (KCl helyett), a d-tubokurare, a tripszines emésztés hatását a FSR Ca^{2+} felvételére arzenazo III. segítségével, ill. a 350 nm-nél való abszorpció fokozódás alapján.



8. ábra. A Ca^{2+} koncentráció hatása a FSR abszorpciónövekedésére 350 nm-nél. A kísérleti körülmények azonosak a 7. ábra szövegében leírtakkal



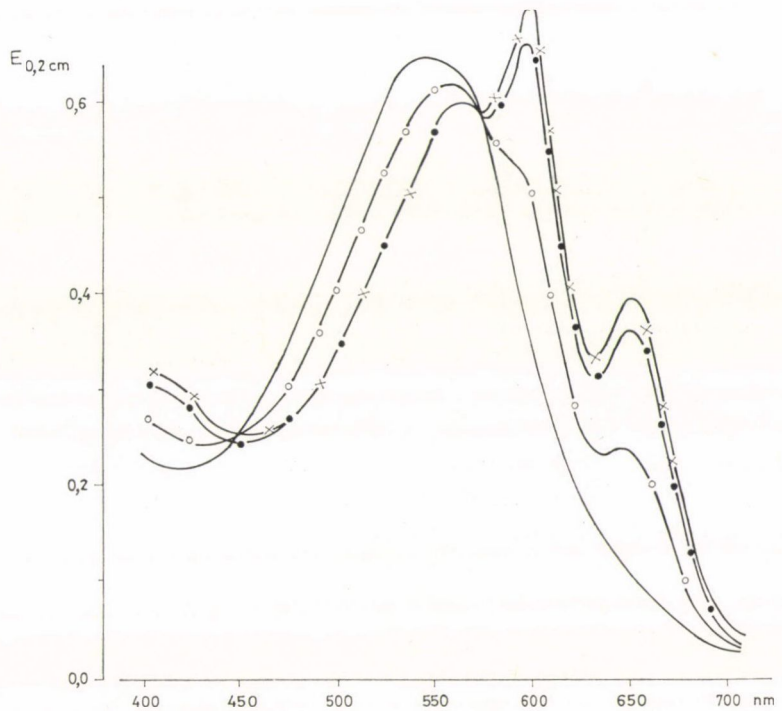
9. ábra. A Mg^{2+} koncentráció hatása a FSR abszorpciónövekedésére 350 nm-nél. A kísérlet során az ATP tartalmú inkubáló oldat 0,4 mM EGTA-t, 0,4 mM $CaCl_2$-ot és az abszcisszán feltüntetett 0—5 mM $MgCl_2$-ot tartalmazott

E kísérletekhez Ca^{2+} ionokra a kalibrációs görbéket nemcsak a 100 mM KCl-t, 20 mM TRISZ-maleat-ot, 5 mM $MgCl_2$-ot, 5 mM K-oxalátot, 0,4 mM EGTA-t, 5 mM ATP-t, 0,1 mM arzenazo III.-at, 30 mM szacharózt (utóbbit a FSR helyett) tartalmazó inkubáló oldattal, hanem ezen inkubáló oldat, s az előbbiekben felsorolt vegyületek adott koncentrációit tartalmazó oldatokkal is elkészítettük. Ekkor azt tapasztaltuk, hogy a kalibrációs görbék a d-tubokurare, K-glutamát, koffein, fizosztigmin jelenlétében némi eltérést mutattak. Mindezek arra utaltak, hogy az említett vegyületek vagy Ca^{2+}-ot kelálnak, vagy az arzenazo III.-mal reagálva annak spektrális tulajdonságait megváltoztatják. Ezért megvizsgáltuk minden egyes vegyülettel és e nélkül a fentebb említett arzenazo III. tartalmú inkubáló oldat abszorpciós spektrumát 400—700 nm között. Az arzenazo III. tartalmú inkubáló oldat hozzáadott Ca^{2+} nélküli, ill. különböző végkoncentrációjú Ca^{2+} jelenlétében felvett abszorpciós spektrumát mutatja a 10. ábra. Látható, hogy a Ca^{2+} nélküli inkubáló oldatban az arzenazo III.-nak 545 nm-nél abszorpciós maximuma van. A Ca^{2+} tartalmú inkubáló oldatban a Ca^{2+} koncentrációtól függő, de annak növelésével nem teljesen lineárisan fokozódó abszorpciós maximumok jelentkeznek 650 és 596 nm-nél. Az abszorpciós maximumok helye te-

kintetében nincs változás, ha az inkubáló oldatban 10 mM koffein, vagy 10 mM fizosztigmin, vagy a 100 mM KCl helyett 100 mM K-glutamát van. Eltérés abban van — összhangban a kalibrációs görbékkel —, hogy az abszorpciós maximumok magassága 650 és 596 nm-nél az inkubáló oldatban levő vegyülettől függően (koffein stb.) alacsonyabb. A d-tubokurarét 1—2 mM végkoncentrációban tartalmazó inkubáló oldat 0,1 mM arzenazo III. jelenlétében felvett abszorpciós spektruma mind Ca^{2+} nélkül, mind Ca^{2+}-mal jelentősen eltér a 10. ábra abszorpciós spektrumaitól. Így a d-tubokurarét tartalmazó inkubáló oldatokkal csak az abszorpció növekedést mértük 350 nm-nél.

A K-glutamát, a koffein, a fizosztigminszulfát, a d-tubokurare és a tripszines emésztés hatása — különböző Ca^{2+} koncentrációk mellett — a Ca^{2+} felvételre, ill. az abszorpciónövekedésre az I. táblázatban látható.

Kitűnik az I. táblázatból, hogy az adott koncentrációjú koffein, fizosztigmin, d-tubokurare a vizsgált Ca^{2+} koncentrációknál gátolja a FSR Ca^{2+} felvételét és az abszorpciónövekedést 350 nm-nél. Korábban ^{45}Ca felhasználásával végzett kísérletek (KÖVÉR és mtsai 1965, VAN DER KLOOT 1966



10. ábra. A 0,1 mM koncentrációjú arzenazo III. abszorpciós spektruma Ca^{2+}-mal és Ca^{2+} nélkül. A spektrum felvételénél az ATP tartalmú inkubáló oldat összetétele: 100 mM KCl, 20 mM TRISZ-maleat, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM K-oxalát, 0,4 mM EGTA, 5 mM ATP, 30 mM szacharóz (FSR szuszpenzió helyett), 0,1 mM arzenazo III., 0,0 mM Ca^{2+} ——; 0,37 mM Ca^{2+} ○——○; 0,8 mM Ca^{2+} ●——●; 1,2 mM Ca^{2+} ×——×

1. táblázat

A koffein, fizosztigmin, d-tubokurare, K-glutamát és a tripszines emésztés hatása a FSR Ca^{2+} felvételére és az abszorpciónövekedésre 350 mm-nél. Az ATP tartalmú inkubáló oldat 0,4 mM EGTA-t és a táblázatban feltüntetett 0,3—0,5 mM $CaCl_2$-ot, koffeint stb., továbbá 0,0 vagy 0,1 mM arzenazo III.-at tartalmazott. A K-glutamáttal végzett kísérletben az ATP tartalmú inkubáló oldat ugyanaz mint előbb, de 100 mM KCl helyett 100 mM K-glutamátot tartalmazott. A tripszines emésztésnél a fehérje: tripszin = 200: 1; az emésztést az adott időpontokban kétszeres mennyiségű tripszin inhibitorral állítottuk le

mM Ca^{2+}	Vegyület az inkubációs oldatban		µmól Ca^{2+} per mg fehérje × perc	$E^{350\,nm}$ per mg fehérje × perc	µmól Ca^{2+} per mg fehérje × 7 perc	$E^{350\,nm}$ per mg fehérje × 7 perc
0,3			0,60	0,20	1,10	0,69
0,4	—		1,20	0,30	3,30	0,85
0,5			1,50	—	3,85	—
0,4			0,90	0,24	1,90	0,56
0,5	10 mM koffein		1,50	—	2,90	—
0,4	10 mM fizosztigminszulfát		0,60	0,21	1,80	0,52
0,5			0,95	—	3,00	—
0,4	2 mM d-tubokurare		—	0,06	—	0,27
0,3			0,70	0,28	1,30	0,87
0,4	K-glutamát		1,40	0,34	3,15	1,10
0,5			2,00	—	5,30	—
0,4	Tripszines	0 perc	1.20	—	3,30	—
	emésztés	4 perc	0,99	—	2,67	—
		6 perc	0,84	—	1,82	—
		10 perc	0,36	—	0,75	—

Kövér és Szabolcs 1968, Szabolcs és mtsai 1967b, Kövér és mtsai 1974, Weber 1968) hasonló eredményt adtak.

Az inkubáló oldatban a 100 mM KCl helyett alkalmazott 100 mM K-glutamát fokozza a FSR Ca^{2+} felvételét, a Ca^{2+} felvétel sebességét, ill. az abszorpciónövekedés mértékét és sebességét. A glutamát valószínűleg ezért fokozza a FSR Ca^{2+} felvételét, mert a jól penetráló klorid anionokhoz képest a kevésbé penetráló glutamát anion jobban biztosítja a FSR membrán polarizációját (Kometani és Kasai 1978).

Az ismertetett kísérleti eredményeink alapján a továbbiakban megvizsgáljuk, hogy hogyan változnak a Ca^{2+} felvétel és az abszorpciónövekedés paraméterei: kevéssé penetráló kation (kolin) és jól penetráló anion (klorid), továbbá kevéssé penetráló kation (kolin) és kevéssé penetráló anion (glutamát) jelenlétében.

Megköszönöm Dr. Korom Istvánnénak a hasznos és értékes technikai segítséget. Az atomabszorpciós méréseknél, ill. az abszorpciós spektrumok felvételénél nyújtott segítségért Dr. Nagy Zoltán kandidátusnak, ill. Csabina Sándor tudományos segédmunkatársnak tartozom köszönettel.

IRODALOM

BROWN, J. E., COHEN, L. B., DEWEER, P., PINTO, L. H., ROSS, W. N., SALZBERG, B. M.: Biophys. J. **15,** 1155 (1975).
BROWN, J. E., BROWN, P. K., PINTO, L. H.: J. Physiol. (Lond.) **267,** 299 (1977).
CSABAI, A., KÖVÉR, A., SZABOLCS, M.: MTA Biol. Oszt. Közl. **18,** 143 (1975).
DIPOLO, R., REQUENA, J., BRINLEY, F. J., MULLINS, L. J., SCARPA, A., TIFFERT, T.: J. Gen. Physiol. **67,** 433 (1976).
DUGGAN, P. F., MARTONOSI, A.: J. Gen. Physiol. **56,** 147 (1970).
ELLMAN, G. L.: Arch. Biochem. Biophys. **82,** 70 (1959).
ELLMAN, G. L., COURTNEY, D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R. M.: Biochem. Pharmacol. **7,** 88 (1961).
HASSELBACH, W., MIGALA, A.: FEBS Letters **26,** 20 (1972).
IKEMOTO, N., BHATNAGER, G. M., NAGY, B., GERGELY, J.: J. Biol. Chem. **247,** 7835 (1972).
KARNOVSKY, M. J.: J. Cell. Biol. **23,** 217 (1964).
KOMETANI, T., KASAI, M.: Sixth Intern. Biophys. Congr. Kyoto, Japan, Abstr. 362. (1978).
KÖVÉR, A., SZABOLCS, M., DEZSŐ, GY.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **26,** Suppl. 17 (1965).
KÖVÉR, A., SZABOLCS, M.: Acta Biol. Debrecina **6,** 115 (1968).
KÖVÉR, A., SZABOLCS, M., CSABAI, A., OLÁH, É.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **9,** 339 (1974).
KÖVÉR, A., SZABOLCS, M.: MTA Biol. Oszt. Közl. **18,** 143 (1975).
KÖVÉR, A., SZABOLCS, M.: MTA Biol. Oszt. Közl. **19,** 385 (1976).
LÓRÁND, L., MOLNÁR, J., MOSS, C.: In: Conference on the chemistry of muscular contraction. Igaku Shoin Ltd., Tokyo, Osaka p. 85 (1957).
LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. R., RANDALL, R. J.: J. Biol. Chem. **193,** 265 (1951).
MACLENNAN, D. H.: J. Biol. Chem. **245,** 4508 (1970).
MACLENNAN, D. H., WONG, P. T. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **68,** 1231 (1971).
MACLENNAN, D. H., YIP, C. C., ILES, G. H., SEEMAN, P.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **37,** 469 (1972).
MARTONOSI, A., FERETOS, R.: J. Biol. Chem. **239,** 659 (1964).
MCFARLAND, B. H., INESI, G : Arch. Biochem. Biophys. **145,** 456 (1971).
MEISSNER, G., CONNER G. E., FLEISCHER, S.: Biochim. Biophys. Acta **298,** 246 (1973).
MEISSNER, G., FLEISCHER, S.: In: Calcium Binding Proteins (ed: Drabikowski, W., Strzelecka-Golaszewska, H., Carafoli, E.) PWN Warszawa, Elsevier Amsterdam p. 281 (1974).
MILEDI, R., PARKER, I., SCHALOW, G.: Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **198,** 201 (1977).
OHNISHI, S. T.: Sixth Intern. Biophys. Congr. Kyoto, Japan, Abstr. 142 (1978a).
OHNISHI, S. T.: Sixth Intern. Biophys. Congr. Kyoto, Japan, Abstr. 289 (1978b).
SARZALA, M. G., PILARSKA, M.: 15th Intern. Conf. on the Biochemistry of Lipids. The Haque Abstr. p. 94 (1972).
SARZALA, M. G., ZUBRZYCKA, E., DRABIKOWSKI, W.: In: Calcium Binding Proteins (ed: Drabikowski, W., Strzelecka—Golaszewska, H., Carafoli, E.) PWN Warszawa, Elsevier, Amsterdam, p. 315 (1974).
SCARPA, A., TIFFERT, T., Jr. BRINLEY, F. J.: In: Biochemistry of Membrane Transport (ed: Semenza, G., Carafoli, E.) Springer-Verlag Berlin—Heidelberg—New York, p. 552 (1977).
SHUMAN, H., SOMLYÓ, A. V., SOMLYÓ, A. P.: Ultramicroscopy **1,** 317 (1976).
SOMLYÓ, A. V., SHUMAN, H., SOMLYÓ, A. P.: J. Cell. Biol. **74,** 828 (1977).
SOMLYÓ, A. V., SHUMAN, H., SOMLYÓ, A. P.: Sixth Intern. Biophys. Congr. Kyoto, Japan, Abstr. p. 160 (1978).
SUKO, J., HASSELBACH, W.: Eur. J. Biochem. **64,** 123 (1976).
SZABOLCS, M., KÖVÉR, A.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **1,** 159 (1966).
SZABOLCS, M., KÖVÉR, A., KOVÁCS, L., RÁCZ, M.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **1,** 233 (1966).
SZABOLCS, M., KÖVÉR, A., KOVÁCS, L.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **2,** 409 (1967a).
SZABOLCS, M., KÖVÉR, A., KOVÁCS, L.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **2,** 395 (1967b).
SZABOLCS, M., KÖVÉR, A.: MTA Biol. Oszt. Közl. **21,** 267 (1978).

SZABOLCS, M., KERESZTES, T.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **52**, 121 (1978).
TAUSSKY, H. H., SHORR, E.: J. Biol. Chem. **202**, 675 (1953).
THOMAS, M. V., GORMAN, A. L. F.: Science **196**, 531 (1977).
ULBRECHT, G., KRUCKENBERG, T.: Nature **206**, 305 (1965).
VAN DER KLOOT, W. G.: Comp. Biochem. Physiol. **17**, 75 (1966).
WANSON, J. C., DROHMANS, P.: J. Cell. Biol. **54**, 206 (1972).
WEBER, A.: J. Gen. Physiol. **52**, 760 (1968).
WEBER, K., OSBORN, M.: J. Biol. Chem. **244**, 4406 (1969).
YINGST, D. R., HOFFMAN, J. F.: Biophys. J. **23**, 463 (1978).

A VÁZIZOM CA-KOMPARTMENTALIZÁCIÓJÁNAK MATEMATIKAI ANALÍZISE SZÁMÍTÓGÉPES PROGRAMMAL*

KÉRINÉ FÜLÖP ILDIKÓ, JÓNA ISTVÁN és KÓNYA LÁSZLÓ
Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma

Bevezetés

Az izom összehúzódásában nagy szerepe van a lokális Ca-koncentráció változásnak. Az izom felépítését tekintve strukturált, tehát inhomogén és ez a Ca megoszlására is igaz. Steady-state rendszerben a fázishatárokon belül az anyag eloszlása egyenletes, az ekvilibrium gyorsan beáll, míg a fázishatárokon keresztül történő anyagtranszport lassú — kinetikai állandóval jellemezhető — nettó fluxus nincs.

A béka vázizom Ca-megoszlására vonatkozó izotóp kinetikai kísérletek kiértékelésénél abból indultunk ki, hogy steady-state rendszerünket időfüggetlen paraméterű kompartment rendszerrel jól közelíthetjük.

Cikkünkben a ^{45}Ca kimosásával (állandó $Ca_{totál}$) kapott deszaturációs görbék Fourier-transzformációs módszerrel történő dekonvolucióját ismertetjük. A görbékre kapott paraméterek segítségével ki lehet számítani a kompartmentekre jellemző mennyiségeket attól függően, hogy mely kompartmentek között áll fenn anyagtranszport.

Kompartmentanalízis

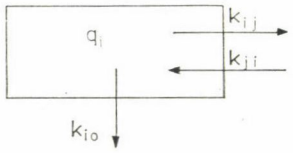
Egy biológiai rendszer kompartmentanalízise egy olyan absztrakt modell kifejlesztése, amely egy adott anyag megoszlását és kinetikáját reprezentálja az adott rendszerben. A kompartment valamely vizsgált anyagnak az a része, amely egységes, de az anyag többi részétől elkülönült kinetikával rendelkezik. Jellemzője a benne található anyagmennyiség (q) és az anyag mozgását jellemző kinetikai állandó (k), ill. felezési idő ($t_{1/2} = \ln 2/k$).

Egy több kompartmentes rendszer lehet nyitott vagy zárt. Ha anyagáramlás csak a kompartmentek között jön létre, a rendszert zártnak nevezzük. Nyitott rendszer a környezetével is közlekedik és steady-state-ben az anyag mozgással párhuzamosan koncentráció változás nem következik be, azaz nincs nettó anyagvándorlás. A béka vázizom Ca-kompartmentalizációjára vonatko-

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18. között Sümegen elhangzott előadás.

zó kísérleteinkben az izom nyitott rendszerként viselkedik. Környezete a homogénnek tekinthető medium, ide, ill. innen történik a jelzett anyag leadása, ill. felvétele.

Egy N kompartmentből álló rendszerben az i-ik kompartment az alábbi módon reprezentálható:



ahol q_i a bentlévő anyagmennyiség, k_{ij} az i-edikből a j-edikbe történő transzport, k_{ji} az ellenkező irányú transzport, k_{i0} a rezervoir és a kompartment közti anyagtranszport sebességi állandója.

A kompartmentben levő anyagmennyiség időbeni változása:

$$\frac{dq_i}{dt} = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N} k_{ji} q_j - \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq i}}^{N} k_{ij} q_i - k_{i0} q_i . \qquad (1)$$

A rendszer minden tagjára felírva ezt az összefüggést, a kapott lineáris differenciál egyenletrendszer megoldása a következő:

$$q_i(t) = \sum_{j=1}^{N} B_{ij} \exp(-\lambda_j t) \qquad (i = 1, \ldots, N). \qquad (2)$$

Ahol λ_j-k a sebességi állandók mátrixának, $[k_{ij}]$-nek a sajátértékei és $B_j = [B_{1j}, \ldots, B_{Nj}]$ vektorok a megfelelő sajátvektorok.

Technikai okokból csak az izomban levő jelző összes mennyiségét tudjuk mérni, melyet q-val jelölve, időfüggése a következő módon írható:

$$q(t) = A_1 \exp(-\lambda_1 t) + A_2 \exp(-\lambda_2 t) + \ldots + A_N \exp(-\lambda_N t) \qquad (3)$$

ahol $A_i = \sum_{j=1}^{N} B_{ij}$.

Ezen q(t) ismeretében megfelelő matematikai eljárással meg tudjuk határozni a benne szereplő exponenciális tagok számát, azaz a komponensek számát, és az A, ill. λ paramétereket. Mivel ezen paraméterek nem közvetlenül jellemzik a kompartmenteket, hanem csak a kompartmentek jellemzőinek függvényei, ezért a továbbiakban kompartmentek helyett komponensekről beszélünk. A ^{45}Ca leadási kísérletekben a q(t) függvényt deszaturációs görbének nevezzük; a λ-k sebességi állandó és az A-k mennyiségi dimenziójúak.

Matematikai módszer

Az exponenciális komponensek meghatározására a Fourier-transzformációs módszert dolgoztuk ki, ennek FORTRAN nyelvű programját, mely a komponensek számát és paramétereit határozza meg R-20 és/vagy R-30 számítógépen futtattuk.

A módszer lényege: a $q(t) = \sum_{i=1}^{N} A_i \exp(-\lambda_i t)$ függvényt fel tudjuk írni egy Laplace-integrál alakban

$$q(t) = \int_0^\infty \exp(-\lambda t)\, g(\lambda)\, d\lambda, \tag{4}$$

ahol

$$g(\lambda) = \sum_{i=1}^{N} A_i\, \delta(\lambda - \lambda_i) \tag{5}$$

δ a Dirac-delta függvény, amely $\lambda = \lambda_i$ helyen ∞ és $\lambda \neq \lambda_i$ helyeken 0 értéket vesz fel, a számegyenesen vett integrálja 1. Ebből következik, hogy a $g(\lambda)$ elvileg olyan, hogy a λ_i értékeknél kimagasló csúcsokkal rendelkezik, a többi helyen pedig zéró. Minden valódi csúcs egy komponenst jelent, tehát a csúcsok száma megmutatja, hogy a függvény hány komponensre bontható. A csúcsok abszcisszái a keresett λ_i értékek és magasságai arányosak az A_i értékekkel. A számítási és mérési hibák miatt azonban több kis, ún. hibacsúcs is keletkezik, melyek közül a valódi csúcsok kiemelkednek.

A $g(\lambda)$ függvényt a kísérletileg mérhető $q(t)$ függvény segítségével a (4) egyenletből számíthatjuk ki, Fourier-transzformáció és annak inverze alkalmazásával. Bevezetve a $t = \exp(x)$ és $\lambda = \exp(-y)$ transzformációt, legyen

$$F(\mu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(x)\, q(\exp(x)) \exp(i\mu x)\, dx\,. \tag{6}$$

Az $\exp(x)q(\exp(x))$ függvény Fourier transzformáltja. K a komplex gamma függvény az $(1 + i\mu)$ helyen és $i = \sqrt{-1}$, ekkor $g(\exp(-y))$ az $\frac{F(\mu)}{K(\mu)}$ inverz Fourier transzformáltja:

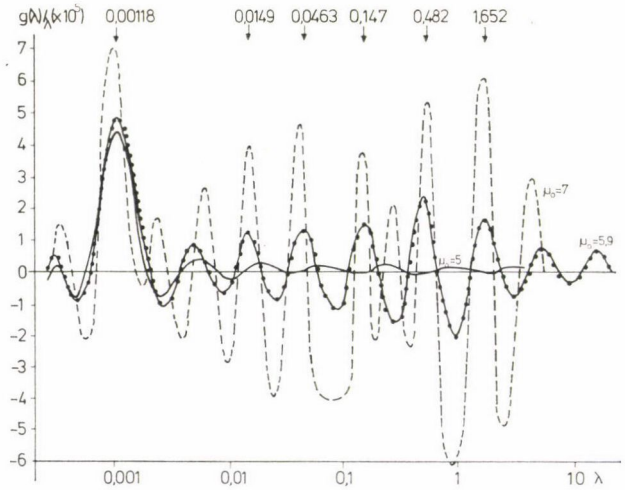
$$g(\exp(-y)) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{F(\mu)}{K(\mu)} \exp(-i\mu y)\, d\mu\,. \tag{7}$$

A numerikus megoldás során $F(\mu)$ és a $g(\exp(-y))$ -ban szereplő integrálokban nehézséget jelent, hogy $-\infty$-től ∞-ig terjed az integrációs határ, így a numerikus számításkor egy véges x_0 és μ_0 valós számot kell választani

úgy, hogy $-x_0$-tól $+x_0$-ig, ill. $-\mu_0$-tól $+\mu_0$-ig történő integrálásnál a levágásból keletkező hiba elég kicsi legyen. A számítógépes program a q(t), ill. az $\frac{F(\mu)}{K(\mu)}$ függvény vizsgálata alapján maga határozza meg az integrációs határokat. Mivel x szerint a $-\infty$-tól ∞-ig terjedő függvény értékeket kellene figyelembe vennünk, a t időre bevezetett helyettesítés miatt t-ben 0-tól ∞-ig terjedő mérési adatokra volna szükség.

Biológiai okokból azonban nem lehet olyan hosszú ideig mérni, mint amennyi az integrál érték megfelelő pontosságához szükséges, ezért az adatok extrapolálására van szükség, másrészt a mérési pontok nem ekvidisztánsak és ritkábban helyezkednek el, mint ahogy azt a numerikus integrálásoknál a megfelelő pontosság elérése megkövetelné, így a mérési adatok interpolációjára is szükség van.

A g függvény meghatározása után a program megkeresi annak lokális maximum helyeit, tehát a csúcsok helyeit és kiírja azokat. Ezután már a csúcsok magasságai alapján meg tudjuk becsülni a valós csúcsokat és ezek abszcisszái lesznek a λ_i értékek. Ha a számítási hibák és az integrál határok levágása miatt a hibacsúcsok nagyok, a μ_0 érték változtatása a hibacsúcsok helyét megváltoztatja. A komponenseknek megfelelő valódi csúcsok helye bizonyos hibaforráson belül változatlan marad. Ezzel ellenőrizhetjük a valódi csúcsok helyességét. Az 1. ábrán egy kísérleti görbe értékelésénél kapott $g(\lambda)/\lambda$ függvény látható $\mu_0 = 5$, $\mu_0 = 5,9$ és $\mu_0 = 7$-re.



1. ábra. 60 perces ekvilibrálást követő deszaturációs görbéből számított $g(\lambda)/\lambda$ függvény $\mu_0 = 5$, $\mu_0 = 5,9$ és $\mu_0 = 7$ esetén. A nyíllal jelzett csúcsok a valódi csúcsok helyét jelzik, az adott λ helyeken. A $\mu_0 = 5$-höz tartozó függvény jól mutatja az integrálási határ levágásából származó hibát. A $\mu_0 = 5,9$ és $\mu_0 = 7$-re számított függvényeket összehasonlítva a valódi (helyileg nem változó) és hibacsúcsok (melyek helye és száma μ_0-tól is függ) elkülöníthetők

Ha meghatároztuk a λ_i értékeket és behelyettesítjük a (3) egyenletbe, figyelembe véve a mérési értékeket, egy olyan lineáris egyenletrendszert kapunk, ahol az ismeretlenek, azaz az A_i-k száma a komponensek számával, az egyenletek száma a mérési pontok számával egyezik meg. Az egyenletrendszer megoldását a túlhatározottságán kívül megnehezíti, hogy minden tagja hibát tartalmaz. Az egyenletrendszert megoldva A_i-re, megkapjuk a deszaturációs görbék amplitudóit.

A számításokhoz szükséges gépidő R—30-as számítógépen 25—30 perc.

A Fourier-transzformációs módszer előnye más függvény illesztési eljárásokkal szemben, hogy választ ad a komponensek számára, elvileg végtelen számú komponensből álló görbét képes felbontani. A paraméterekre kezdőértékek megadását nem kívánja meg, figyelembe veszi minden egyes paraméter kiszámításánál az összes mérési adatokat. A számítógépes program működésének helyességét 3, 5, és 6 komponenseket tartalmazó teszt adatsorozatokkal ellenőriztük, ahol a legközelebb eső komponensekre a $\frac{\lambda_{i+1}}{\lambda_i} = 2{,}25$ volt. A teszt függvények értékei $\pm 10\%$-os véletlenszerű hibával terhelve a paramétereket $\pm 3\%$-tól $\pm 6\%$-ig terjedő hibával kaptuk vissza.

Deszaturációs görbék analízise

Kísérleteinkben a béka vázizom ^{45}Ca-deszaturációs görbéjét mértük különböző izmokon és különböző ideig tartó inkubálási időt alkalmaztunk. Hasonló kísérletekben általában az extracelluláris tér és a szövetet tartó rendszerhez tapadó aktivitás zavaró hatása adja a legnagyobb problémát. Ez az aktivitás izmonként eléggé változó és nagysága ismeretlen. A nehézségek kiküszöbölésére különböző módszereket alkalmaznak, ilyen, hogy a kezdeti mosási értékeket nem veszik figyelembe, vagy úgy, hogy mossák és a kezdeti mosási értékeket nem határozzák meg, vagy úgy, hogy meghatározzák, de különböző mértékben veszik figyelembe. (Az extrapolálás nem a 0., hanem a 15. vagy 30. másodpercben történik.) Ehelyett mi azt láttuk jónak, hogy minden esetben pontosan megmérjük és analízis után értékeljük a szerepét. A matematikai számításokat megkönnyítette volna a mintavételi idő ekvidisztanciája, azonban a gyors komponensek kimutatása céljából a mérési pontokat sűrűbben kellett felvenni az aktivitás kimosásának kezdetén. Ennek következtében a deszaturációs görbék értékeit 0-nál, 10., 30. másodpercnél 1., 2., 4., 10. percnél, a továbbiakban 10 percenként határoztuk meg.

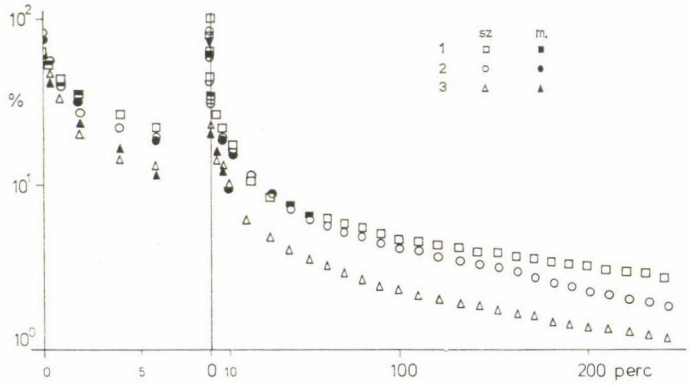
Az izom működésére vonatkozó más jellegű kísérletek arra utalnak, hogy a La bizonyos kompartmentekre specifikus hatással van, a Ca-mal mutatott kémiai hasonlóság alapján. A steady-state-ben mérhető kinetikai változások, a kompartment rendszer paramétereinek megváltozása összevetve a fiziológiai kísérletek eredményeivel, ötleteket adhat a kompartment-

1. táblázat

komp. szám	I.	II.	III.	átlag
1.	91,3	114,8	130,8	112,3
2.	32,5	34,3	36,8	34,5
3.	11,1	10,9	12,8	11,5
4.	3,75	3,42	4,4	3,86
5.	1,26	1,21	1,48	1,32
6.	0,41	0,42	0,47	0,43

rendszer belső szerkezetére vonatkozóan. Így bizonyos kísérleteket La jelenlétében s távollétében is elvégeztünk.

A görbéket a számítógépes programmal elemezve minden esetben 6 komponenst kaptunk. Az 1. táblázat 3 db 60 perces inkubálást követő leadási görbe sebességi állandóinak megfelelő átlagos tartózkodási időket tünteti fel.



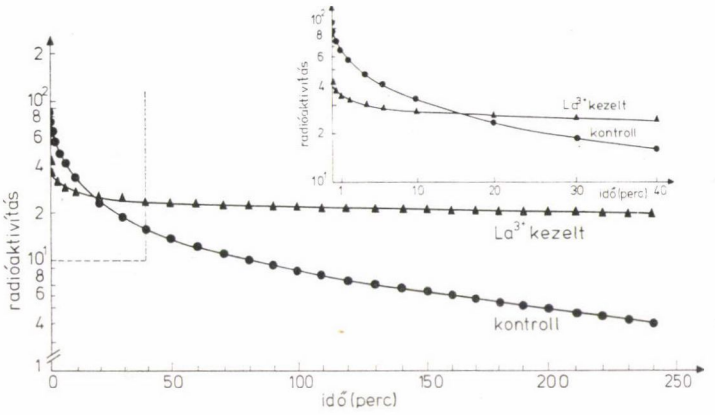
2. ábra. A három görbe a 60 perces inkubálási időhöz tartozó deszaturációs görbék. Az üres jelek a meghatározott paraméterekkel számított görbe értékeit jelölik. A telt jelek a mérés során meghatározott radioaktivitást jelölik a kimosási idő függvényében

A 2. ábrán látható a számított paraméterek segítségével meghatározott görbék illeszkedése a deszaturációs görbékre 60 perces inkubálási idő esetén.

A 2. táblázatban különböző idejű ekvilibrálási időt követő deszaturációs görbék $t_{1/2}$-jei láthatók, valamint a La jelenlétében számított hasonló érték.

2. táblázat

komp. szám	5′	60′	120′	La^{3+}
1.	128,8	139,3	151,7	501
2.	46,2	35,9	40,7	47,4
3.	15,2	12,5	13,7	15,5
4.	4,7	4,1	4,57	4,48
5.	1,45	1,35	1,47	1,45
6.	0,46	0,44	0,45	0,43



3. ábra. A La jelenlétében és távollétében felvett deszaturációs görbék 60 perces inkubálás után. A függőleges tengelyen ábrázoltuk az izomban levő radioaktivitást (relatív %) a kimosási idő függvényében. A jobb felső inzert a görbe kezdeti szakaszát (– – – –) ábrázolja kinagyítva

Külön figyelmet érdemel, hogy a La távollétében a különböző idejű felvételt követő leadásra jellemző $t_{1/2}$-ek függetlenek az inkubáció idejétől, ami alapvetően támasztja alá modellünk és matematikai eljárásunk helyességét.

A La jelenlétében végzett kísérletekből kapott görbékből a 60 perces inkubálási idejűt analizáltuk. Itt az eltérés az első komponens λ paramétereiben jelentkezett, amelyet az intracelluláris tér megfelelőjének tételezünk fel, és ezért esetleg a La specifikus hatása a felelős. A 3. ábrán látható a 60 perces inkubálási idejű La távollétében és jelenlétében felvett deszaturációs görbék közti különbség. Az adatok alapján nagyobb pontosságú mérések esetén remény van arra, hogy a 2. komponensben mutatkozó „gyengébb" La effektus szignifikanciája eldönthető.

IRODALOM

BROWNELL, G. L., CALLAHAN, A. B.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **108,** 172 (1963).

GARDNER, D. G., GARDNER, J. C., LAUSH, G., MEINKE, W. W.: J. Chem. Physiol. **31,** 978 (1959).

GARDNER, D. G.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **108,** 195 (1963).

JACQUEZ, J. A. in: Compartmental analysis in biology and medicine. Elsevier, Amsterdam (1972).

KÓNYA, L., KÖVÉR, A.: Symp. Biol. Hung. p. 17 (1974).

MEDGYESSY, P.: Decomposition of superpositions of density functions and discrete distribution. Akadémiai Kiadó, Budapest (1977).

PIZER, S. M., ASHARL, A. B., CALLAHAN, A. B., BROWNEL, G. L.: in: Concepts and Models of Biomathematics, ed: Heinmets, F. Marcel Dekker, New York (1969).

RALSTON, A.: Bevezetés a numerikus analízisbe. Műszaki Könyvkiadó, Budapest (1973).

A KOFFEIN KONTRAKTÚRÁK PARAMÉTEREIT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA BÉKA VÁZIZMON*

KÓNYA LÁSZLÓ

Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma

Ismeretes, hogy a koffein, küszöb koncentráció (3 mM) fölött alkalmazva, depolarizáció nélkül vált ki kontraktúrát béka vázizmon (AXELSSON és THESLEFF 1958). A koffein hatására kifejlődő kontraktúra paraméterei (amplitudó, időtartam) eltérőek lehetnek a kísérleti körülményektől függően. Béka egyetlen izomrostján pl. a koffein hatására kifejlődő tónusfokozódás, másodperc nagyságrendű periódusonként rendszertelenül változik (LÜTTGAU és OETLIKER 1968). Ugyancsak több fázisú a rák izomrostján regisztrálható kontraktúra (ZACHACHARA és mtsai 1968).

A több száz rostot tartalmazó m. sartoriuson koffein kontraktúra szisztematikusan megjelenő gyors és lassú szakaszát figyelték meg BIANCHI és mtsai (1967). A koffein kontraktúrának két fázisát tudták elkülöníteni m. sartoriuson MATSUSHIMA és mtsai (1962), valamint fizosztigmin hatására PAGALA (1974). Saját korábbi kísérleteinkben béka m. semitendinosusából készített, kb. 100—200 rostot tartalmazó preparátumon normál Ringerben a koffein kontraktúra mindig két fázisúnak bizonyult (KÓNYA és mtsai 1978/a).

Különböző szerzők véleménye egybehangzó arra vonatkozóan (l. pl. BIANCHI és BOLTON 1967), hogy a koffein az izomban eltérő támadásponton hat, s a fázisok elkülönülése ezzel hozható kapcsolatba.

A gyors vagy első fázis kifejlődéséért feltehetően az izomrost felszíni struktúráiban (szarkolemma és T-tubulus membrán), vagy annak közelében lokalizálódó koffein-kötő hely felelős. Erre utal a gyors fázis kifejlődési sebessége mellett (10 másodpercen belül) az a megfigyelés, hogy a koffein a junkcionális elemekben gazdag szarkoplazmatikus retikulum (SR) preparátumon fokozott Ca-felszabadító hatással rendelkezik (FAIRHURST, 1975), valamint, hogy kötődése a fragmentált SR-en mágneses magrezonancia spektroszkópiával kimutatható (KÓNYA és mtsai 1978 /b).

A második fázissal egyidőben az SR duzzadását, majd membránjának sérülését lehetett megfigyelni (UHRIK és ZACHAROVA 1968, HUDDART 1972). Feltételezhető, hogy ilyenkor a koffein hatására az SR-ből kiszabaduló Ca hozza létre az izom erőteljes kontraktúráját.

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

A koffein támadáspontjára vonatkozó feltételezéseink ellenőrzése és a depolarizációval (magas K tartalmú oldat) létrehozható kontraktúrával való összefüggésének tanulmányozására vizsgáltuk K-depolarizáció, valamint alacsony Ca-tartalmú, ill. La tartalmú oldat hatását a koffein kontraktúra paramétereire.

A kísérletekhez kecskebéka *(Rana esculenta)* m. semirendinosusából 100—200 rostot (kb. 20—40 mg) tartalmazó preparátumot készítettünk. Preparálás után egy órán keresztül n–Ringer oldatban pihentettük, majd Sartorius edényben függőleges helyzetben felkötöttük. Az izmok felső végét torziós irókarhoz, alsó végét Sartorius edény üvegkampójához rögzítettük. A mechanikus válasz regisztrálása változtatható sebességű kimográf segítségével kormozott papíron történt. Feszitésmentes állapotban meghatároztuk az izmok nyugalmi hosszát (l_0), majd a kísérlet megkezdése előtt az izmokat 30%-kal megnyújtottuk (l_f). A regisztrálást állandó kar-arány (1:3) mellett végeztük, s minden izom felkötésekor a kitérésnek megfelelő feszülés változását és az összehuzódás amplitudóját kalibráltuk. A folyadékcserét Sartorius edényben ötszörös térfogatú folyadékkal, fecskendő segítségével végeztük.

Kísérleteinknél analitikai tisztaságú Reanal (Budapest) vegyszereket használtunk. Különböző oldataink összetételét az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat

Oldataink összetétele
(Az egyes anyagok koncentrációját mM/l-ben adjuk meg)

	NR	*izo-K*	*NS*	*KS*
Na^+	117	—	157,5	—
K^+	2,5	119,5	2,5	160
Ca^{2+}	1	1	8	8
Cl^-	121,5	121,5	—	—
SO_4^{2-}	—	—	88	88
Trisz	5	5	5	5

Megjegyzés:

A preparáláshoz használt NR 35 mg/l d-tubocurarét tartalmazott. SO_4^{2-} tartalmú oldatok előállításához 10 mM-os $CaSO_4$ törzsoldatból indultunk ki. 10 mM koffein tartalmú oldatot 80 mM-os töménységű koffein törzsoldatból kiindulva mindig frissen készítettünk.

A Ca-mentesítés előrehaladását 30 percenként ismételt K-kontraktúrával (20 sec) ellenőriztük. A közbenső időben a megfelelő inkubáló oldatot 5 percenként cseréltük.

Az ábrákat kormozott papíron készült regisztrátumokról másoltuk és a különböző hatások bemutatására jellemző görbét választottuk.

K-depolarizáció hatása

Penetráló (Cl^-) anion jelenlétében K-depolarizáció alatt az izom duzzad, s a koffein hatása a depolarizáció tartamával arányosan csökken mindkét fázis paramétereire. A depolarizációt ezért nem penetráló (SO_4^{2-}) anion jelenlétében hoztuk létre különböző ideig (30—120 perc). Ilyen körülmények között a koffein kontraktúra két fázisa között jól megfigyelhető részleges relaxáció jelentkezett, ennek nagysága azonban változékony volt, nem mutatott közvetlen összefüggést a depolarizáció időtartamával, és lényegében nem befolyásolta a kontraktúra fázisainak paramétereit.

Ca-elvonás hatása

Frank (1978) újabb adataival egyezésben 0 Ca és 0,5 mM EGTA tartalmú oldatban inkubálva az izmokat, a Ca-elvonás hatása a K-kontraktúrákra viszonylag lassan fejlődött ki. Ca-elvonást követően különböző időkben alkalmazva a koffeint, az első fázis amplitudójának jelentős csökkenését és a második fázis kifejlődésének lelassulását figyeltük meg (1. ábra).

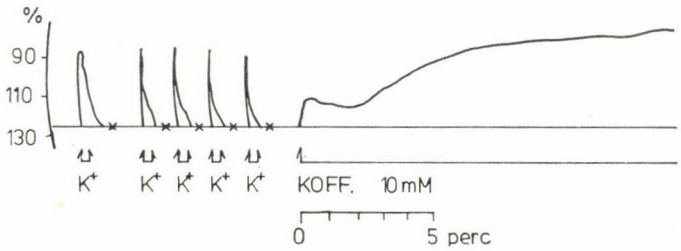
Ha a Ca-elvonást négy óránál hosszabb ideig folytattuk, a K-depolarizáció hatására kialakuló kontraktúra csaknem teljesen megszűnt (elektromechanikus kuplung (EMK), block). Az ilyenkor alkalmazott 10 mM koffein hatására még jelentős, a kontroll amplitudójának 30—40%-át kitevő első fázist tudtunk megfigyelni (2. ábra).

Hasonló körülmények között Cl^- jelenlétében alkalmazott koffein hatására kis amplitudójú elhúzódó első fázist figyeltünk meg, míg a második fázis teljesen elmaradt (3. ábra).

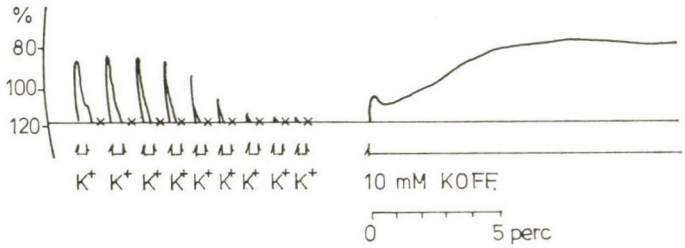
La^{3+} hatása

Két óráig tartó Ca-elvonást követően EGTA és Ca-mentes oldatban 0,2 mM La-t alkalmaztunk. La jelenlétében a K hatására kifejlődő kontraktúra amplitudója nőtt; ugyancsak nőtt a koffein kontraktúra első fázisának amplitudója és a második fázis kifejlődési sebessége (4. ábra).

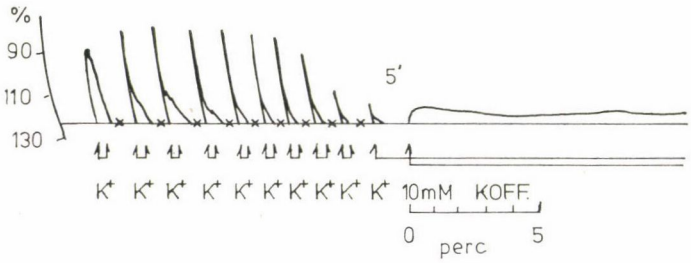
Normál (Cl^--ot és 1,8 mM Ca-ot tartalmazó) Ringerben 1 mM La^{3+} jelenlétében a K-kontraktúra kifejlődési sebessége és amplitudója csökkent. Az ilyen körülmények között alkalmazott koffein hatására az első fázis gyakorlatilag változatlanul kifejlődött, ezt követően az izom viszont hosszú ideig részlegesen relaxált állapotban maradt, és a második fázis kifejlődése elhúzódott (5. ábra). A részleges relaxáció alatt 0,5-1 perces periódussal jellegzetes tónusváltozások (lassú, kis amplitudójú oszcillációk) voltak megfigyelhetők.



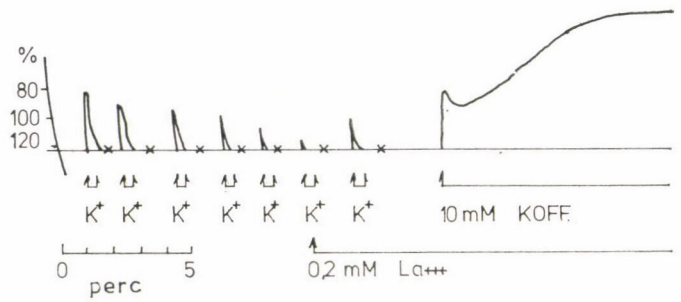
1. ábra. **Koffein kontraktúra Ca-mentes, EGTA tartalmú oldatban 2,5 óráig inkubált izmon. Az ordinátán az izom rövidülését a nyugalmi hossz százalékában tüntettük fel.**



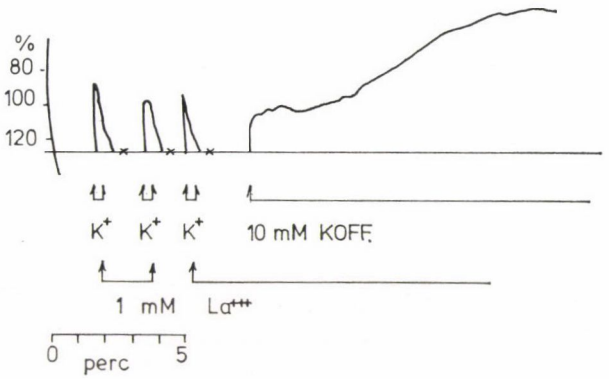
2. ábra. **Koffein kontraktúra Ca-mentes, EGTA tartalmú oldatban 4 óráig inkubált izmon**



3. ábra. **10 mM koffein hatása Ca-elvonást követően Ca-mentes izo-K oldatban 5 percig depolarizált izmon.**



4. ábra. **0,2 mM La hatása K-depolarizációval és 10 mM koffeinnel kiváltott kontraktúrára (részleges Ca-mentesítést követően) 2,5 óráig Ca-mentes oldatban inkubált izmon**



5. ábra. 1 mM La jelenlétének hatása NR-ben a K-depolarizációval és 10 mM koffeinnel kiváltható kontraktúrára

Mai ismereteink szerint az izomkontraktúra nagysága a mioplazma Ca-koncentrációjával arányos. Az izom tónus-, ill. hosszváltozásait a Ca-koncentráció időbeli változásának jelzéseként értékelhetjük. Lényegében elfogadottnak tekinthető, hogy az extracelluláris térből származó Ca közvetlen hatása a kontraktilis rendszerre elhanyagolható.

Ezek értelmében a kísérleteinkben leírt izotóniás kontrakciós és relaxációs folyamatokat az SR-ből történő Ca-felszabadulás és reakkumuláció eredményének tekinthetjük. A kontrakció kifejlődése során a SR-ből felszabaduló Ca^{2+} hatására a myofibrilláris térben a Ca-szint megnő. A relaxáció a Ca-felszabadulás csökkenésével párhuzamosan a reakkumuláció előrehaladását jelzi.

A szulfát jelenlétében alkalmazott K-depolarizáció alatt a koffein kontraktúra első fázisa után minden esetben részleges relaxációt tudtunk megfigyelni. A jelenség feltehetően arra utal, hogy depolarizáció alatt a SR-ből történő Ca-felszabadulás és reakkumuláció nyugalmi szintje megnő, és a depolarizációtól függetlenül kiváltott Ca-szint fokozódás — ez esetben koffein hatására — gyorsabban lezajlik. Az izmon tehát ilyenkor egy „relaxációs tendencia" figyelhető meg. Ennek kapcsolata az EMK folyamataival további tisztázást igényel.

A Ca szerepe az EMK folyamatainak szabályozásában több oldalról vitatott. Részben bizonyítottnak tekinthetjük Frank és Bianchi kísérletei, valamint Bianchi elmélete (1969) alapján, hogy a T-tubulusok depolarizációja és a SR-ból történő Ca-felszabadulás között a funkcionális kapcsolatot a T-TC junkcióra lokalizálódó Ca biztosítja. Ha ennek mennyiségét Ca-mentes oldatban történő inkubálással és komplexképző alkalmazásával csökkentjük, úgy EMK block fejlődik ki. Ez a block különböző 2 és 3 vegyértékű kationokkal felfüggeszthető (Frank 1960, 1962, 1978). Az ismertetett kísérleteinkben 0,2 mM La^{3+} is képes volt a blockot felfüggeszteni.

Ca-elvonással nemcsak a K-kontraktúra amplitudóját, de a koffein kontraktúra mindkét fázisának a sebességét is csökkenteni lehetett. Ez a megfigyelés amellett szól, hogy az ún. kuplung Ca^{2+}mennyisége ilyen módon csökkenthető (depolarizációra kialakuló kontrakciós block). A koffein kontraktúra fázisainak amplitudó csökkenése a koffein gyors hatásának kifejlődésében szerepet játszó Ca-nak, és az SR Ca-nak a csökkenését (második fázis) egyaránt bizonyítani látszik. Feltehető, hogy a Ca-elvonás az izom különböző Ca-frakcióit érinti, s ezáltal gyengíti a kontrakciók nagyságát.

1 mM La jelenlétében a K kontraktúra csökkenése a La^{3+}membrán-stabilizáló hatására utal. Változatlan nagyságú depolarizáció hatására a kontraktúra kifejlődési sebessége, ezzel párhuzamosan feltehetően a Ca-felszabadulás sebessége is csökken. A valószínűleg változatlan sebességű Ca-reakkumuláció eredménye, hogy az izomkontraktúrában egy plato szakasz fejlődik ki. A depolarizáció hatásával ellentétben a koffein hatás gyors fázisa változatlan marad. Ez arra utal, hogy La^{3+}jelenléte a gyors fázis kifejlődéséért felelős Ca mozgást nem befolyásolja. Az ezt követően megfigyelhető La^{3+} hatás értékelése nehezebb. Az előzőek szerint a Ca-felszabadulás és reakkumuláció ütemének egy labilis egyensúlya alakulhat ki. Feltehetően az adott körülmények között a La^{3+} nem jut a SR közelébe és a T-tubulus membránjának stabilizálásán keresztül mintegy közvetve hat. Ennek módja további vizsgálatot igényel.

IRODALOM

Axelsson, J., Thesleff, S.: Acta Physiol. Scand. **44,** 55 (1958).
Bianchi, C. P., Bolton, T. C.: J. Pharmacol. exptl. Therapeutics, **157,** 388 (1967).
Bianchi, C. P.: Fedn. Proc. **28,** 1624 (1969).
Frank, G. B.: J. Physiol. London **151,** 518 (1960).
Frank, G. B.: J. Physiol. London **163,** 354 (1962).
Frank, G. B.: Canad. J. Physiol. Pharmacol. **56,** (1978).
Huddart, D.: Comp. Biochem. Physiol. **43 A,** 369 (1972).
Kónya, L., Kövér, A.: Symp. Biol. Hung. **17,** 105 (1974).
Kónya, L., Jóna, I., Kövér, A., Aradi, F.: Acta Biol. Acad. Sci. Hung. **29,** 129 (1978/a).
Kónya, L., Kövér, A., Jóna, I., Szabolcs, M., Aradi, F.: Proc. 17th Eur. Conf. on Muscle and Motility, Warszawa, No. 10. p. 18 (1978/b).
Lüttgau, H. C., Oetliker, H.: J. Physiol. London, **194,** 51 (1968).
Matsushima, T., Fujino, M., Nagai, T.: Jap. J. Physiol. **12,** 106 (1962).
Pagala, M. K. D.: Am. J. Physiol. **226,** 1209 (1974).
Uhrik, B., Zacharova, D.: Physiol. Bohemoslov. **17,** 118 (1968).
Zacharova, D., Zachar, J.: Cs. fysiol. **17,** 47 (1968).

A VÖRÖSVÉRTEST ALAK VIZSGÁLATÁNAK NÉHÁNY ASPEKTUSA KONZERVÁLT ÉS KONZERVÁLT-REJUVENÁLT VÉRMINTÁKON*

LACZKÓ JENŐ és VARGA SÁNDOR

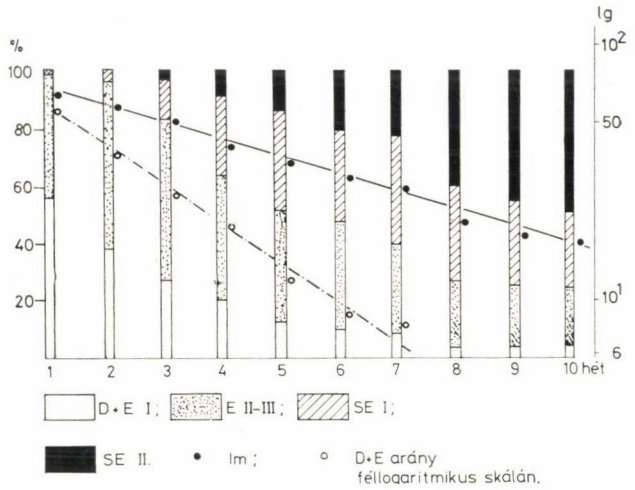
Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma

A discocyta echinocyta transzformáció (D—E tr) vizsgálata a konzerválási ártalom fokának megítélésére

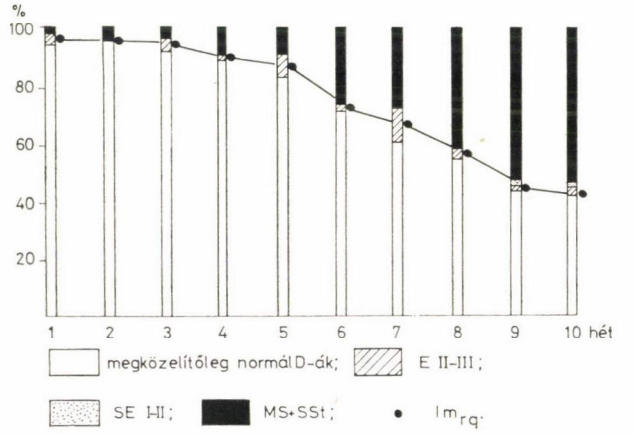
A transzfúziós célra szokásos módokon (ACD, CPD közegben 4 °C-on) konzervált vérben a vörösvértestek (vvt-ek) fokozatosan jellegzetes alaki változáson esnek át. Ez a folyamat a D—E tr vagy más néven discoid-spheroid átalakulás. Az így kialakuló vvt populáció alakilag heterogén, a tárolási idő előrehaladtával a morfológiai kép fokozatosan tolódik „jobbra": nő az átalakulás előrehaladottabb stádiumaiban levő alakok aránya. A sphero-echinocyta (SE) II alakok 2—3 hét tárolás után jelennek meg, de D-ák még 7 hét után, E I formák pedig 11—12 hét elteltével is találhatók (LACZKÓ és mtsai 1979). Az alakváltozás alakulásának számszerű jellemzésére mind fénymikroszkópos (FM-os), mind pásztázó elektronmikroszkópos (PEM-os) kiértékelésnél jól használható a morfológiai index (Im) (GÁRDOS és mtsai 1966). A PEM-os kiértékelés pontossága érdekében ajánlatos olyan preparátumkészítési eljárást használni, amely a tárgytartón egyenletes sejteloszlást ad, s a sejtek jó tapadását biztosítva kiküszöböli a vízteleníté-szárítás során az esetleges szelektív sejtleválást. Erre igen alkalmas a SANDERS és mtsai (1975) által leírt poly-L-lysines fölragasztás.

Az Im megadásánál bizonyos problémát jelent az, hogy az alakváltozások egymást követő stádiuma közötti határ nem éles, így vizsgálónként, ill. munkacsoportonként a besorolás kritériumaiban lehetnek eltérések. Ebből adódik a módszer szemikvantitatív jellege. A kísérleti eredmények értékelésénél így pontos információt jelent egy munkacsoporton belül, problémásabb azonban a különböző munkacsoportok által publikált adatok összevetése. Az Im csökkenése és a bikonkáv (D + EI) formák arányának csökkenése a konzervált vérben — a konzerválási idő függvényében — jellegében azonos (1. ábra), ezért gyors FM-os kiértékelésre felhasználható a viszonylag könnyen identifikálható bikonkáv alakok arányának meghatározása.

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

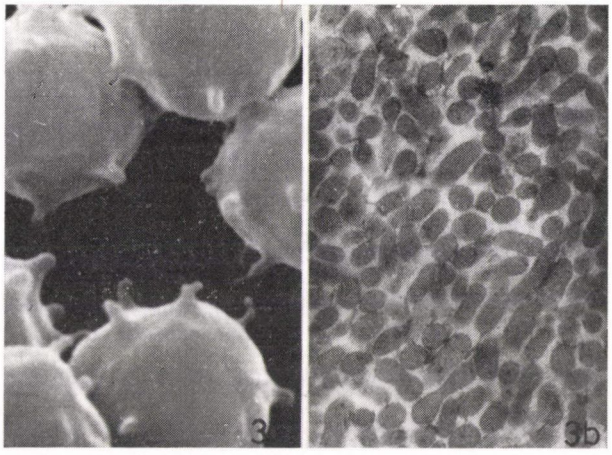


1. ábra. A D—E tr alakulása CPD-n konzervált vérben



2. ábra. A morfológiai kép alakulása 1 térf. vérnek 1 térf. PBS-ben oldott 60 mM Adenozinnal 37 °C-on 4 órán keresztül végzett inkubálás után

A konzerválási ártalom egyik, valószínűleg meghatározó jellegű következménye az, hogy a vvt-ek az alakváltozás előrehaladott (SE) stádiumaiba jutva membránt vesztenek. A membránveszteség az elvékonyodott tüskék csúcsának lefűződésével (3a. ábra) vezikulák, mielin formák képződésével jön létre (Bessis és Mandon 1972, Weed és mtsai 1974). Lutz és mtsai (1977) 37 °C-on történő ATP deplécióval járó vezikulaképződés esetében a vezikulákban az integráns membránfehérjéket olyan arányban találták meg mint az intakt membránban, míg a kolineszteráz frakció bedúsult. ACD-re levett, egyéb alakelemektől mentesített plazmával 9 hétig 4 °C-on tárolt vvt-ekből



3. ábra. a) Vezikulációra utaló befűződések a SE-ák tövisein. b) Vezikulák transzmissziós elektronmikroszkópos képe

származó vezikulák (3b. ábra) egy része megnyúlt (90—100×250—260 nm), középen kissé befűződött, egység membránnal határolt, hemoglobint tartalmaz. A fokozott kolineszteráz aktivitás is kimutatható volt. A vezikulák pontosabb mennyiségi és minőségi jellemzőit, ezek időbeli alakulását, alaki és egyéb változásokhoz való viszonyait a konzervált vérben behatóbb vizsgálatokkal közelíthetjük meg.

A D—E tr előrehaladása a konzervált vvt-ek morfológiai öregedését jelenti, mértéke viszonylag közvetlenül jelzi a membránt vesztett sejtek arányát. A morfológiai jellemzők meghatározása így a konzerválási ártalom vizsgálatának egyik fontos módszere. LONGSTER és mtsai (1972) felhasználták konzerváló folyadékok összehasonlító vizsgálatában.

A D—E tr-t kiváltó tényezők. A sejtmembrán szerepe

A D—E tr régóta ismert és tanulmányozott jelenség. Kísérletekben számos tényező echinocytogén hatását kimutatták és vizsgálták. A D—E tr kiváltható ATP deplécióval (NAKAO és mtsai 1961, GÁRDOS és mtsai 1966, FÉO és LEBLOND 1974), anionos vagy nem ionos amfifil anyagokkal (DEUTICKE 1968), inkubált plazmával (BESSIS és BRECHER 1971, FÉO 1972, LICHTMAN és MARINETTI 1972), „üveg effektussal", valamint a szuszpendáló közeg pH-jának emelésével (PONDER és PONDER 1962, BESSIS és PRENANT 1972, WEED és CHAILLEY 1973). A fiziológiásan igen alacsony intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedésének alakváltozást kiváltó hatását sok oldalról vizsgálták (WEED és mtsai 1969; WEED és CHAILLEY 1973; WHITE 1976), de a Ca^{2+} (és más divalens kationok) pontosabb hatásmódjának, egyéb tényezőkkel való kapcso-

latának, a Ca^{2+} és a vvt membrán kölcsönhatásainak tisztázásában éppen magyar kutatók munkái alapvetőek (Szász 1970, Szász és mtsai 1970, Szász és mtsai 1978, Gárdos és mtsai 1979).

Az intakt vvt-ek D—E tr-ja során létrejövő alakokhoz hasonló formák ghostokon is megfigyelhetők. Mircevová (1974) konzervált vvt-ekből ATP jelenlétében készített ghostokat discoid, míg az ATP mentes közegben preparáltakat crenált formájúnak találta. Palek és mtsai (1974) ghostokon vizsgálva a Ca^{2+}, Mg^{2+} és ATP hatását arra következtettek, hogy az alakváltozásért felelős hatások a membrán belső fehérjekomponensein érvényesülnek. A ghostok ATP függő alakváltozásait demonstrálták Sheetz és Singer (1977), ill. az alakváltozás és a spektrin 2 foszforilációja közötti korrelációt Birchmeier és Singer (1977). Saját vizsgálatainkban Sheetz és Singer (1977) módszerével 3—6 hetes vérkonzervekből visszazárt ghostokat készítve crenált alakokat kaptunk, melyek Adenozin tartalmú közegben 37 °C-on történt inkubálás után sima felszínű, általában monokonkáv formákká alakultak. Ez utóbbi formákat kaptuk, ha előzetesen rejuvenált vvt-ekből indultunk ki.

Ma már elég egyértelmű, hogy a vvt-ek alakváltozásai (nem kóros hemoglobin szerkezet esetében) a vvt membrán konformáció változásaival magyarázhatók. Ennek mechanizmusában a Sheetz és Singer (1974) féle hipotetikus modell továbbfejlesztésének eredményeként a pontosabb molekuláris részjelenségek szerepe is kezd tisztázódni (Szász és mtsai 1978, Gárdos és mtsai 1979).

Az experimentálisan létrehozott D—E tr-ért felelős tényezők egy része a konzervált vérben is kimutatható: ATP és 2—3 DPG szint csökkenése, lizolecitin keletkezése, a membrán passzív Ca^{2+} permeabilitásának fokozódása. Összefüggésük az alakváltozással azonban részben más jellegűnek látszik: az ATP szint csökkenését a D—E tr a 37 °C-on történő depléciókor megkésve követi, a konzervált vérben megelőzi (Szász 1970), a plazma echinocytogén hatása csak hosszabb tárolás után mutatható ki (Lichtman és Marinetti 1972, Laczkó és mtsai 1979), a citrátos közeg a Ca^{2+} felvételt megakadályozza, de csökkenti a membrán Ca^{2+} affinitását (Szász és mtsai 1978). Jelenleg tehát a konzervált vvt-ek morfológiájának vizsgálatából a sejtek funkcionális jellemzőire pontosan következtetni még nem tudnak. Ez aláhúzza a komplex vizsgálatok fontosságát, melyekben azonban a morfológiai jellemzők tanulmányozása, épp a PEM-os módszerek adta lehetőségek kihasználásával, nagyobb szerepet kaphat.

A rejuvenálás és a D—E tr reverzibilitása

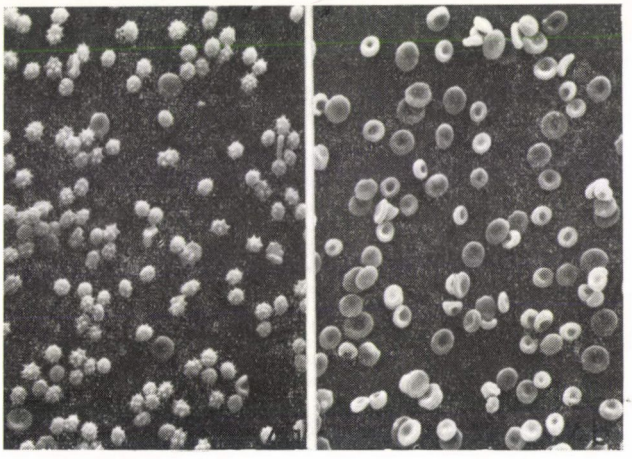
A konzervált vvt-ek rejuvenálására vonatkozó vizsgálatok kiindulópontja Nakao és mtsai (1959) azon megfigyelése volt, hogy nukleozid tartalmú közegekkel inkubált, előzetesen hosszabb ideig konzervált vvt-ek ATP szint-

je visszaállítható, s eközben a sejtek tüskés formákból konkáv formákba alakulnak. A rejuvenálási eljárások a konzervált vvt-ek más élettani jellemzőire is kedvező hatásúaknak bizonyultak. Ez a gyakorlati alkalmazás lehetőségeit fölvetette: a vvt-ek transzfuzióra való alkalmasságának javítását előzetes rejuvenálással (BARTLETT 1974), a konzerv vérek gazdaságosabb felhasználását a lejárt vérek rejuvenálás utáni fagyasztva tárolásával (VALERI és ZAROULIS 1972). A rejuvenálás morfológiai hatását általában az E alakok arányának csökkenése alapján ítélik meg, és a reverzió jellemzésére az Im-et használják (USRY és mtsai 1975), jóllehet már NAKAO és mtsai (1959) közleménye sem mint normál D-at jellemzi a konkáv formákba revertált sejteket. Más szerzők is megfigyelték, hogy a konzerválási idő előrehaladtával a rejuvenálás részben kisebb átmérőjű vvt-eket eredményez (SZÁSZ és mtsai 1968, WEED és mtsai 1974).

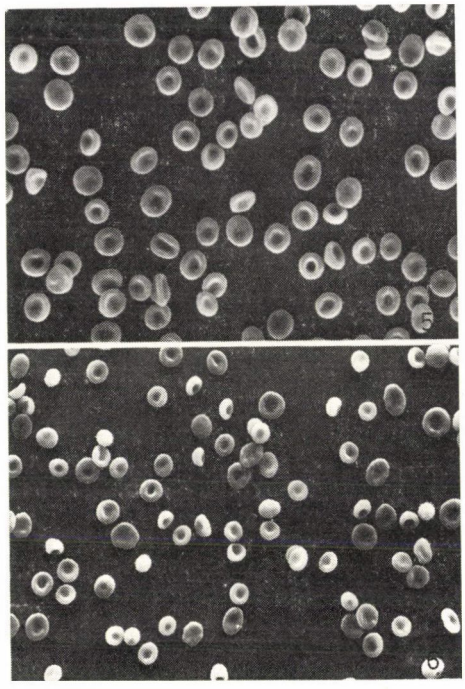
a) *A rejuvenált vvt-ek morfológiája: a reverzió szintje és minősége*

A konzervált sejtek rejuvenálását erőteljes kezeléssel végezve (30 mM Adenozin, 4 óra, 37 °C) az E alakok aránya alacsonyra vihető le (4. ábra) és rejuvenálás utáni arányuk a tárolási idővel nem nőtt (2. ábra). Az E-ák és SE-ák igen nagy része tehát ilyen körülmények között reverzibilis abban az értelemben, hogy konkáv formákba alakulásra, decrenációra képes. Az E—SE formák arányának csökkenését a *reverzió szintje*ként javasoljuk definiálni. (Az Im megadásakor indokolt jelölni, hogy a reverzió szintjére értelmezzük: Im_{rl} — level of reversion.)

A reverziószint meghatározása megtévesztő is lehet, mert mint esetünkben azt sugallhatja, hogy az adott rejuvenálás a tárolási időtől függetlenül azonosan kedvező morfológiájú vvt-eket eredményez. Ha azonban összehasonlítunk



4. ábra. 7 hétig CPD-n konzervált (a) és Adenozinos inkubálással rejuvenált (b) vvt-ek PEM-os képe



5. ábra. CPD-re frissen levett vér vvt-jeinek PEM-os képe
6. ábra. 9 hétig CPD-n tárolás után Adenozinos inkubálással rejuvenált vvt-ek PEM-os képe

egy frissen levett vérből (5. ábra) és egy hosszabb tárolás után rejuvenált vérből (6. ábra) készült mintát, igen szembetűnő a különbség: az utóbbiban nagyfokú az anizocitozis, feltűnő a spherostomatocyták (SSt) és a microspherocyták (MS) (bikonkáv, de kisebb átmérő/vastagság viszonyú) sejtek nagy száma. Ez utóbbi két forma aránya a konzerválási idő előrehaladtával nő és jó korrelációt mutat az inkubálás előtt talált SE II alakok arányával (1. és 2. ábra). A D—E tr és reverzibilitás összefüggésére vonatkozó elképzelésünket a 7. ábrán foglaltuk össze: a D—E tr előrehaladott stádiumaiban membránveszteség lép fel; rejuvenálás során a membrán anyagot nem (vagy nem kritikus mennyiségben) vesztett sejtek közel normál nagyságú, míg a membrándeficiens alakok morfológiailag is kóros, bár konkáv formákká képesek átalakulni. Ilyen alakok figyelhetők meg pl. herediter spherocytosisban, s kisebb deformabilitásuknak tulandonítják funkcionális csökkent-értékűségüket (Bessis és Mohandas 1975, Bessis 1977). A rejuvenált vvt-ek esetében a deformabilitásra vonatkozó megfigyelések nem teljesen egyértelműek: a deformabilitás növekedését mutatták ki filtrációval (Haradin és mtsai 1969) és mikropipettás technikával (La Celle 1969), (a filtrabilitás csökkenését a tárolás előrehaladtával és növekedését a rejuvenálás után magunk is megfigyeltük), míg Ektacytométerrel mér-

ve a rejuvenált sejtek deformabilitása csökkentnek mutatkozott (FÉO és mtsai 1978). Kérdéses, hogy a konzervált vvt-ek lienális és hepatikus szekvesztrációjában a deformabilitás kritikus mértékű csökkenése vagy a membránkárosodás és membránveszteség egyéb következményei a meghatározóbb jellegűek.

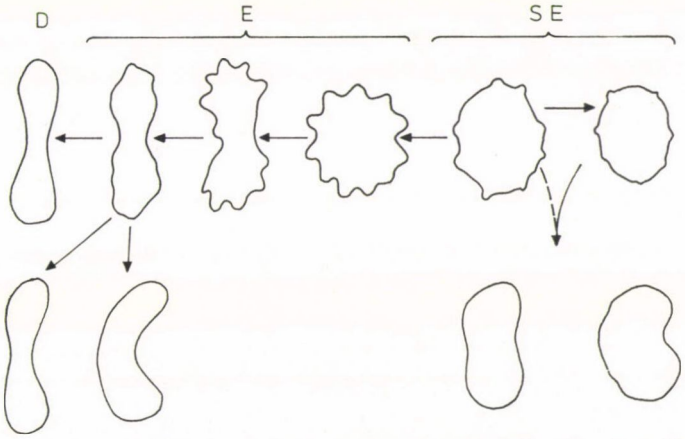
A rejuvenálás hatásának morfológiai értékelését a SSt + MS alakok arányának figyelembevételével informatívabbnak véljük, s a *reverzió minőségeként* javasoljuk tekinteni. Morfológiai index (Im_{rq} — quality of reversion) számolásához: D + E I 1,0; E II—III 0,5; SE I—II és SSt + MS 0,0. (2. ábra).

b) *A rejuvenáláskor létrejövő alakváltozások időbeli lefolyása — néhány rejuvenáló közeg és hőmérséklet összevetése*

Korábbi vizsgálatainkban arra utaló megfigyeléseink voltak, hogy a konzervált vvt-ek D—E tr-jának reverziója bizonyos szintig a saját, konzervált plazmában történő frakcionáláskor és friss autológ plazmában történő inkubáláskor szobahőmérsékleten is bekövetkezik (LACZKÓ és mtsai 1979). A rejuvenáláskor létrejövő alakváltozások értékeléséhez ezért szükségesnek látszik, hogy az inkubációs körülmények hatását pontosabban ismerjük. A következő körülmények között vizsgáltuk a reverzió szintjét az inkubációs idő függvényében 3 hétig tárolt véreken: Közegek

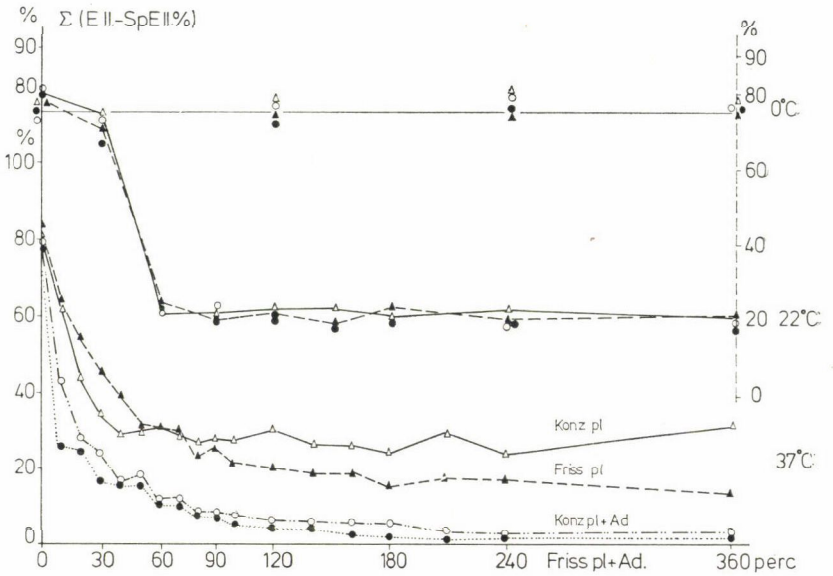
A) 1 térf. friss autológ plazma + 1 térf. PBS
B) 1 térf. friss autológ plazma + 1 térf. PBS-ben oldott 60 mM Adenozin (Serva);
C) 1 térf. konzervált plazma + 1 térf. PBS;
D) 1 térf. konzervált plazma + 1 térf. PBS-ben oldott 60 mM Adenozin; hematokrit 10%, hőmérséklet 0, 22 és 37 °C.

Az inkubáció tartama alatt meghatározott időközökben kivett mintákat

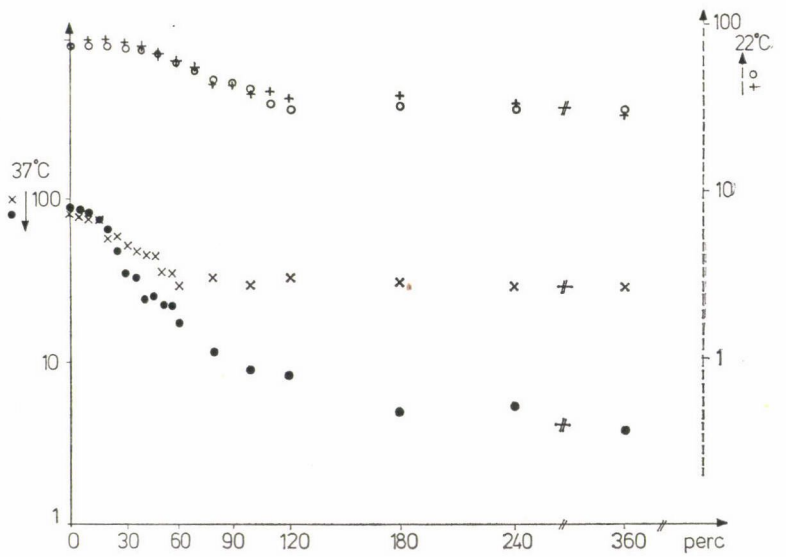


7. ábra. A D—E tr és reverzió sémája

glutáraldehidben fixáltuk. Az eredményeket a 8., 9. ábrák mutatják. 0 °C-on változás nincs, ami arra utal, hogy az alakváltozás a sejtek aktív anyagcseréjétől függő folyamat. Alakváltozás a vizsgált közegekben mind 22 °C-on, mind 37 °C-on létrejött, az időbeli lefolyás jellegének különbözőségei azonban rész-



8. ábra. A reverziószint változása, az inkubálási idő függvényében (3 hetes ACD-s vér)



9. ábra. A reverziószint változása rövidebb mintavételi időközökkel féllogaritmikus skálán (3 hetes ACD-s, de az előbbivel nem azonos vér)

ben eltérő anyagcsere folyamatokra utalhatnak. Ezt a sejtek energiaszintjére és egyéb biokémiai és fiziológiai jellemzőire vonatkozó párhuzamos vizsgálatok tisztázhatják. A rejuvenálás okozta alakváltozások értékelése szempontjából a gyors fázisok jelenléte az inkubálási idők pontos megválasztásának fontosságát húzza alá. A vizsgálni kívánt konzerv vér előkészítésénél (denzitás alapján történő szeparálás, mosás stb.), valamint a kontrollok beállításánál fontos figyelembe venni a 22 és 37 °C-on a konzervált plazmában is létrejövő alakváltozást. A viszonylag stabil végállapotok viszont a különböző viselkedésű vvt-ek szeparálásához jelenthetnek kedvezőbb feltételeket. További vizsgálatokat kíván az a kérdés, hogy maga a reverziósebesség milyen információkat jelenthet a vvt-ek állapotának, a vvt-ek és a plazma, ill. más inkubáló közegek kölcsönhatásainak tanulmányozásához.

Következtetések

1. A D—E tr a konzerválási ártalom morfológiai jellemzője, előrehaladottságának mértéke a membránveszteséget szenvedett vvt-ek arányával van összefüggésben.
2. A rejuvenálás morfológiai hatásának kiértékelésénél a rejuvenált vvt populációban található bi- vagy monokonkáv, de alaki sajátosságaik alapján membrándeficiens formák aránya nem hagyható figyelmen kívül.
3. A morfológiai értékelésre kerülő konzervált vérminták előkészítésénél, kontrollok beállításánál tekintettel kell lenni a szobahőn is bekövetkező alakváltozásokra, a rejuvenálási eljárások összehasonlításánál pedig az alakváltozások időfüggésének jellegére.

IRODALOM

Bartlett, G. R.: in: The Human Red Cell in vitro, eds: T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson. Grune and Stratton, New York—London p. 5 (1974).
Bessis, M.: Nouv. Rev. fr. Hémat. **18,** 75 (1977).
Bessis, M., Brecher, G.: Nouv. Ref. fr. Hémat. **11,** 305 (1971).
Bessis, M., Mandon, P.: Nouv. Ref. fr. Hémat. **12,** 443 (1972).
Bessis, M., Mohandas, N.: Sweiz. med. Wschr. **105,** 1568 (1975).
Bessis, M., Prenant, M.: Nouv. Ref. fr. Hémat. **12,** 351 (1972).
Birchmeier, W., Singer, S. J.: J. Cell Biol. **73,** 647 (1977).
Deuticke, B.: Biochim. Biophys. Acta **163,** 494 (1968).
Féo, C. J.: Nouv. Rev. fr. Hémat. **12,** 455 (1972).
Féo, C. J., Laczkó, J. Phillips, W. M.: Com. 17e Cong. de la Sté Intern. d'Hématol. Vol. **1,** p. 281 (1978).
Féo, C. J., Leblond, P. F.: Blood **44,** 639 (1974).
Gárdos, G., Szász, I., Árky, I.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **1,** 253 (1966).
Gárdos, G., Szász, I., Sarkadi, B.: MTA Biol. Oszt. Közl. **22,** 103 (1979).
Haradin, A. R., Weed, R. I., Reed, C. F.: Transfusion **9,** 229 (1969).
La Celle. P. L.: Transfusion **9,** 238 (1969).
Laczkó, J., Féo, C. J., Phillips, W.: Transfusion **19,** 379 (1979).
Lichtman, M. A., Marinetti, G. V.: Nouv. Rev. fr. Hémat. **12,** 755 (1972).

LONGSTER, G. H., BUCKLEY, T., SIKORSKI, J., DERRICK TOVEY, L. A.: Vox Sang. **22,** 161 (1972)
LUTZ, H. V., LIU, SH-CH., PALEK J.: J. Cell Biol. **73,** 548 (1977).
MIRCEVOVÁ, L.: Blut **29,** 108 (1974).
NAKAO, M., NAKAO, T., TATIBANA, M., YOSHIKAWA, H., ABE, T.: Biochim. Biophys. Acta **31,** 564 (1959).
NAKAO, M., NAKAO, T., YAMAZOE, S., YOSHIKAWA, H.: J. Biochem. (Japan) **49,** 487 (1961).
PALEK, J., STEWART, G., LIONETTI, F. J.: Blood **44,** 583 (1974).
PONDER, E., PONDER, R.: Nouv. Rev. fr. Hémat. **2,** 223 (1962).
SANDERS, S. K., ALEXANDER, E. L., BRAYLAN, R. C.: J. Cell Biol. **67,** 476 (1975).
SHEETZ, M. P., SINGER, S. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71,** 4457 (1974).
SHEETZ, M. P., SINGER, S. J.: J. Cell Biol. **73,** 638 (1977).
SZÁSZ, I.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **5,** 399 (1970).
SZÁSZ, I., ÁRKY, I., GÁRDOS, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **3,** 289, (1968).
SZÁSZ, I., HASITZ, M., BREUER, J. H., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: Acta Biol. Acad. Sci. Hung. **29,** 1 (1978).
SZÁSZ, I., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: Brit. J. Haematol. **39,** 559 (1978).
SZÁSZ, I., TEITEL, P., GÁRDOS, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **5,** 409 (1970).
USRY, R. T., MOORE, G. L., MANALO, F. W.: Vox Sang. **28,** 176 (1975).
VALERI, C. R., ZAROULIS, C. G.: New Engl. J. Med. **287,** 1307 (1972).
WEED, R. I., CHAILLEY, B.: in: Red Cell Shape, eds: M. Bessis, R. I. Weed, P. F. Leblond, Springer Verlag, New York p. 55 (1973).
WEED, R. I., LA CELLE, P. L., MERRILL, E. W.: J. Clin. Invest. **48,** 795 (1969).
WEED, R. I., LA CELLE, P. L., UDKOW, M.: in: The Human Red Cell in vitro. eds: T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson, Grune and Stratton, New York—London p. 65 (1974).
WHITE, J. G.: Seminars in Hematol. **13,** 121 (1976).

BIOLÓGIAI MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS KVALITATÍV RÖNTGEN-SUGÁR MIKROANALÍZISE*

TÓTH IDA

MTA, Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium

A vékony (maximum 0,25 μm vastagságú) biológiai minták röntgen-sugár mikroanalízise (elektronsugaras rötgen-mikroanalízise: BERNOLÁK, SZABÓ, SZILAS 1979) alig több, mint 10 éves múltra tekint vissza, s csupán néhány száz közlemény jelent meg ebben a témakörben. Jelentősége mégis óriási, mert az egyetlen olyan vizsgáló módszer, amely közvetlen kapcsolatot teremt a morfológia és a biokémia között.

A lehetőséget egy ilyen kapcsolatteremtésre az analitikai elektronmikroszkópia biztosította: azok az elektronmikroszkópok, amelyek röntgen-sugár mikroanalizátorral vagy mikroanalizátorokkal vannak felszerelve. Mind a transzmissziós, mind a scanning elektronmikroszkópok kombinálhatók mikroanalizátorral, így az elektronmikroszkópos anyagvizsgálat során mindhárom üzemmódban (TEM: transzmissziós elektronmikroszkóp, STEM: scanning transzmissziós elektronmikroszkóp és SEM: scanning elektronmikroszkóp) nyerhető információ az anyag in situ mikrokémiájára vonatkozóan.

A módszer lényege, hogy az elektronbombázás hatására keletkező röntgen-sugárzást a minta közelében elhelyezett detektor érzékeli, majd az impulzusokat erősítés után egy sokcsatornás analizátor dolgozza fel, melynek eredménye az energia spektrum, illetve hullámhossz spektrum, a detektortól függően. Újabban mindkét detektor-típussal felszerelik az elektronmikroszkópokat, így célzottan alkalmazhatók. A kristályspektrométerrel nyert hullámhossz spektrumon csak egy elem vizsgálható, azonban a feloldóképessége, így a jel/zaj, azaz csúcs/háttér arány jobb, ezért a kis koncentrációban jelenlevő elemek vizsgálatára alkalmasabb. A félvezető típusú (általában szilicium/litium) detektorral kapott energia spektrum azonban a teljes detektálható elemösszetételt mutatja, amelyet általában rövid 100-200 másodperces analízis idővel nyerünk. A hagyományos félvezető detektorral csupán a nátrium, illetve a nátriumnál magasabb rendszámú elemek vizsgálhatók, azonban az ún. ablak nélküli detektorokkal könnyebb elemek is vizsgálhatók.

A biológiai minták analízisében a félvezető detektorok alkalmazása elterjedtebb, mint a kristályspektrométereké. Az eddigi közlemények kb. 10%-

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

ban alkalmaztak hullámhossz spektrum kiértékelést. Ennek nem csupán a könnyebb kezelhetőség az oka, hanem az is, hogy rövidebb idő alatt több információ nyerhető a szimultán spektrum révén, így a minta károsodása minimális. A legkisebb kimutatható anyagmennyiség 10^{-19} g, (SHUMAN, SOMLYO 1976) tehát rendkívül érzékeny módszer.

A röntgen-sugár mikroanalízis látszólag egyszerű, gyors módszer az elemek in situ meghatározására. Azonban ahhoz, hogy értékelhető eredményeket kapjunk, gondos, meghatározott paraméterekkel végzett analízis és még gondosabb, kontamináció- és műtermék-mentes mintaelőkészítés szükséges.

Mintaelőkészítés

A röntgen-sugár mikroanalízis révén nyert adatok értékelhetősége nagymértékben függ a minta előkészítésétől. A preparálás kettős kritériuma a következő:

i. Megfelelően kontrasztos minta a tájékozódás biztosítására.
ii. Az elemek diszlokáció és kioldódás mentes megőrzése.

Csak a két feltétel biztosítása esetén használhatjuk ki maximálisan azt a röntgen-sugár mikroanalízis nyújtotta lehetőséget, hogy pl. egy sejtorganellum in situ elemösszetételét meghatározzuk. Ennek a kettős követelménynek egyetlen ma ismert módszer sem felel meg tökéletesen, azonban számos kompromisztikus megoldás van. Ezek az eljárások a vizsgálat céljától függően két nagy csoportra oszthatók:

1. Minden detektálható elem, vagy
2. célzottan egy-egy elem kimutatására irányuló előkészítés.

1. *Minden detektálható elem kimutatására irányuló előkészítési módszerek:*

1.1. A konvencionális elektronmikroszkópos előkészítés során a fixáló szerek, a vízelvonó szerek, sőt a beágyazó medium is kioldhatja, illetve diszlokálhatja az elemeket. Ezért célszerű minden kémiai anyagot mellőzni, ha minden detektálható elem eloszlását akarjuk vizsgálni. Legalkalmasabb előkészítési mód a rögzítetlen anyagból készült *fagyasztva szárított, fagyasztott ultravékony* metszés. Ilyen preparátumok készítéséhez speciális ultramikrotomok szükségesek. A hagyományos ultramikrotomok közül az LKB Ultratom I. III. és IV., a Reichert OMU-2, OMU-3, valamint a Sorvall Porter-Blum MT2B és MT2 típusai kiegészíthetők a kereskedelmi forgalomban kapható fagyasztó feltétekkel.

A preparálás lényege, hogy alacsony hőmérsékleten, általában a folyékony nitrogénben (—190 °C) vagy túlhűtött, folyékonyni trogénben (—210 °C), megfagyasztjuk a szövet lehetőleg minél kisebb részletét, (általában 1 mm^3). Ezután az anyagot —80 —100 °C körüli hőmérsékleten száraz késsel megmetszük, majd tű (CHRISTENSEN 1971) vagy vákuum (APPLETON 1974) segítségével összegyűjtjük a metszeteket és az elektronmikroszkópos rostélyra helyezzük.

Szárítás után szénréteget párologtatunk rá (HODSON és WILLIAMS 1974). A metszet szárítását is alacsony hőmérsékleten kell végezni, így az elemek száradás közbeni diszlokációja elkerülhető. Laboratóriumunkban Reichert OMU-2 típusú ultramikrotom FC-2 típusú fagyasztó feltétjével dolgozunk. Ebben a készülékben a preparátum, a késtartó és a gyorsfagyasztó egység egy viszonylag kis térfogatú kamrában helyezkedik el, a hőmérséklet 0,2 °C pontossággal elektromos úton szabályozható —160 és + 40 °C között, folyékony nitrogén elektromos uton történő párologtatásával. A minta fagyasztására folyékony nitrogén helyett Freon 22-t alkalmazunk —130 °C mellett. Ennek megvan az az előnye, hogy így a mintát a kamrán belül fagyaszthattuk le, és éppoly jó eredményeket kaptunk, mint túlhűtött cseppfolyós nitrogénnel.

A jó metszetkészítés feltétele, hogy minél kisebb anyagot minél gyorsabban fagyasszunk le. Úgy tapasztaltuk, hogy Vibratommal történő előmetszés (50—100 μm-os szövetszeletek) alkalmazása nagymértékben csökkenti a fagyasztás soráni jégkristály képződést. Jól kisimíthatók a metszetek és felvételük is effektívebb, ha kis teljesítményű vákuum szivattyúval gyűjtjük össze a szalagszerűen rendeződött metszeteket. Ezt a módszert Appleton nyomán mi is adaptáltuk Reichert OMU-2 FC-2 típusú ultramikrotomunkhoz. A fagyasztva szárított ultravékony metszetekben elméletileg minden elem diszlokáció mentesen megőrizhető, így a röntgen-sugár mikroanalízis ideális preparátumai. Azonban a természetesen előforduló elemek elektron-denzitása alacsony, ezért a tájékozódás problematikus, a membránok például nem vehetők ki a megszokott módon: csupán az anyag sűrűségbeli különbségei adnak kontraszt hatást.

1.2. A lefagyasztott minta vákuumban kiszárítható, műgyantába ágyazható, így is elkerülhetjük a fixáláshoz, illetve a víztelenítéshez használt kémiai anyagok alkalmazását. Ezek a *fagyasztva szárított beágyazott metszetek*. A metodika egyszerűbb, mint a fagyasztva szárított fagyasztott ultravékony metszetek készítése, de a beágyazó anyag diszlokációt okozó hatása nem zárható ki.

1.3.A lefagyasztott anyag víztelenítését szubsztitucióval is elérhetjük. Eredetileg SPURR (1972) írta le. A lefagyasztott anyag —80 °C szubsztituálható dietil-éterrel, vagy acetonnal, vagy akroleinnel, majd néhány nap múlva szobahőmérsékletre hozható, és beágyazható. Számos növényi és állati szövetben végeztek így eredményes vizsgálatokat, azonban a nátrium és kálium ki-

oldódása megfigyelhető a *fagyasztva szubsztituált metszeteken.* (CHANDLER 1978).

1.4. Mind a kémiai, mind a fizikai fixálást mellőzve is készíthető preparátum mikroanalitikai célra: szuszpenziót levegőn, (COSTA et al. 1977, HUI és COSTA 1979, SILBERGELD és COSTA 1979) vagy kritikus pont-szárítóval dehidrált állapotban vizsgálhatjuk (CLARKE et al. 1970). Rendkívül gyors, egyszerű eljárás. Szövetekből is készíthetők levegőn szárított preparátumok: ezek az *elektronmikroszkópos kenetek* (TAKAYA 1975).

Az említett módszerekről részletes áttekintést ad ERASMUS (1978).

2. *Egy elem célzott kimutatására irányuló előkészítési módszerek*

2.1. Célzottan, egyetlen elem lokalizációjára irányuló vizsgálatok precipitációs módszerrel végezhetők. Így a szövetben jelenlevő *endogén elem* egy csapadék-képző ágenssel oldhatatlan reakciótermékét képezve a szövetben megőrizhető, és röntgen-sugár mikroanalízissel vizsgálható. Sok esetben, de nem szükségszerűen a csapadék elektrondenz, így a lokalizáció könnyű. A különböző metodikákat részletesen ismerteti LÄUCHLI (1975). A precipitációs technikák tekintélyes hányada a kalcium kimutatására irányul. Laboratóriumunkban sikerrel alkalmaztuk az Oschmann—Wall technikát idegszövetben (PÁRDUCZ és JOÓ 1976), K-piroantimonátos rögzítést izomszövetben történő kalcium lokalizálására (DUX és mtsai 1977, DUX és mtsai 1978).

2.2. Nemcsak az endogén elemek, hanem a szövetekbe bevitt *exogén elemek* is azonosíthatók megfelelő előkészítés után. Csigából *(Helix pomatia)* származó suboesophagealis idegduc bárium tartalmú oldatban történő inkubálása után a neuroszekréciós szemcsékben bárium kimutatható (JOÓ és mtsai 1977).

Az elektronmikroszkópos K-ferricianidos glikogén festési eljárás specifikus volta ellenőrizhető a csapadék rtg-sugár mikroanalízisével (BOLDOCZKI és PÁRDUCZ 1977). A ferritinben lévő vas detektálásával az agyi hajszálerek permeábilitás-fokozódása egzakt módon jellemezhető (JOÓ és KARNYUSHINA 1978).

Zink-jód-ozmium reakció idegszövetben történő lokalizálását követően a csapadék röntgen-sugár mikroanalízise megerősítette a reakció végtermék és a kalciumkötő helyek feltételezett kapcsolatát (HALÁSZ és mtsai 1979).

Alkalmazás

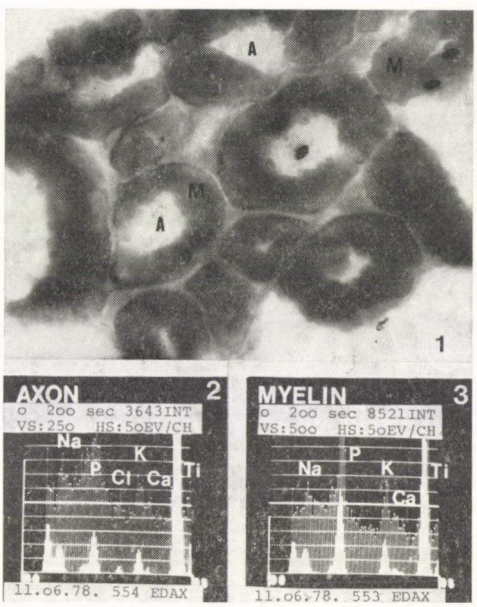
A továbbiakban a röntgen-sugár mikroanalízis laboratóriumunkban elért újabb eredményeiről szeretnék beszámolni. Adatainkat JEOL-JEM 100B-hez kapcsolt JEM-ASID scanning elektronmikroszkóp és EDAX 707 B

energiadiszperzív röntgen-sugár mikroanalizátor használatával nyertük. A metszeteket Reichert OMU-2, FC-2 típusú fagyasztó ultramikrotommal készítettük.

1. Idegszövet

1.1. *Perifériás idegszövet elemösszetételének vizsgálata*

Az idegszövet elemösszetételének vizsgálatára első alkalommal olyan szövetet választottunk, melynek viszonylagos egyszerű struktúrája lehetővé teszi a jó tájékozódást fagyasztott ultravékony metszeteken is. Patkány, egér és béka rögzítetlen n. ischiadicusából készítettünk fagyasztott ultravékony metszeteket és ezeket festetlenül, szenezés után vizsgáltuk az elektronmikroszkópban (1—3 ábra). A myelinizált idegrostok egyértelműen felismerhetők, így elemösszetételük in situ vizsgálható. A következő elemek: Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca és Fe voltak detektálhatók, mind az axonban, mind a myelin hüvelyben. Azonban csak a Na, K és P volt megtalálható minden vizsgált ponton, a többi elem feltehetően szekvesztrált eloszlású, amint ez más csapadékos módszerekkel történt vizsgálatokból ismert, például kalcium esetén (HILLMAN



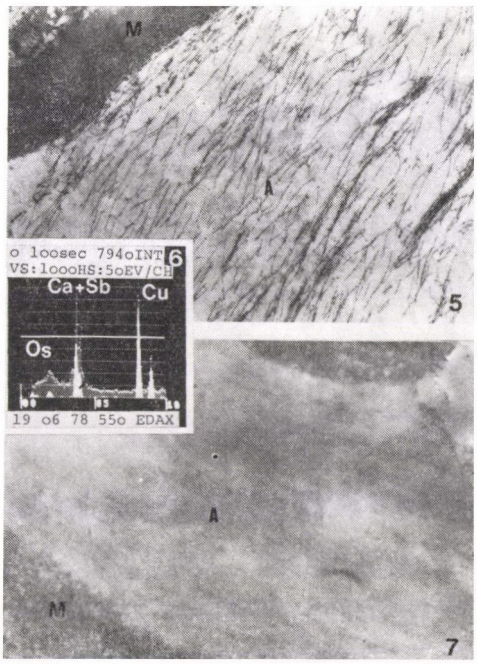
1—3. ábra. Patkány n. ischiadicus elektronmikroszkópos részlete és röntgen-sugár mikroanalízise. 1. ábra: rögzítetlen anyagból készült fagyasztva szárított, fagyasztott, ultravékony, festetlen metszet részlete. 5 940 ×. M = myelin, A = axon. A foltok az analízis helyét jelzik. 2. ábra: Az axon 200 másodperces, STEM üzemmódban végzett analízisének jellemző spektruma: a háttérrel, ill. anélkül. 3. ábra: a myelin hüvely hasonlóképpen nyert jellemző spektruma. A titán a hordozó rostély anyagából származik

és LLINAS 1974, OSCHMAN et al. 1974, HENKART et al. 1978, DUCE és KEEN 1978).

A myelin hüvely lamellái festett készítményen látszanak csupán: rövid, 5'-es glutáraldehides fixálás után készült fagyasztott ultravékony metszet részletét mutatja a 4. *ábra*, amely uranyl acetáttal volt negatívan festve.

A myelin hüvely lamellái jól kivehetők. A fagyasztott ultravékony metszeteken a membrán kompartmentumok tehát nem láthatók, ezért a szekvesztráció vizsgálatára más metodikát alkalmaztunk. Csapadékos módszerrel vizsgáltuk a Ca eloszlását perifériás idegrostokban. A következő Ca-kötő helyeket lehetett megfigyelni, kálium-piroantimonátos fixálás után: axolemma, mikrotubulusok, egyes neurofilametumok és sima felszínű endoplazmás retikulum (5. ábra). A csapadék összetételét röntgen-sugár mikroanalízissel határoztuk meg (6. ábra). Az antimon L csúcsától a kalcium K vonala nem különíthető el egyértelműen, ezért még az analízis elvégzése után is kétséges lehet a csapadék kalcium tartalma (ugyanis a kálium-piroantimonát nem szelektív csapadékos eljárás, nátriummal, magnéziummal, mangánnal, cinkkel és hisztonokkal egyaránt csapadékot alkot). Ezért 20 mM EGTA-val kezeltük a metszeteket, így a reakció specifitását kalciumra vonatkozóan kontrolláltuk (DAVIS et al. 1979); a kezelés után csapadék nem volt megfigyelhető az idegrostban

4. ábra. Patkány n. ischiadicus elektronmikroszkópos részlete. 5 perces 2,5%-os glutáraldehides fixálás után készített fagyasztott ultravékony metszet, uranil acetáttal 1 percig felülfestve. 125 000×, M = myelin, A = axon, m = mitokondrium

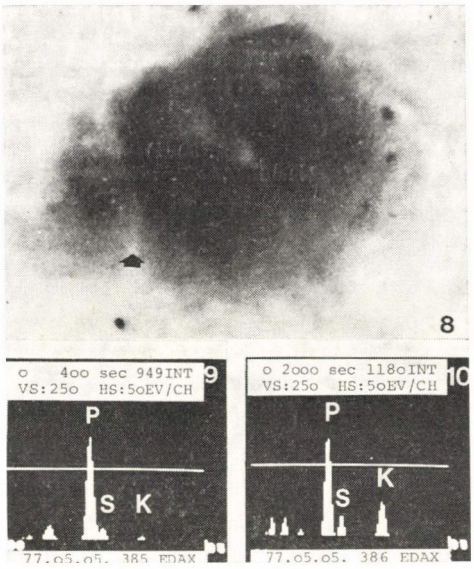


5—7. *ábra.* Kálium-piroantimonáttal történt fixálás után készített elektronmikroszkópos felvétel és röntgen-sugár mikroanalízissel kapott spektrum béka n. ischiadicusról. 5. ábra: Kálium-piroantimonát rögzítés után készült festett metszet részlete. 13 300 ×, M = myelin, A = axon. 6. ábra: a csapadék elem-összetétele, röntgen-sugár mikroanalízissel, a háttérrel, illetve anélkül. A réz csúcs a hordozó rostélyból származik. 7. ábra: Kálium-piroantimonáttal fixált, festetlen metszet részlete EGTA kezelés után. 32 000 ×

(7. ábra). További kísérleteket tervezünk a perifériás idegrostok kalcium kötő helyei funkcionális jelentőségének tisztázására. Eddigi eredményeinket részben ismertettük hazai, illetve nemzetközi konferenciákon (Joó és Tóth 1975, Tóth 1978).

1.2. *Szinaptoszomák elemösszetételének vizsgálata*

Patkány agykéregből Hajós (1975) módszerével preparáltunk szinaptoszomát. A szinaptoszoma frakcióból a következő módon készítettünk keneteket: a frakciót Eppendorf 5412 asztali centrifugával tovább ülepítettük 5 percig tartó 15 000 g alkalmazásával, majd az üledéket formvar hártyás elektronmikroszkópos rostélyra terítettük polírozott nikkel rúddal. Végül széngőzölés után vizsgáltuk az elektronmikroszkópban. A festetlen készítményen is relatíve jól felismerhetők a szinaptoszómák (8. ábra). A funkcionális változásokat próbáltuk nyomon követni a szinaptoszómák elemösszetételének De Belleroche és Bredford (1972) szerinti elektromos ingerlés után történő vizsgálatával. Ingerlés hatására a foszfortartalomra vonatkoztatott szinaptoszomális kálium tartalom csökkent (9—10. ábra).



8—10. ábra. Szinaptoszómából készült elektronmikroszkópos kenet részlete, festetlen preparátum. A nyíl a szinaptikus rést jelzi. 72 000 ×. 9. ábra: ingerelt szinaptoszóma energia spektruma. 10. ábra: Kontroll szinaptoszóma energia spektruma. Az analízis idő úgy volt megválasztva, hogy a foszfortartalom azonos legyen (400, illetve 2000 másodperc)

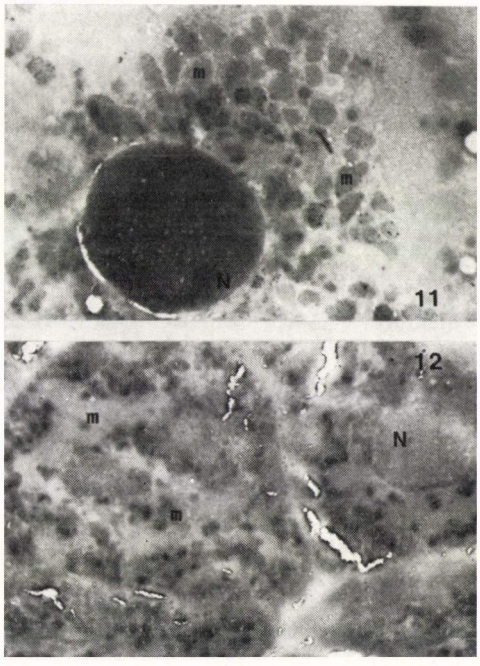
2. *Májszövet elemösszetételének vizsgálata*

Patkánymájból Takay módszerrel készítettünk elektronmikroszkópos keneteket. Meglepő módon minden fixálás, kontrasztozás nélkül a májsejtek rendkívül részletdús, egyértelműen azonosítható elektronmikroszkópos képet adtak (11. ábra). Minden kétséget kizáróan felismerhetők a sejtmagok és a mitokondriumok. Az eletronmikroszkópos kenet egészen hasonló a rögzítetlen májból készült festetlen, fagyasztott ultravékony metszethez (12. ábra). A kenetek felszínének simaságát aranygőzölés után történő scanning elektronmikroszkópos vizsgálattal bizonyítottuk. Fénymikroszkópos dimenzióban 1%-os toluidinkékkel megfestett, az elektronmikroszkópos kenetkészítéssel azonos módon készült kenetek vizsgálatával győződtünk meg arról, hogy ezzel a preparálással a májsejtek megőrzik integritásukat, bár a sejtek májszövetre jellemző, gerendázatszerű elhelyezkedése nem látható. A kenetek elektronmikroszkópos tanulmányozásával kitűnt, hogy a mitokondriumok 70%-a sötét, átlagosan 1000 Å átmérőjű elektrondenz szemcséket tartalmaznak. A hagyományosan készült elektronmikroszkópos metszeteken is megfigyelhetők szemcsék a mitokondriális mátrixban, azonban sohasem ilyen nagy számban. A szemcsés mitokondriumok röntgen-sugár mikroanalízise azt mutatta, hogy ezek Na, Mg, P, S, K és Ca tartalmúak. A szemcsétlen mitokondriumok kalciumot nem tartalmaznak. A mitokondriális szemcsék röntgen-sugár mikroanalí-

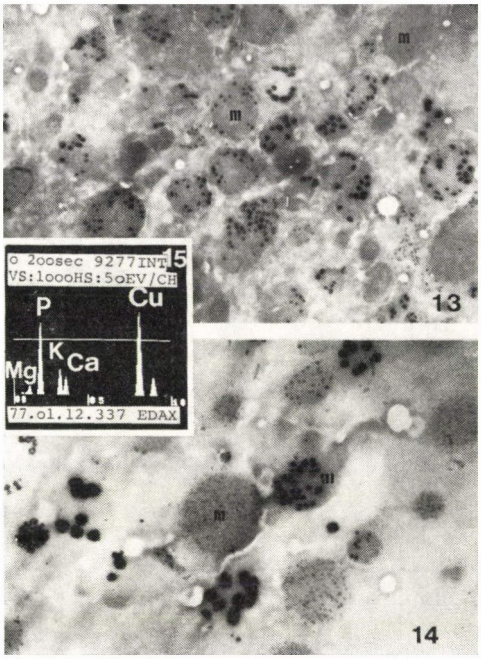
zisével két típusú szemcse különíthető el, elemösszetételük alapján: 1. P, Ca, K, Mg; 2. P, Ca, K, Mg, S.

Az individuális mitokondriumok in situ vizsgálatára más módszerrel nincs lehetőség. Ismeretes azonban, hogy az izolált mitokondriális granulumok különböző kationokat és anionokat tartalmaznak (WEINBACH és VON BRAND 1965).

Miután az elektronmikroszkópos kenetek morfológiai és röntgen-sugár mikroanalitikai értékelhetőségéről meggyőződtünk, arra a kérdésre kerestük a választ, hogyan követhető nyomon egy funkcionális-morfológiai változás ezzel a feldolgozási módszerrel. Kísérleteinkben mindkét nemű, albino patkányoknak 0,25 ml/kg széntetrakloridot adtunk i. p. Akut mérgezést követően megfigyelhető az endoplazmás retikulum széttöredezése, a rER ciszternáinak vakuolizációja, degranulációja, valamint a szabad riboszomák számának növekedése (REYNOLDS 1963). Hasonló elváltozást figyeltünk meg a konvencionális elektronmikroszkópos metszeteken, 2, 4, 6 órával a mérgezés után. Ezek az elváltozások 6 órás mérgezés után voltak a legkifejezettebbek. A hagyományos preparálással párhuzamosan készített keneteken a következő jelenség volt megfigyelhető: a mitokondriumok 80%-a szemcséket tartalmazott, és a szemcsék nagysága átlagosan 2000 Å volt 2 órával a mérgezés után (13. ábra). A



11—12. ábra. Májszövet elektronmikroszkópos részletei. 11. ábra: elektronmikroszkópos kenet, festés nélküli preparátum. 9 500 ×, N = sejtmag, m = mitokondrium. 12. ábra: Rögzítetlen májszövetből készült fagyasztott ultravékony metszet, festés nélkül. 5 900 ×



13—15. ábra. Májszövetből készült elektronmikroszkópos kenetek és a röntgen-sugár mikroanalízissel kapott energia spektrum. 13. ábra: 2 órával széntetraklorid mérgezés után készült kenet. 10 000×. 14. ábra: 6 órával széntetraklorid mérgezés után készült kenet. 12 000×. 15. ábra: egy szemcse röntgen-sugár mikroanalízisével STEM üzemmódban kapott spektrum. A rézcsúcs a hordozó rostélyból származik

mérgezés 6. órájában már minden mitokondrium szemcséket tartalmazott (14. ábra). A szemcsék nagysága néhány mitokondriumban elérte a 2500—3000 Å-öt is. Egy-egy szemcse röntgen-sugár mikroanalízisével kimutatható volt, hogy igen nagy mennyiségben tartalmaznak P-t, K-ot, Ca-ot, Mg-ot (15. ábra). A szemcsék közötti mátrixban P, K, Ca, S, Mg volt detektálható. A kapott eredményeket összehasonlítva a kontroll kenetek mitokondriumainak elemösszetételével, azt találtuk, hogy a szemcsétlen mitokondriumok elemei összetételükben nem változtak a kezelés hatására. A szemcsés mitokondriumokban ezzel szemben a kezeléssel párhuzamosan megnövekedett a szemcsék elsősorban P és Ca, valamint Mg és K tartalma is. A mitokondriális mátrixban a kezelés hatására Ca és Mg jelent meg. Az összehasonlítás az azonos paraméterekkel végzett analízissel nyert impulzus értékekre vonatkozó, szemikvantitatív adat.

THIERS és munkatársai (1960) izolált mitokondriumokban lángfotometriás meghatározással szintén kimutatták a mitokondrium Ca és P tartalmának növekedését széntetraklorid adását követően.

Mivel a kenetek analízisével a funkcionális-morfológiai változások követhetőek voltak, megpróbálkoztunk biopszia során emberi májból nyert

kenetek analízisével. A röntgensugár mikroanalízis kezdetben nem volt értékelhető, mert a percutan tűbiopszia (MENGHINI) során fiziológiás sóoldatot használtak. Ha a mintavétel után a májszövetet 5%-os glükóz oldattal kimostuk, az analízis értékelhető volt. A mitokondriumok elemösszetétele, P, K, S, a citoplazmában P, S, K, Ca, Fe volt kimutatható.

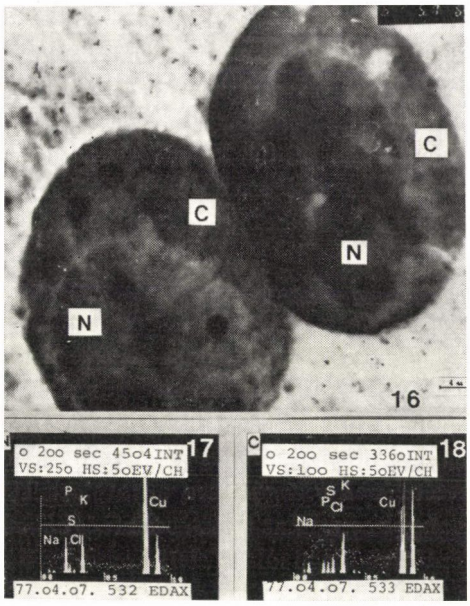
Fenti eredményeinket hazai konferencián részben ismertettük (TÓTH és mtsai 1977).

3. *Granulociták röntgen-sugár mikroanalízise*

Fehérvérsejtekből a szinaptoszomához, illetve a májszövethez hasonló módon elektronmikroszkópos keneteket készítettünk. A fehérvérsejtek kis része megőrzi eredeti alakját, éppúgy mint a fénymikroszkópos keneteken. Célul tűztük ki, hogy ezt az egyszerű, gyors, és könnyen reprodukálható módszert granulociták elemösszetételének vizsgálatára alkalmazzuk, krónikus granulocitás leukémiás (CGL) betegekben. Hat CGL-es férfi és nőbetegtől vénásan levett natív, illetve esetenként alvadásgátolt vérből centrifugálás után készítettünk elektronmikroszkópos keneteket. A keneteket széngőzöléssel stabilizáltuk, más előkészítési módot nem alkalmaztunk. Elektronmikroszkóposan a sejtek jól vizsgálhatók, a sejtmag és a citoplazma jól elkülöníthető (16. ábra). A különböző érési alakok a sejtmag alakjának megfelelően azonosíthatók. A 17, illetve a 18. ábra CGL-es elektronmikroszkópos kenet egyetlen granulocitájának jellemző energia spektrumát mutatja. Mind az egészséges, mind a CGL-es fehérvérsejtekben Na, P, K, Cl, S, Ca volt detektálható a sejtmagban és a citoplazmában. Összehasonlítottuk a sejtmag/citoplazma elemarányait, azonos sejten belül: kontroll, fiatal CGL-es és szegment-CGL-es fehérvérsejtekben. Az összehasonlítás alapja az azonos paraméterekkel nyert impulzus értékek. Az összehasonlítás eredményeképpen a CGL-es betegek granulocitáinak magjában a P tartalom jelentős csökkenését figyeltük meg a citoplazmához képest.

A továbbiakban a most röviden ismertetett gyors és könnyen reprodukálható módszerrel vizsgálatokat szeretnénk végezni haematológiai beteganyagon. Különösen kíváncsiak vagyunk arra, hogy a klinikumban általánosan használt citosztatikus szerek alkalmazása mennyiben változtatja meg a fehérvérsejtek elemi összetételét. Eredményeinket részben ismertettük hazai konferencián (TÓTH és mtsai 1978).

A röntgen-sugár mikroanalízis a biológiailag fontos elemek intracelluláris vagy transzcelluláris transzlokációjának vizsgálatára legalkalmasabb módszer, különösen ha az adatok kiértékelése kvantitatív módon történik. A kvantitatív kiértékelés alapja a csúcs/háttér arány, azaz a mintából származó karakterisztikus röntgen-sugárzás és fékezési sugárzás aránya (HALL 1971). A pontos kvantitatív analízis végzéséhez speciális, erre a célra tervezett, vagy átalakított analitikai elektronmikroszkóp szükséges, az elektronáram pontos mé-



16—18. ábra. Krónikus granulocitás leukémiás beteg granulocitáinak elektronmikroszkópos kenete és röntgen-sugár mikroanalízise. 16. ábra: Elektronmikroszkópos kenet részlete, festetlen készítmény. A denz foltok a STEM üzemmódban végzett analízis helyei. 10 000×. 17. ábra: a sejtmag jellemző elemösszetétele. 18. ábra: a citoplazma jellemző elemösszetétele. N = sejtmag, C = citoplazma. A rézcsúcs a hordozó rostélyból származik.

résének lehetőségével. Az adatokat a számos figyelembe veendő paraméter miatt célszerű komputerrel feldolgozni. Ideális esetben 10%-os pontossággal vizsgálható az elemek kvantitatív megoszlása (SCHUMAN et al. 1976), elsősorban fagyasztott ultravékony metszeteken (SOMLYO et al. 1979), illetve megfelelő paraméterek alkalmazásával ez a pontosság fokozható (JÁNOSSY és mtsai 1979). Elektronmikroszkópunkhoz adaptálva, a Hall módszertől eltérő alapon kidolgoztunk egy kvantitatív kiértékelési módszert, melyet a továbbiakban biológiai mintákon szeretnénk alkalmazni (KESZTHELYI és TÓTH 1979).

IRODALOM

1. APPLETON, T. C.: A cryostat approach to ultrathin "dry" frozen sections for electron microscopy: a morphological and X-ray analytical study. J. Microscopy **100**, 49—74 (1974).
2. BERNOLÁK, K., SZABÓ, D., SZILAS, L.: Analitikai elektronmikroszkópia, A mikroszkóp zsebkönyv. 550—553. Műszaki Könyvkiadó (1979).
3. BOLDÓCZKI, M., PÁRDUCZ, Á., JOÓ, F.: Appraisal of the potassium ferricyanide method for the demonstration of glycogen granules by electron microscopy. Micron **8**, 201—206 (1977).
4. CHANDLER, J. A.: The application of X-ray microanalysis in TEM to the study of ultra thin biological specimen — a review. In: Electron Probe Microanalysis in Biology Ed: Erasmus, D. A. London, Chapman and Hall (1978).

5. CHRISTENSEN, A. K.: Frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy, with a description of pancreas and liver. J. Cell. Biol. **51,** 772—804 (1971).
6. CLARKE, J. A., SALSBURY, A. J., WILLOUGHBY, D. A.: Application of electron probe microanalysis and electron microscopy to the transfer of antigenic material. Nature **277,** 69—71 (1970).
7. COSTA, J. L., TANAKA, Y., PETTIGREW, K., CUSHING, R. J.: Evaluation of the utility of air-dried whole mounts for quantitativ electron microprobe studies of platelet dense bodies. J. Histochem. Cytochem. **25,** 1079—1086 (1977).
8. DAVIS, W. L., JONES, R. G., HAGLER, H. K.: Calcium containing lysosomes in the normal chich duodenum: A histochemical and analytical electron microscopic study. Tissue and Cell **11,** 127—138 (1979).
9. DE BELLEROCHE, J. J., BRADFORD, H. F.: Metabolism of beds of mammalian cortical synaptosomes: response to depolarizing influences. J. Neurochem. **19,** 585—602 (1972).
10. DUCE, I. R., KEEN, P.: Can neuronal smooth endoplasmic reticulum function as a calcium reservoir? Neuroscience **3,** 837—848 (1978).
11. DUX, E., TÓTH, I., DUX, L., JOÓ, F., KISZELY, GY.: The possible cellular mechanism of 2,4-dichlorophenoxyacetate-induced myopathy. FEBS Letters **82,** 219—222 (1977).
12. DUX, E., TÓTH, I., DUX, L., JOÓ, F.: The localization of calcium by X-ray microanalysis in myopathic muscle fibers. Histochemistry **56,** 239—244 (1978).
13. ERASMUS, D. A.: Electron Probe Microanalysis in Biology London, Chapman and Hall (1978).
14. HAJÓS, F.: An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain Res. **93,** 485—489 (1975).
15. HALÁSZ, N., PÁRDUCZ, Á., KARNYUSHINA, I., TÓTH, I., JOÓ, F.: The zinc iodide-osmium (ZIO) reaction in the central nervous system: localization and relations to functional activity. Z. mikrosk.-anat. Forsch. Leipzig **93,** 404—416 (1979).
16. HALL, T. A.: Physical Techniques in Biological Research. I. A. 2nd ed. G. Oster ed. Academic Press New York. Chap. 3. (1971).
17. HENKART, M. P., REESE, T. S., BRINLEY, F. J. Jr.: Endoplasmic reticulum sequesters calcium in the squid giant axon. Science **202,** 1300—1303 (1978).
18. HILLMAN, D. E., LLINAS, R.: Calcium containing electron-dense structure in the axons of the squid giant synapse. J. Cell. Biol. **61,** 146—155 (1974).
19. HODSON, S., WILLIAMS, L.: Ultramicrotomy shows the cristae of mitochondria. Experientia **30,** 834 (1974).
20. HUI, S. W., COSTA, J. L.: Topography and thickness of air-dried human platelets measured by correlative transmission and scanning electron microscopy. J. Microscopy **115,** 203—206 (1979).
21. JÁNOSSY, A. G. S., KOVÁCS, K., TÓTH, I.: Parameters for the ratio methods by X-ray microanalysis. Anal. Chem. **51,** 491—495 (1979).
22. JOÓ, F., ERDÉLYI, L., HALÁSZ, N.: Binding of barium to neurosecretory granules in the snail brain: a possible molecular mechanism of neurohormone release. Neuroscience Letters **6,** 187—191 (1977).
23. JOÓ, F., KARNYUSHINA, I.: Az agyi kapillárisok pinocitozisának és makromolekuláris transzportjának cAMP-mediált szabályozása. MTA Biol. Oszt. Közl. **21,** 300—309 (1978).
24. JOÓ, F., TÓTH, I.: X-ray microanalysis of peripheral nerve of rat. Balaton Conference on Electron Microscopy Proceedings BT 3—4. (1975).
25. KESZTHELYI, L., TÓTH, I.: Mikroelemek koncentrációjának meghatározása vékony biológiai metszeteken. XI. Magyar Elektronmikroszkópos és Mikroanalízis Konferencia Kiadványa 203—206 (1979).
26. LÄUCHLI, A.: Precipitation technique for diffusible substances. Microscopie Biol. Cell. **22,** 239—246 (1975).
27. OSCHMAN, J. L., HALL, T. A., PETERS, P. D., WALL, B. J.: Association of calcium with membranes of squid giant axons. Ultrastructure and microprobe analysis. J. Cell. Biol. **61,** 156—165 (1974).
28. PÁRDUCZ, Á., JOÓ, F.: Visualization of stimulated nerve endings by preferencial calcium accumulation of mitochondria. J. Cell. Biol. **69,** 513—517 (1976).
29. REYNOLDS, M. D.: Liver parenchimal cell injury. I. Initial alteration of the cell following with carbon tetrachloride. J. Cell. Biol. **19,** 139—157 (1963).
30. SHUMAN, H., SOMLYO, A. P.: Electron probe X-ray analysis of single ferritin molecules. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **73,** 1193—1195 (1976).
31. SHUMAN, H., SOMLYO, A. V., SOMLYO, A. P.: Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: methods and validity. Ultramicroscopy **1,** 317—339 (1976).

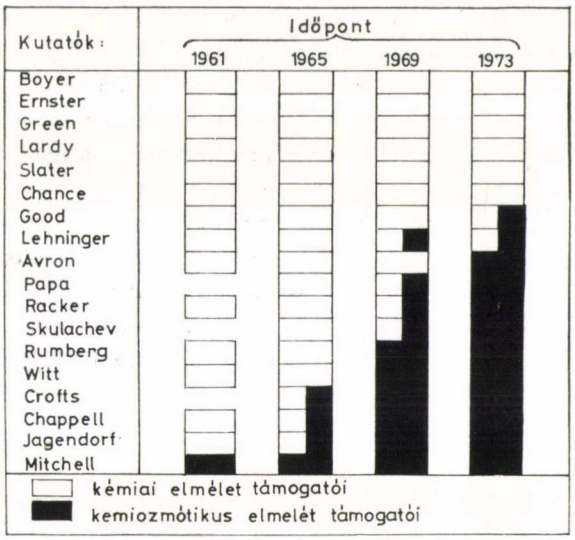
32. SILBERGELD, E. K., COSTA, J. L.: Synaptosomal Ca metabolism studied by electron microprobe analysis. Exp. Neurol. **63,** 277—292 (1979).
33. SOMLYO, A. P., SOMLYO, A. V., SHUMAN, H.: Electron probe analysis of vascular smooth muscle. Composition of Mitochondria, nuclei and cytoplasm. J. Cell. Biol. **81,** 316—335 (1979).
34. SPURR, A. R.: Freeze substitution additives for sodium and calcium retention in cells studied by X-ray analytical electron microscopy. Botanical Gazette **133,** 263—270 (1972).
35. TAKAYA, K.: Energy dispersive X-ray microanalysis of zymogen granules of mouse pancreas using fresh air dried tissue spread. Arch. histol. jap. **37,** 387—393 (1975).
36. THIERS, R. E., REYNOLDS, E. S., VALLAE, B. L.: The effect of carbon tetrachloride poisoning on subcellular metal distribution in rat liver. J. Biol. Chem. **235,** 2130—2133 (1960).
37. TÓTH, I., JOÓ, F., TÓTH, T.: Elektronmikroszkópos kenetek röntgensugár mikroanalízise. X. Magyar Elektronmikroszkópos Konferencia Kiadványa 21. o. (1977).
38. TÓTH, I.: Comparative evaluation of different techniques used to detect the elemental composition of nervous structures by X-ray microanalysis. Royal Microscopical Society Proceedings **13,** 33 (1978).
39. TÓTH, T., TÓTH, I., MAURER, M., KRIZSA, L.: X-ray microanalysis of leukaemic and healthy granulocytes. Symposium on X-ray microanalysis, Szeged 12. o. (1978).
40. WEINBACH, E. C., VON BRAND, T.: The isolation and composition of dense granules from Ca-loaded mitochondria. Biochem. Biophys. Research. Commun. **19,** 133 (1965).

MITCHELL KEMIOZMOTIKUS ELMÉLETE A MITOKONDRIÁLIS ION-TRANSZPORT FOLYAMATOK TÜKRÉBEN*

LIGETI ERZSÉBET

Semmelweis OTE Klinikai Kísérleti Kutató és II. sz. Élettani Intézet, Budapest

Az 1940-es évektől a sejtbiológiai ismeretek szaporodásával egyre inkább előtérbe kerültek a mitokondriumokban és más biológiai membránokban zajló energia-átalakító folyamatok. A fő probléma: a szubsztrátok oxidatív lebontásából származó energia hogyan alakul át magas energiájú kémiai kötéssé, azaz ATP-vé? Kezdetben a glikolízis során végbemenő, szubsztrát-szintű foszforilációhoz hasonló, tisztán kémiai mechanizmust tételeztek fel (SLATER 1953). Eszerint a légzési lánc valamelyik tagjából magas energiájú vegyület keletkezik, amelyről egy vagy több intermedieren keresztül végülis ADP-re kerül át a magas energiájú kötés. Ezen időszakban a kutatások főként magas energiájú, kovalens kötéseket tartalmazó közti termékek kimutatására irányultak. Részben ezen próbálkozások sikertelensége vezette Mitchellt arra



1. ábra. A Mitchell-teória támogatói (fekete téglalapok) és ellenzői (üres téglalapok) MITCHELL 1976 nyomán

* A IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

hogy alapjaiban új mechanizmust keressen. Kemiozmotikus elméletében a légzési lánc és az ATP szintézis közötti kapocs nem egy kémiai vegyület, hanem a membrán két oldala között kialakuló elektrokémiai potenciál-különbség. Ez volt az a merőben új gondolat, amely olyan sok vitát váltott ki, s amelyet — mint az 1. ábra mutatja — csak igen lassan fogadtak el a kutatók. S bár az utóbbi években az elmélet alapjait már senki sem kérdőjelezte meg, a részletes elképzelés körül — mint a későbbiekben látni fogjuk — továbbra is élénk vita folyik.

A kemiozmotikus elmélet lényege

Az első közleményben (MITCHELL 1961) 4 postulátumban foglalta össze az elméletet.

1. A mitokondrium belső membránjában egy anizotróp ATP-áz rendszer foglal helyet, amelynek aktív centruma H^+ ionok számára csak a membrán egyik oldala felől megközelíthető, OH^- ionok számára viszont csak a másik oldal felől. Így az enzim működésével kapcsolatban H^+ vándorlás jön létre a membrán által elválasztott két vizes fázis között, ami H^+ elektrokémiai potenciál-különbség kialakulásához vezet. Ez egyben azt is jelenti, hogy az enzim működésének irányát a két vizes fázisban fennálló H^+ elektrokémiai aktivitás aránya fogja meghatározni. MITCHELL 1961 számításai szerint ahhoz, hogy az ATP/ADP arány 1 legyen, a membrán két oldala között 7 egység pH-különbségnek vagy 420 mV membránpotenciálnak kell kialakulnia (ezen számításokhoz az anorganikus foszfát koncentrációját 10 mM-nak vette).

2. A membránban elhelyezkedő oxido-redukciós rendszer (a légzési lánc) miközben a szubsztrátból származó elektronokat az oxigénhez juttatja el, egyidejűleg H^+-kat mozgat a membránon keresztül, s így H^+ elektrokémiai potenciál-különbséget alakít ki a két vizes fázis között.

3. A membrán ion-transzlokátorokat is tartalmaz, amelyek 1:1 arányú H^+-kation vagy OH^--anion kicserélést végeznek. Ezek működése a fennálló pH-különbség csökkenését és a membrán-potenciál növekedését eredményezi.

4. Az előbbi 3 rendszer töltött részecskék számára igen alacsony permeabilitású membránban foglal helyet. Ha a membrán H^+-permeabilitása foko-

Rövidítések

ATP — adenozin-trifoszfát
ADP — adenozin-difoszfát
BLM — black lipid membrane
BM — n-butil-malonát
DNP — 2,4-dinitrofenol
DTT — dithiothreitol
FCCP — p-trifluormetoxi(karbonilcianid)fenilhidrazon
NAD — nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
NEM — N-etilmaleimid
TMPD — N, N, N', N'-tetrametil-1H-fenilendiammoniumdiklorid

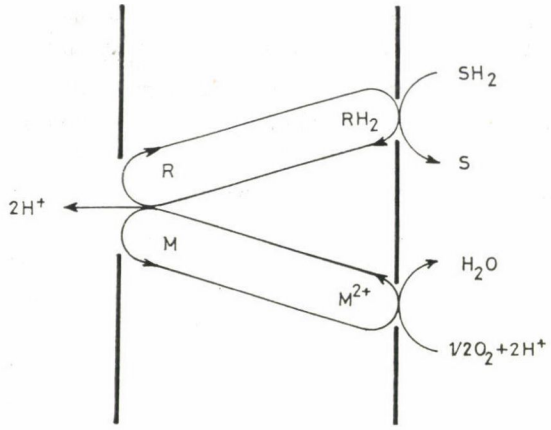
zódik, a rendszer hatékonysága romlik és szétkapcsolás jön létre. Ezt lipidoldékony reagensek (pl. DNP) okozhatják, amelyek H^+ vagy OH^- ionok ekvilibrálódását teszik lehetővé a membránon keresztül.

A kemiozmotikus elmélet alapján érthető, miért voltak sikertelenek a magas energiájú intermedierek kimutatására irányuló kísérletek. Legnagyobb előnye azonban, hogy megmagyarázza, az oxidatív és a fotoszintetikus foszforiláció miért kötött membrán strukturához.

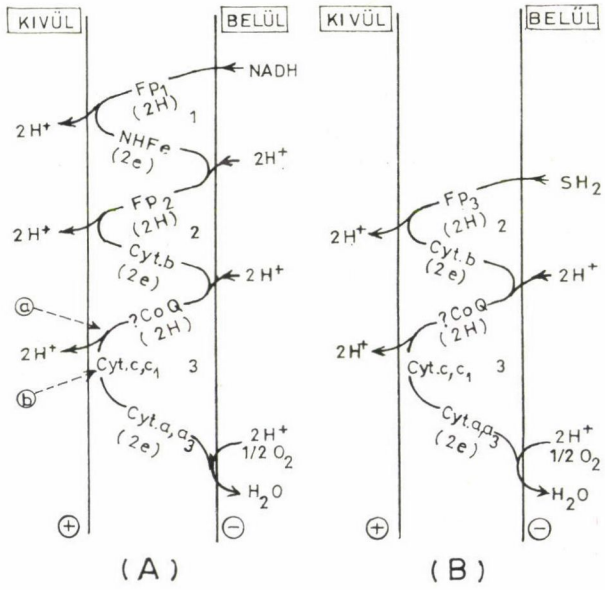
MITCHELL 1961-ben az egész teóriát elméleti megfontolásokra alapozta, a kísérleti bizonyítás több, mint 10 évig tartott. Néhány alapvető kísérleti adat birtokában (MITCHELL és MOYLE 1965) 1966-ban részletesebb formában is kifejtette elképzeléseit (MITCHELL 1966), amelyben már az oxidoredukciós lánc H^+-transzlokáló működésének mechanizmusára is kitért. A légzési lánc — a 2. ábrán látható módon — két részből állna: egy H-t transzportáló (R) és egy elektront transzportáló (M) összetevőből, amelyek a membránban hurkot képeznek. A H-karrier tehát a membrán belső oldalán átvesz 2 H atomot az oxidálandó szubsztráttól. A külső felszín közelében 2 elektront átad a légzési lánc következő, elektront szállító tagjának, 2 H^+ iont pedig kipumpál a mitokondriumon kívüli térbe. Önmaga oxidált állapotban visszatér a membrán belső felszínére. Az elektron-karrier viszont a belső felszín közelében adja át a 2 elektront az oxigénnek és oxidált állapotában a külső felszín felé halad. Végeredményben 2 H^+ tűnt el a belső térből, és 2 H^+ jelent meg a mitokondriumon kívüli térben. A folyamat közben 1 molekula ATP termelődik. A 3. ábra mutatja ezt az elképzelést az egész légzési láncra alkalmazva. Látható, hogy NAD-függő szubsztrát esetén (3A ábra) a légzési lánc 3 hurkot képez, s miközben 2 elektront juttat el a szubsztrátról az oxigénre, összesen $3 \times 2 = 6$ H^+-t pumpál ki és 3 molekula ATP-t szintetizál. Szukcinát szubsztrát esetén (3B ábra) viszont csak 2 hurkot képez és összesen 4 H^+ jelenik meg a külső térben, miközben 2 molekula ATP keletkezik. A légzési lánc H^+-transzportáló működésének ezen elképzelése a „hurok-teória", amelynek lényege tehát, hogy 2 elektron végighaladása a szubsztráttól az oxigénig hurkonként 2 H^+ kipumpálásával jár együtt. Egy hurok tulajdonképpen 1 molekula ATP szintézisének megfelelő energiát biztosít, tehát ez ún. magas energiájú hely — angol kifejezéssel „site" —, rövidítve $\sim$.

Mitchell elképzelése szerint az ATP-áz rendszer hasonlóan szigorú sztöchiometriával, de a légzési lánccal ellentétes irányban működik. Tehát amennyi H^+ jelenik meg a szubsztrát-oxidáció során a külső térben, ugyanannyi kerül vissza az ATP-áz rendszeren keresztül az ATP szintézise során. Fennáll tehát a következő egyenlőség:

$$\frac{\text{ATP}}{\text{O}} = \frac{\text{H}^+/\text{O}}{\text{H}^+/\text{ATP}}$$



2. ábra. A transzmembrán H^+-transzport Mitchell-féle hurok-teóriája. MITCHELL 1966 nyomán



3. ábra. A mitokondrium légzési lánca a hurok-teória alapján. GREVILLE 1969 nyomán

A $H^+/\sim = 2$ arány feltételezése egyben azt is jelenti, hogy Mitchell számításai szerint az ATP/ADP = 1 arány eléréséhez a membrán két oldala közötti 3,5 egységnyi pH-különbség vagy 210 mV membrán-potenciál kialakulása is elegendő.

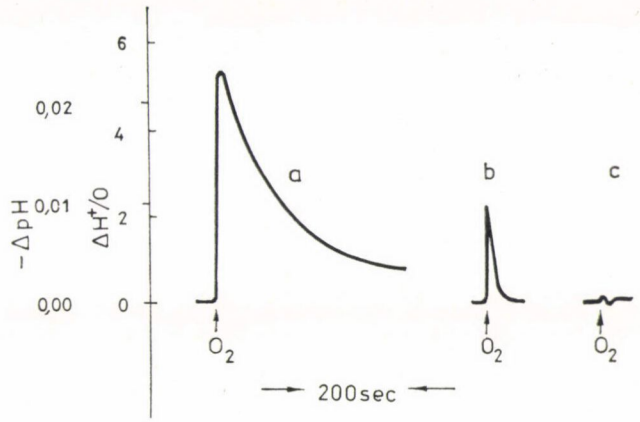
A kemiozmotikus elmélet bizonyítékai

1. A H^+-transzlokáló ATP-áz rendszer

Az ATP lebontás során történő H^+-vándorlást elsőként MITCHELL mérte meg (MITCHELL és MOYLE 1965). Kis mennyiségű ATP hozzáadása után a külső közeg pH-változását regisztrálták. Négy kísérlet átlagában — bonyolult korrekciók után — úgy találták, hogy 1 molekula ATP elbontása során 1,88 H^+ jelenik meg a külső környezetben, tehát a H^+/ATP arány kerekítve 2 volt.

2. A légzési lánc H^+-transzportáló működése

Ezen a téren szintén MITCHELL közölte az első kísérleteket (MITCHELL és MOYLE 1965, 1967b). Anaerob, szubsztrátot tartalmazó mitokondrium-szuszpenzióhoz kis mennyiségű oxigént adtak, és mérték a külső közeg pH-változását (4. ábra). A kezdeti gyors savanyodás a légzéssel kapcsolatos H^+-kipumpálásnak, az ezt követő lassú lúgosodás pedig a membránon keresztül történő fokozatos H^+-visszaáramlásnak felel meg. Az ordinátán már a H^+/O érték is fel van tüntetve, β-hidroxibutirát szubsztrát esetén ez 5,45 volt (4A ábra). A kezdeti H^+-visszaáramlást is korrekcióba véve 16 kísérlet átlaga 5,90 $\pm$ 0,33. Szukcinát szubsztráttal a H^+/O érték 4,07 $\pm$ 0,11. A 4C ábra ugyanezt a kísérletet mutatja Triton X-100 detergens jelenlétében, tehát elroncsolt membrán struktúrán, ahol az oxigén hozzáadása nem okoz pH-változást. Mivel 1 atom oxigén elhasználásával β-hidroxibutirát esetén 3, szukcinát esetén 2 molekula ATP termelődik, a $H^+/\sim$ arány mindkét szubsztrátnál 2. Tulajdonképpen ezekre a kísérletekre alapozta Mitchell a hurokteóriát.



4. ábra. Oxigén hatására létrejövő mitokondriális H^+-ejectio. A közeg tartalmaz: a. szubsztrátot, b. szubsztrátot és szétkapcsoló szert, c. szubsztrátot és Triton X—100 detergenst. MITCHELL and MOYLE 1965 nyomán

SKULACHEV és munkacsoportja bizonyította be, hogy mind szubsztrát-oxidáció, mind ATP-hidrolízis során izolált mitokondriumokban és szubmitokondriális partikulumokban egyaránt kialakul membrán-potenciál (GRINIUS et al. 1970, BAKEEVA et al. 1970). Kémiailag igen különböző szerkezetű, szintetikus lipid-oldékony kationok és anionok felvételét mérték. A mitokondrium membrán energizálása (bármilyen oxidálható szubsztráttal, vagy ATP-vel) kation-felvételt és a külső közeg savanyodását eredményezte, ilyenkor az előzetesen akkumulált anion leadása is megtörtént. Deenergizálás (a légzés gátlása, vagy oligomycin adása ATP-energizálás esetén, vagy szétkapcsoló anyag jelenléte) mindezeket a folyamatokat megfordítja. Szubmitokondriális partikulumokban az energizálás anion-felvételt és a közeg lúgosodását okozza — összhangban avval, hogy ezen részecskék membránja az intakt mitokondriumhoz képest ki van fordítva. Mindkét kísérleti objektum esetén csak az ion töltése volt lényeges, igen különböző kémiai szerkezetű ionokkal reprodukálhatók voltak a jelenségek. Tehát az energizálás hatására a membrán két oldala között kialakuló elektromos potenciál-különbség az ion-felvétel hajtóereje.

A szintetikus kationok légző mitokondriumokon ugyanolyan hatásokat hoztak létre, mint amit korábban már Ca^{2+}-felvétel (CHANCE 1965), ill. valinomycinnel indukált K^+-akkumuláció (összefoglalva PRESSMAN 1976) során leírtak: átmeneti légzésfokozódás és NADH-oxidáció, egyidejű H^+-ejectio és permeáló anion jelenlétében duzzadás. Ez viszont arra enged következtetni, hogy a természetes és a szintetikus kationok felvétele hasonló mechanizmussal megy végbe.

A H^+ elektrokémiai potenciál-grádiens két összetevőjét — a pH-különbséget és a membrán-potenciált — először MITCHELL próbálta megmérni (MITCHELL és MOYLE 1969) — erősen indirekt módszerekkel. A későbbi években finomabb technikák terjedtek el mind a ΔpH, mind a membrán-potenciál mérésére (ROTTENBERG 1975). Bár az abszolút értékek az egyes szerzőknél jelentősen eltérnek, abban megegyeznek a közlemények, hogy légző mitokondriumban 100 mV nagyságrendű, belül negatív membrán-potenciált és 0,3—0,8 egységnyi pH-különbséget (kívül savanyú) találtak.

3. Ion-karrierek a mitokondrium membránjában

Az 1960-as évek második felében egymás után írták le a különböző ion-transzportáló rendszereket a mitokondrium membránban: a foszfát karriert (FONYÓ és BESSMAN 1968, FONYÓ 1968, TYLER 1968, TYLER 1969), a di- és a trikarboxilát karriert (CHAPPELL és HAARHOFF 1967, MEIJER 1971), az adenin-nukleotid karriert (BRUNI 1966, CHAPPELL és CROFTS 1965, összefoglalva FONYÓ et al. 1976). Ezek mind kicseréléses diffuziót végeznek, a következő specificitással:

foszfát-karrier $H_2PO_4^- — OH^-$
$H_2PO_4^- — H_2PO_4^-$ kicserélés

dikarboxilát-karrier dikarboxilát^{2-} — dikarboxilát^{2-}
dikarboxilát^{2-} — HPO_4^{2-} kicserélés

trikarboxilát-karrier trikarboxilát^{2-} — trikarboxilát^{2-}
trikarboxilát^{2-} — dikarboxilát^{2-}

adenin nukleotid-karrier ADP^{3-} — ATP^{4-} kicserélés

Érdemes megfigyelni, hogy a foszfát-karrier működésével a foszfát transzport irányába még egy H^+ transzportja is történik (HOEK et al. 1971), az adenin nukleotid-karrier működése pedig egy elektromos töltést mozgat a membránon keresztül (LANOUE et al. 1978, KLINGENBERG és ROTTENBERG 1977). A többi karrier nem okoz sem elektromos, sem pH-változást a membrán két oldala között.

4. Az alacsony permeabilitású membrán

A mitokondrium membrán H^+-permeabilitását először MITCHELL mérte meg (MITCHELL és MOYLE 1967a): légzés-gátolt mitokondrium szuszpenzió pH-ját regisztrálta, s kis adag savval vagy lúggal létrehozott pH-változás lassú lecsengéséből számította a membrán H^+-konduktivitását. pH = 7,2-nél 0,45 μohm/cm^2 értéket kapott, ami az ismert természetes membránok közül messze a legalacsonyabb.

Másrészt a szétkapcsoló anyagok hatását tanulmányozták. MITCHELL és MOYLE 1967a mérései szerint DNP valamint FCCP mintegy 10—15-szörösére fokozta a mitokondrium membrán H^+-konduktivitását. A 4B ábra is mutatja, hogy FCCP szétkapcsoló jelenlétében alkalmazva az oxigén-pulzust, lényegesen kisebb pH-változást tapasztalunk, a lecsengés fázisa viszont jelentősen gyorsabb.

Mások mesterséges lipid membránokban vizsgálták a szétkapcsoló anyagok hatását, és az elektromos vezetőképesség fokozódását észlelték (CHAPPELL és HAARHOFF 1967, BIELAWSKI et al. 1966, TING et al. 1970) amelyet a H^+-permeabilitás növekedésével lehetett magyarázni (HOPFER et al. 1968). SKULACHEV et al. 1967 még korrelációt is talált a H^+-permeabilitást fokozó és a szétkapcsoló hatás között.

Látjuk tehát, hogy MITCHELL mind a négy posztulátuma az évek folyamán igazolódott, mindaz, amit 1961-ben elméleti megfontolások alapján írt le, kísérletes bizonyítást nyert.

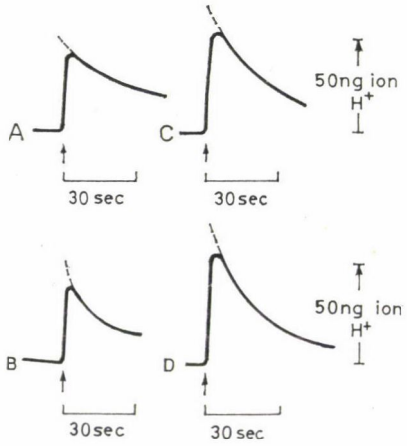
Viták a $H^+/\sim$ sztöchiometria körül

A MITCHELL által mért (MITCHELL és MOYLE 1965, 1967b) majd a hurok-teóriába beillesztett $H^+/\sim = 2$ arány körül az utóbbi években igen élénk vita alakult ki.

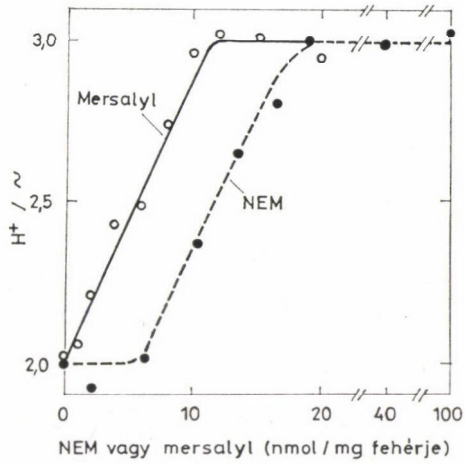
A szerzők egy része termodinamikai megközelítésből indul ki (SLATER et al. 1973, NICHOLLS 1974, 1977, WIECHMANN et al. 1975, ROTTENBERG 1975). Megmérték a mitokondrium belső membránjának két oldala között kialakuló H^+ elektrokémiai potenciál-különbséget ($\Delta\mu_{H^+}$) valamint ugyanezen körülmények között az ADP, ATP és az anorganikus foszfát koncentrációját, ez utóbbiakból számították az ATP-szintézishez szükséges szabadenergia változást (a foszforilációs potenciált). Úgy találták, hogy $2H^+/\sim$ arányt feltételezve, a létrejött $\Delta\mu_{H^+}$ nem biztosítja az ATP-szintézishez szükséges energiát.

A kutatók másik része az ion-transzport folyamatok vizsgálata alapján vonta kétségbe a $H^+/\sim = 2$ sztöchiometriát. E vizsgálatok nagy részét LEHNINGER munkacsoportja közölte.

BRAND et al. 1976b negismételték MITCHELL méréseit (MITCHELL és MOYLE 1965, 1967): anaerob mitokondrium-szuszpenzióhoz oxigént adtak, és mérték a külső közeg pH-változását (5. ábra). A légzés során történő H^+-kipumpálás azonban csak akkor mérhető helyesen a külső közeg pH-változása alapján, ha minden más, H^+-mozgással kapcsolatos folyamatot kiküszöbölünk. A foszfát-karrier már említett sajátsága ($H_2PO_4^- — OH^-$ kicserélés) miatt kezdték az említett szerzők az anorganikus foszfát szerepét vizsgálni a $H^+/\sim$ meghatározásban. Az 5. ábra görbéi oxigén-pulzus után észlelhető pH-változást mutatnak működő (5A és 5B) és NEM-del gátolt (5C és 5D) foszfát-karrier esetén. A regisztrátumon is látható, hogy C és D



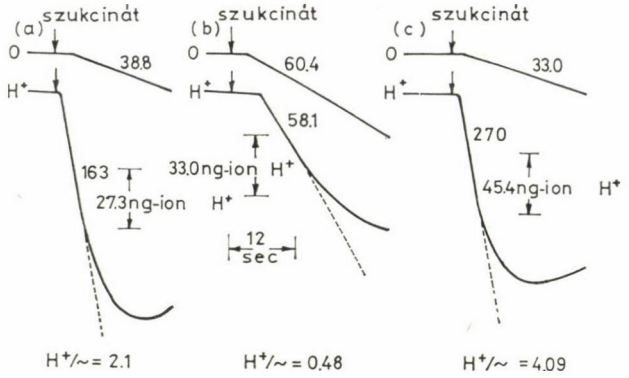
5. ábra. Oxigén hatására létrejövő mitokondriális H^+-ejectio. A, B: működő foszfát-karrier, C, D: NEM-del gátolt foszfát-karrier. BRAND et al. 1976b nyomán



6. ábra. A $H^+/site$ arány a foszfát-karrier aktivitásának függvényében. BRAND et al. 1976b nyomán

görbék magasabbak, mint A és B görbék, tehát ugyanannyi oxigén hozzáadása után NEM jelenlétében több H^+ megjelenése mérhető az extramitokondriális térben. A kezdeti H^+-visszaáramlást is korrekcióba véve A és B esetben a $H^+/\sim = 2$, C és D esetben viszont $H^+/\sim = 3$. Meggyőző a 6. ábrán látható kísérletük: a foszfát-karriert mersalyllal, ill. NEM-del titrálták, és mérték a $H^+/\sim$ ($H^+/site$) arány változását, amely fokozatosan emelkedett 2-ről 3-ra. A titrálás megfelel a foszfát-karrier más rendszerekben közölt titrálási görbéjének (FONYÓ et al. 1975). BRAND et al. 1976b azt is megmérték, hogy a mitokondriumok anaerob körülmények között (így pl. a preparálás és a kísérlet elvégzése közötti tárolás idején) foszfát-tartalmuk igen jelentős részét elvesztik, majd a légzés megindulásakor visszaveszik. Tehát foszfát-mentes médiumot használva is mindig jelen van bizonyos mennyiségű, a mitokondriumokból származó anorganikus foszfát.

REYNAFARJE et al. 1976 viszont aerob mitokondrium szuszpenzióban szubsztráttal indította a légzést és egyidejűleg mérte a külső közegben az oxigén tenzió és a H^+-koncentráció változását (7. ábra). A görbék kezdeti, lineáris szakaszainak sebességéből számoltak. Foszfát-mentes médiumban, működő foszfát-karrier esetén (7a ábra) $H^+/\sim = 2$; 0,5 mM foszfátot tartalmazó médiumban működő foszfát-karrier esetén az érték 0,5 (7b ábra); gátolt foszfát-karrier mellett azonban $H^+/\sim = 4$ (7c ábra). Nem tisztázott, hogy a kétfajta kísérlet (a légzés oxigénnel, ill. szubsztráttal való indítása) között mi a különbség, és miért kaptak $H^+/\sim$ aránynak az egyik esetben maximálisan 3-at, a másik esetben pedig 4-et. Az azonban világos mindkét fajta kísérletből, hogy a légzéssel egyidejűleg történő foszfát-felvétel meghamisítja — csökkenti — a mért $H^+/\sim$ arányt. Továbbá az is nyilvánvaló, hogy a foszfát-felvétel kiküszöbölése után a $H^+/\sim$ arány 2-nél több.

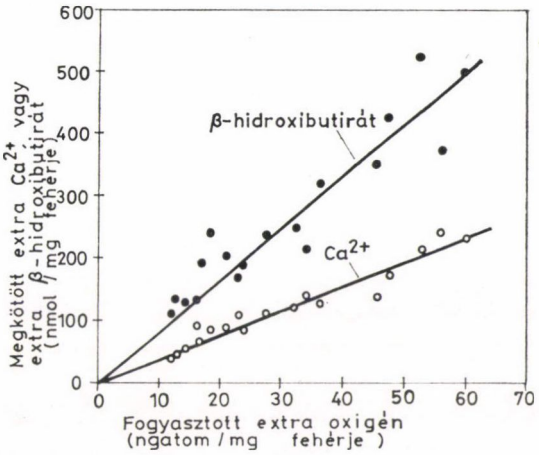


7. ábra. A H^+/site arány számítása az oxigén-fogyasztás és a H^+-ejectio kezdeti sebessége alapján. *a)* a közeg nem tartalmaz kívülről bevitt foszfátot, *b)* 0,5 mM anorganikus foszfátot tartalmaz a közeg, *c)* 0,5 mM anorganikus foszfátot és NEM-et tartalmaz a közeg. REYNAFARJE et al. 1976 nyomán

A továbbiakban a kation-felvétel alapján próbáltak a $H^+/\sim$ arányra következtetni. Már BAKEEVA et al. 1970 kísérleteiből láttuk, hogy a légzés megindulásakor kialakuló membrán-potenciál elektroforetikus kation-felvételt tesz lehetővé. Ez azonban csak akkor lesz jelentős mértékű, ha permeáló, gyenge sav-anion is jelen van. LEHNINGER 1974 szerint ilyenkor a pH-különbség hatására a gyenge sav bejut a mitokondrium belsejébe, ott H^+-t disszociál le, evvel támogatja a légzési lánc H^+-pumpa működését, a benn maradó anion pedig a membrán-potenciált növelve jelentős mértékű kation-felvételt tesz lehetővé. Ily módon a bekerült anion mennyisége tulajdonképpen a kation-felvétel során kipumpált H^+ ionok számára utal.

BRAND et al. 1976a a mitokondriumok kalcium és β-hidroxibutirát felvételét, valamint az oxigén-fogyasztást mérték (8. ábra). Légzési szubsztrát szukcinát volt, a bejutó β-hidroxibutirát oxidációját rotenonnal gátolták. Arra az eredményre jutottak, hogy 1 atom oxigén elfogyasztása árán 4 kalcium és 8 β-hidroxibutirát anion felvétele történik. Mivel szukcinát szubsztrát esetén 2 magas energiájú hely működik, $Ca^{2+}/\sim = 2$, β-hidroxibutirát$/\sim = 4$ és végeredményben $H^+/\sim = 4$ arányt mértek. Érdemes kiemelni, hogy ezen mérések szerint a felvett kalcium/β-hidroxibutirát arány 2, ami arra mutat, hogy a kalcium divalens kationként jut be a mitokondrium belsejébe. Ugyanerre a következtetésre jutunk AKERMAN 1978, valamint CHAPPEL et al. 1978 közleményéből, akik kálium-kalcium kicserélődést mérve $1\ Ca^{2+} = 2\ K^+$ arányt állapítottak meg. ROTTENBERG és SCARPA 1974 pedig a membrán-potenciált számították kálium, ill. kalcium megoszlás alapján. A kalcium töltését 2-nek véve, azonos értéket kaptak a kétféle ion-megoszlás alapján.

REYNAFARJE és LEHNINGER 1978 közleményében K^+-felvétel alapján határozták meg a $H^+/\sim$ arányt, így is 4-et mértek.



8. ábra. A mitokondriumok kalcium és β-hidroxibutirát felvétele az oxigén fogyasztás függvényében, szukcinát szubsztrát esetén. BRAND et al. 1976a nyomán

Viszont BRAND et al. 1976a kalcium-felvételen alapuló méréseit megismételve és a kalcium-kötődést is számításba véve (NICHOLLS 1977) kalcium/$\sim$ = 1,5 arány alapján a $H^+/\sim$ arány 3-nak adódott.

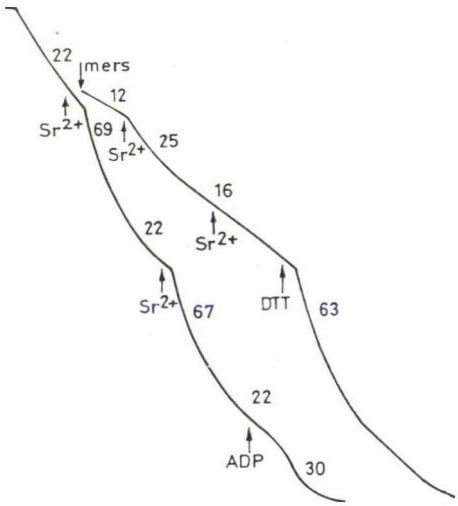
Az ismertetett irodalmi adatok — mint látjuk — egymásnak sok mindenben ellent mondanak, egy azonban közös mindhárom kísérlettípusban (a termodinamikai megközelítésben, a direkt H^+-kipumpálás, valamint az ion-felvétel alapján történő mérésben): a $H^+/\sim$ értéke több, mint 2.

MITCHELL — főként LEHNINGER munkacsoportjának kísérleteire reflektálva — újra megmérte a $H^+/\sim$ arányt, s továbbra is 2-nek, valamint a foszfát-transzporttól függetlennek találta (MOYLE és MITCHELL 1978). A kalcium-felvétel sztöchiometriáját vizsgálva a kalcium/H^+ arányt 1-nek mérte, tehát szerinte minden bejutó kalcium ion csak 1 pozitív töltés felvételét jelenti (MOYLE és MITCHELL 1977a). Az ellentmondó kísérleti tények magyarázatára speciális kalcium-foszfát symport mechanizmust tételezett fel a mitokondriumban (MOYLE és MITCHELL 1977b), amelyben $Ca_2^{4+}HPO_4^{2-}$ lenne a transzportált forma. Ez a komplex 2 nettó pozitív töltéssel rendelkezne, s így valóban létrejöhetne az a helyzet, hogy 1 kalcium ion belépése csak 1 pozitív töltés felvételét jelentené. A továbbiakban kalcium-monokarboxilát symport mechanizmust is feltételeztek (MOYLE és MITCHELL 1977c). MOYLE és MITCHELL 1977a kalcium/H^+ arány meghatározását később LEHNINGER technikai alapon cáfolta (REYNAFARJE és LEHNINGER 1977).

És itt kapcsolódnak saját kísérleteink az eddig részletezett gondolatkörhöz. A mi kérdésünk ugyanis az volt: szükséges-e anion-felvétel a mitokondriumok kation-felvételéhez? Ezen kérdés megválaszolásához az intramitokondriális foszfát szerepét kezdtük vizsgálni.

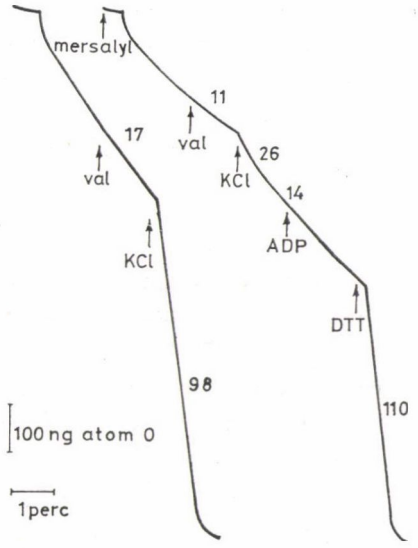
Az intramitokondriális foszfát-tartalom szerepe a kation-felvételben

Régóta ismert jelenség (CHANCE 1965), hogy ha légző mitokondriumokhoz kalciumot vagy stronciumot* adunk, a légzés átmenetileg fokozódik, majd amikor a kation elfogy a közegből, az oxigén-fogyasztás visszaáll eredeti, alacsony értékére (9. ábra). A légzésfokozódás az aktív kation-felvétellel kapcsolatos, és mindaddig kiváltható, amíg oldott oxigén van a közegben. Ha ugyanezt a kísérletet permeáló anion hiányában végezzük el (a 9. ábrán bemutatott kísérletben foszfát volt az egyetlen permeáló anion, ennek transzportját pedig mersalyllal gátoltuk), a stroncium hozzáadása sokkal rövidebb ideig tartó és kisebb mértékű légzésfokozódást okoz csak. Ez esetben újabb Sr^{2+}-adaggal a jelenség nem ismételhető. Ha viszont permeáló aniont adunk a rendszerhez (a bemutatott kísérletben a foszfát-karriert szabadítottuk fel DTT-vel), az oxigén-fogyasztás azonnal fokozódik. Ugyanez a jelenség mutatható ki KCl hozzáadásával, ha a membránt valinomycinnel K^+ számára permeabilissá tesszük (10. ábra). Permeáló anion nélkül (mersalyllal blokkolt foszfát-karrier) KCl hozzáadása is csak igen kismértékű légzés-fokozást vált ki.



9. ábra. Stroncium hatása a mitokondriumok oxigén-fogyasztására aktív és gátolt (mersalyllal) foszfát-karrier esetén

* A két kation transzportja és a transzporttal kapcsolatosan mérhető változások teljesen azonos módon zajlanak le. Nagy mennyiségű kalcium felvétele azonban strukturális változásokat és szétkapcsolást eredményez a mitokondriumban, míg stroncium-akkumuláció nem jár hasonló következményekkel. Ezért a következő kísérletek egy részében kalcium helyett stronciumot alkalmaztunk, így a két kationt a továbbiakban szinonimaként fogom használni.



10. ábra. KCl hatása valinomycin jelenlétében a mitokondriumok oxigénfogyasztására aktív és mersalyllal gátolt foszfát-karrier esetén

A továbbiakban a mitokondriumok endogén foszfát-tartalmát változtattuk s ennek hatását vizsgáltuk a kation-felvételre, gátolt foszfát-karrier mellett és minden más, permeáló anion távollétében (FONYÓ és LIGETI 1978a).

Légző mitokondriumok a közegből bizonyos mennyiségű foszfátot vettek fel, így sikerült megtölteni őket. A foszfát-karrier mersalyllal történő gátlása

1. táblázat

Káliummal, ill. stronciummal kiváltott extra oxigén-fogyasztás különböző endogén foszfát tartalmú mitokondriumokban

Anyagok sorrendje	Endogen foszfát (nmol/mg feh.)	Extra oxigén-fogyasztás (ngatom O/mg feh.)	
		K^+ (+val.)	Sr^{2+}
Valinomycin, mersalyl, szukcinát, P	19,2	2,9	5,0
Mersalyl, szukcinát, P	22,0	3,2	7,9
Szukcinát, P, mersalyl	33,0	4,7	10,8
Szukcinát, P, mersalyl, ADP, oligomycin	20,3	3,6	6,5
Mersalyl, szukcinát, P, ADP, oligomycin	21,2	2,7	7,0
Mersalyl, szukcinát, P	28,5	3,5	11,3
Szukcinát, P, mersalyl	37,0	5,0	13,2
Szukcinát, P, mersalyl, ADP, oligomycin	28,0	3,9	7,7

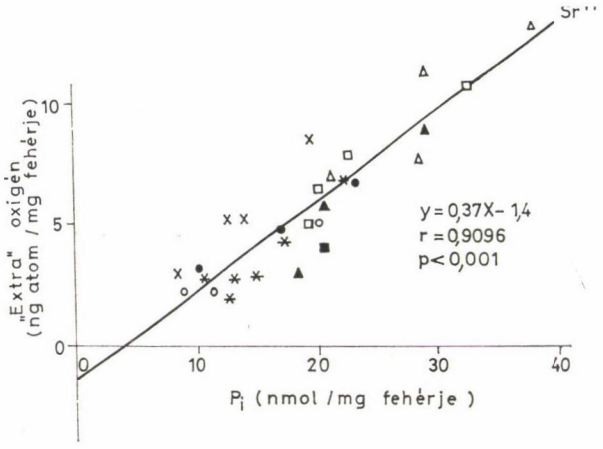
után, ADP jelenlétében az intramitokondriális foszfát-tartalom egy része ATP-szintézishez használódik fel. A keletkezett ATP későbbi lebomlását oligomycinnel gátoltuk. Ugyancsak foszfát-depléciót lehetett elérni, ha nem légző mitokondriumokból valinomycinnel K^+-kiáramlást hoztunk létre (1. táblázat). Ezen módszerekkel 7,8 és 38,7 nmol foszfát/mg fehérje szélső értékeket sikerült elérni, egy napi preparátumon általában 10—15 nmol/mg változást kaptunk.

Ezután a különböző endogén foszfát tartalmú mitokondriumokban vizsgáltuk a kation-felvétellel járó légzésfokozódás mértékét. (Az „extra" oxigén-fogyasztást LEHNINGER 1977 alapján számítottuk, ami azt jelenti, hogy a stimulált légzés sebességéből levonjuk a state 4 értékét.)

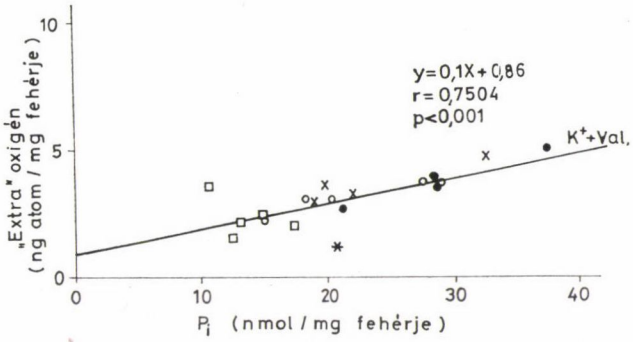
Két jellegzetes kísérletet tüntettünk fel az 1. táblázatban. Látható, hogy az intramitokondriális foszfát-tartalom növelésével fokozódik mind a káliummal (valinomycin jelenlétében), mind a stronciummal kiváltott extra oxigén-fogyasztás. Bármely módon történő foszfát-depléció viszont a kationokkal stimulált oxigén-fogyasztás csökkenését eredményezi.

Több kísérlet adatait összegzi a 11. ábra. A különböző jelölések különböző napi preparátumon kapott értékeket tüntetnek fel. Lineáris összefüggést találtunk a stronciummal kiváltott extra oxigén-fogyasztás mértéke és az endogén foszfát-tartalom között. Ezenkívül a stronciummal stimulált légzés sebessége is a mitokondriumon belüli foszfát-szint függvénye volt (nincs ábrázolva).

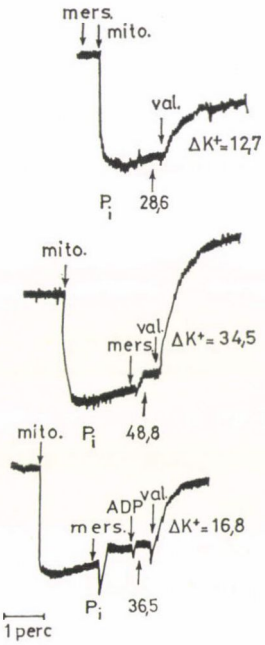
A valinomycin jelenlétében káliummal kiváltott extra oxigénfogyasztás szintén lineáris összefüggést mutatott az intramitokondriális foszfát-tartalommal (12. ábra). Jelentős különbséget tapasztaltunk viszont a kétféle kationnal kiváltott légzés-fokozódás abszolút értékei között. Mind az 1. táblázatban,



11. ábra. A stronciummal kiváltott extra oxigén fogyasztás és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggése



12. ábra. Káliummal valinomycin jelenlétében kiváltott extra oxigénfogyasztás és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggése



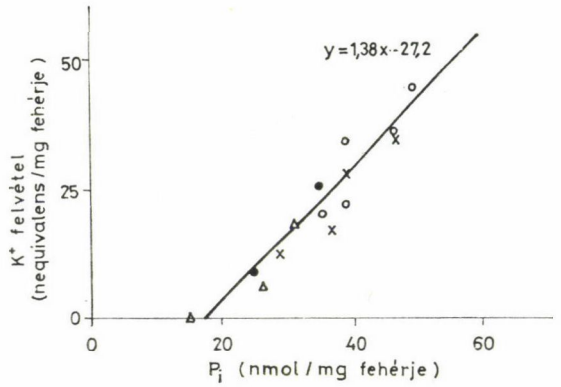
13. ábra. Valinomycinnel indukált kálium-felvétel különböző intramitokondriális foszfát-tartalom esetén

mind a regressziós egyenesek meredekségén látható, hogy Sr^{2+} mindig lényegesen nagyobb extra oxigén-fogyasztást okozott, mint K^+. Lehetséges, hogy a különbséget abban kell keresnünk, hogy a bejutott Sr^{2+} a mátrixban bizonyos mértékben oldhatatlan csapadékot képez, míg K^+ esetében ilyen jelenség nem játszódik le.

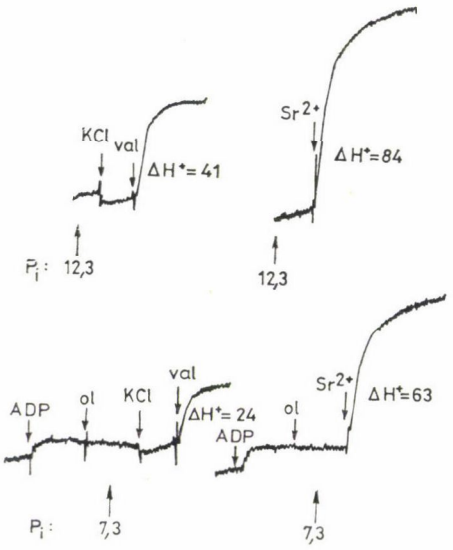
Felmerülhet a kérdés, hogy a kationokkal kiváltott légzés-stimulálás valóban aktív ion-felvételt tükröz-e? Ezt direkt, K^+-elektródos mérésekkel igazoltuk (Lukács G., Ligeti E., Fonyó A. — közlésre előkészítve). Ugyan-

csak gátolt foszfát-karrier mellett és minden egyéb permeáló anion távollétében mértük a valinomycin jelenlétében történő K^+-felvételt, miközben a már részletezett módon változtattuk a mitokondriumok endogén foszfát-tartalmát. Magasabb foszfát-szint valóban nagyobb K^+-felvételt eredményezett, míg foszfát-depléció hatására csökkent a K^+-felvétel (13. ábra). Több kísérlet összegezésekor ez esetben is megkaptuk a lineáris összefüggést (14. ábra).

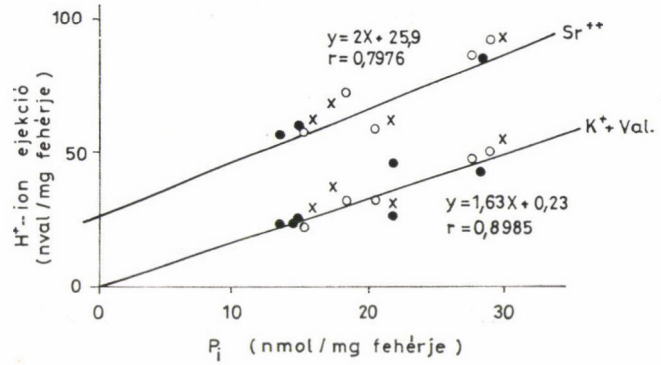
Eddigi eredményeink egyértelműen mutatják, hogy bizonyos mennyiségű kation — stroncium éppúgy mint kálium — felvétele kísérő anion nélkül is



14. ábra. A valinomycinnel indukált kálium-felvétel és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggése



15. ábra. Kation-felvételt kísérő H^+-ejectio foszfáttal megtöltött (felső sor) és foszfát-depletált (alsó sor) mitokondriumokból

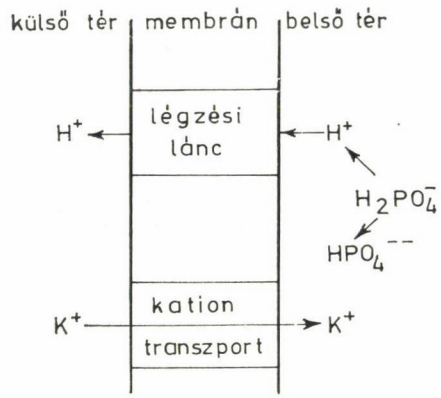


16. ábra. A kation-felvételt kísérő H^+-ejectio és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggése

végbemegy, s ezen kation-felvétel mértékét a mitokondriumon belüli anorganikus foszfát-szint határozza meg. Arra gondoltunk, hogy az intramitokondriális foszfát a légzési lánc H^+-pumpa működését segíti, s ezen keresztül szabályozza a kation-felvételt. Ez esetben a kation-akkumulációt kísérő H^+-ejectio és az endogén foszfát-szint között is kell összefüggést találnunk.

További kísérleteinkben ezt vizsgáltuk (Fonyó és Ligeti 1978b). Alacsony puffer-kapacitású elegyben érzékeny üvegelektróddal regisztráltuk a mitokondrium-szuszpenzió pH-ját. Az endogén foszfát-szintet változtatva mértük a K^++valinomycin, ill. Sr^{2+} hozzáadására bekövetkező pH-változást, amelyből megfelelő kalibráció segítségével számítottuk a H^+-ejectio mértékét. A 15. ábra felső görbéi foszfáttal megtöltött, alsó görbéi ADP-vel depletált mitokondriumon készültek. Látható, hogy foszfát-depléció csökkentette mind a K^++ valinomycinnel, mind a Sr^{2+}-mal kiváltott H^+-ejectiot. A 16. ábra ismét több kísérletet összegezve mutatja a H^+-ejectio és az intramitokondriális foszfát-tartalom összefüggését. A kapcsolat mindkét kation esetében lineáris, a Sr^{2+}-felvételt kísérő H^+-kipumpálás számértéke ismét lényegesen magasabb.

Eredményeink alapján a következőképpen képzeljük el az intramitokondriális foszfát szerepét (17. ábra): a mitokondrium belsejében levő anorganikus foszfát egyensúlyban van a légzési lánc H^+-pumpájával, szükség esetén H^+-disszociációval támogatja annak működését. Az ily módon keletkező negatív töltés többlet (HPO_4^{2-}) pedig elektroforetikus kation-felvételt tesz lehetővé. Így válhat az intramitokondriális foszfát-tartalom a kation-transzport meghatározójává. Mint már az előzőekben említettem, Lehninger 1974 hasonló mechanizmust tételezett fel a kationnal egyidejűleg *transzportált* gyenge sav anionok szerepére. A mi kísérleteink viszont arra mutatnak, hogy nincs szükség anion-transzportra, hanem a mitokondrium belsejében már eleve jelenlevő anionok — pl. a $H_2PO_4^-$ — is betölthetik ezt a funkciót. Elképzelhető, hogy adott esetekben más anionok is játszhatnak hasonló szerepet — erre utaló



17. ábra. Az intramitokondriális foszfát szerepe a mitokondriumok kationfelvételében

jelet látunk a 16. ábrán, ahol a stronciummal kapott regressziós egyenes pozitív értéknél metszi az ordinátát.

Másrészt viszont kísérleteink valószínűtlenné teszik egy kalcium-foszfát symport mechanizmus működését. A kálium transzportot vizsgálva ugyanis megkaptuk mindazokat a jelenségeket, amelyeket stroncium-transzport esetén észleltünk: mindkét kation felvételét kísérő légzés-fokozódás és H^+-ejectio az intramitokondriális foszfát tartalom függvénye volt. A valinomycinnel indukált káliumtranszport esetében viszont nem jöhet létre kation-anion symport.

A kalcium-foszfát symport direkt cáfolata

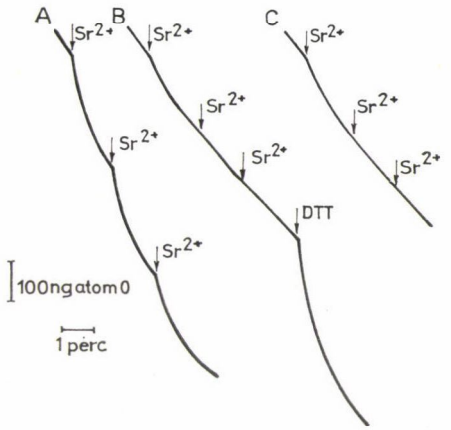
Moyle és Mitchell 1977b a kalcium-foszfát symport elképzelést a foszfát-karrier gátlószerei (mersalyl és NEM) iránt nem érzékeny, La^{3+}-érzékeny foszfát-transzport kimutatására alapozták. Két kísérleti tényt írtak le:

1. Mersalyl vagy NEM jelenlétében is létrehozható stronciummal átmeneti légzésfokozódás, amely szerintük a stroncium-felvétellel egyidejűleg történő foszfát-felvételt bizonyít.

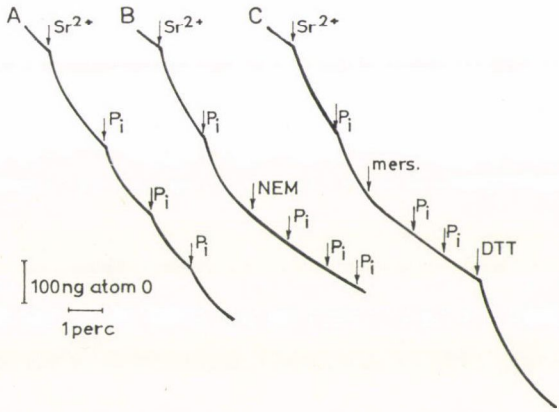
2. Mersalyl vagy NEM jelenlétében a kalcium felvételt fele mennyiségű foszfát felvétele kíséri, amely szerintük a kalcium-karrieren keresztül történik.

Kísérleteinkben mindkét jelenséget tovább vizsgáltuk (Ligeti et al. 1979).

Mint az előzőekben láttuk, kationok gátolt foszfát-karrier esetén is létrehozhatnak bizonyos mértékű légzésfokozódást — az endogén foszfát terhére. A körülmények szerencsés összejátszása esetén — ha az oldat nem tartalmaz anorganikus foszfátot, a mitokondriumok endogén foszfát tartalma viszont magas — a foszfát-karrier blokkolása valóban nem okoz jelentős különbséget a stronciummal kiváltható légzés-stimulálásban. Ez a helyzet állott elő Moyle és Mitchell 1977b kísérleteiben. A következő ábrák azonban egyértelműen



18. ábra. Stroncium hatása a mitokondriumok légzésére A. működő, B. mersalyllal, C. NEM-del gátolt foszfát-karrier esetén



19. ábra. Stroncium jelenlétében kis adag foszfát légzés-stimuláló hatása A. működő, B. NEM-del C. mersalyllal gátolt foszfát-karrier esetén

mutatják, hogy a stroncium légzés-stimuláló hatása mind mersalyl, mind NEM iránt érzékeny. A 18. ábrán bemutatott kísérletben a közeg tartalmazott foszfátot. 18A görbén aktív foszfát-karrier mellett kis adag stronciummal mindaddig létrehozhattunk légzés-stimulálást, amíg a közegben oldott oxigén volt jelen. Ha azonban gátolt (18B kísérletben mersalyllal, 18C-ben NEM-del) foszfát-karrier esetén ismételjük meg, csak az első adag stroncium fokozza kis mértékben a légzést, a továbbiak hatástalanok. A foszfát-karrier felszabadítása (DTT-vel) után megkapjuk a légzésfokozódást (18B). A 19. ábrán bemutatott kísérletekben a közeg nem tartalmazott anorganikus foszfátot. Nagy adag — az előzőekben alkalmazott dózis 5-szöröse — stroncium csak rövid ideig stimulálta a légzést — a mitokondriumokból anaerob körülmények között

kidiffundált foszfát visszavétele és az endogén foszfát H^+-disszociációja biztosította ezt. A továbbiakban aktív foszfát-karrier mellett (19A) kis adag foszfáttal mindaddig lehetett fokozni az oxigén-fogyasztást, amíg stroncium és oldott oxigén jelen volt a közegben. A foszfát-karrier blokkolása után adott foszfát azonban hatástalan volt (19B és 19C). A foszfát-karrier revertálása ismét légzés-fokozódást eredményezett (19C).

Tehát gátolt foszfát-karrier mellett és egyéb permeáló anion hiányában a stronciummal létrehozható légzés-stimulálás az endogén foszfát terhére jön létre, ennek kimerítése után pedig a további oxigén-fogyasztás fokozódás, azaz Sr^{2+}-felvétel a foszfát-karrieren keresztül történő foszfát-felvételhez kötött.

Másrészt mi is megvizsgáltuk kalcium-, ill. stroncium-felvétel során a mitokondriumok foszfát-tartalmának alakulását. Azt tapasztaltuk, hogy gátolt foszfát-karrier esetén a kétértékű kationok felvételét valóban kíséri bizonyos mértékű foszfát-felvétel, de ez preparátumonként igen változó mértékű volt. Változó sztöchiometriájú kalcium-foszfát symportot viszont nehéz elképzelni. Ezért más mechanizmust kerestünk. Korábban már szó volt arról, hogy a dikarboxilát-karrier is képes foszfátot szállítani (dikarboxilát^{2-} — HPO_4^{2-} kicserélődés). Így a következőkben megvizsgáltuk, mi történik, ha ezt a karriert is gátoljuk n-butilmalonáttal. A 2. és 3. táblázatban bemutatott kísérletekben aszkorbát + TMPD szubsztrátot alkalmaztunk, amely kívülről kapcsolódik a légzési láncba, s így transzport mechanizmust nem igényel. A 2. táblázatban csak a mitokondriumokhoz hozzáadott kalcium mennyiségét tüntettük fel, mivel a kalcium-felvételre csak indirekt úton, hozzávetőlegesen tudtunk következtetni. Látható, hogy mersalyl és BM együttes jelenlétében — tehát gátolt foszfát és dikarboxilát karrier esetén — a kalcium-felvételt kísérő foszfát-felvétel szinte teljesen megszűnik. A 3. táblázat már az atom-

2. táblázat

A kalcium-felvételt kísérő foszfát-felvétel mitokondriumokban a foszfát- és a dikarboxilát-karrier gátlószereinek jelenlétében

Inhibitor	kalcium-hozzáadás (nmol/mg feh.)	foszfát-felvétel (nmol/mg feh.)
—	35	30,7
	70	63,0
BM	35	34,9
	70	65,2
mersalyl	35	10,0
	70	26,7
mersalyl + BM	35	1,1
	70	2,1

3. táblázat

Kalcium- és foszfát-felvétel mitokondriumokban a foszfát-transzport különböző gátlószereinek jelenlétében.

Inhibitor	foszfát-felvétel (nmol/mg feh.)	kalcium-felvétel (nmol/mg-feh.)
—	49,7	55,9
BM	49,1	62,4
mersalyl	22,8	56,4
mersalyl + BM	3,9	49,6
NEM	20,5	48,5
NEM + BM	0,3	31,1

abszorpciós fotometriával meghatározott kalcium-felvételt is feltünteti. Ismét az látható, hogy a kalcium-akkumulációval egyidejűleg történő foszfát-bejutás igen jelentősen lecsökken vagy megszűnik, ha a mersalyl, ill. az NEM mellett BM is jelen van.

Ezek a kísérletek egyértelműen bizonyítják, hogy gátolt foszfát-karrier mellett a kalcium-, ill. stroncium-felvételt kísérő foszfát-transzport a dikarboxilát-karrieren és nem a kalcium-karrieren keresztül történik, tehát cáfolják a kalcium-foszfát symport elképzelést. A preparátumonként változó mértékű foszfát-felvétel a preparátumok változó dikarboxilát-tartalmával vagy a dikarboxilát-karrier különböző aktivitásával magyarázható.

További kérdés, hogy kétértékű kationok akkumulációját miért kíséri foszfát-felvétel, amikor a kálium-transzportot vizsgálva soha nem tapasztaltunk ilyen jelenséget. A bejutó kalcium, ill stroncium azonban az intramitokondriális foszfát egy részével oldhatatlan csapadékot képez, ily módon erősen lecsökken a belső foszfát-koncentráció. A mitokondriumon kívüli térben van foszfát, viszont nincs dikarboxilát. Így a két anion koncentráció-grádiensének megfelelően, a dikarboxilát-karrieren keresztül kicserélődik.

Kísérleteink tehát alátámasztják az eredeti elképzelést, amely szerint a kalcium elektroforetikusan, 2 pozitív töltéssel jut be a mitokondrium belsejébe. Egyben megerősítik BRAND et al. 1976a kalcium-felvétel alapján végzett $H^+/\sim$ meghatározásait.

A kemiozmotikus elmélet összefoglaló értékelése

Az előzőekben részletezett adatok alapján a kemiozmotikus elmélet körüli vitákat ma így összegezhetjük: MITCHELL eredeti elképzelését, az 1961-ben feltételezett 4 pontot bebizonyították, ugyancsak egyértelműen kimutat-

ták az elmélet lényegét képező H^+-elektrokémiai potenciál-különbség létrejöttét a mitokondrium és más biológiai membránok két oldala között. A teória legnagyobb érdeme talán, hogy megmagyarázta, az oxidatív és a fotoszintetikus foszforiláció miért kötött szigorúan membrán struktúrához. A részletesebb, molekuláris mechanizmusra vonatkozó elképzelések — a hurokteória és a $H^+/\sim = 2$ sztöchiometria —, valamint az ezek védelmére és megerősítésére szolgáló későbbi feltételezések — pl. a kalcium/H^+ = 1 arány vagy a kalcium-foszfát symport — az újabb kísérletek fényében nem állják meg a helyüket. A $H^+/\sim$ arányról nyert adatok jobban magyarázhatók a PAPA 1976 által elképzelt H^+-pumpa mechanizmussal, a membrán Bohr effektussal. Ennek lényege: a légzési lánc egyes fehérjéinek oxidált állapotban más lenne a pK értékük, mint redukált állapotban, ami az oxido-redukciós változásokkal szinkron protonálódást — deprotonálódást eredményezne. Ily módon vektoriális H^+-mozgás jöhet létre (PAPA 1976). A citokrom b regióban valóban leírtak olyan komponenst, amelynek redox potenciálja pH-függő volt (URBAN és KLINGENBERG 1969, STRAUB és COLPA BOONSTRA 1962). A Bohreffektus alapján működő H^+-pumpa elképzelés előnye, hogy nem feltételez sem szigorú sztöchiometriát, sem alternáló hidrogén- és elektron-karriereket a légzési láncban. Nincs ellentétben avval a legújabban megjelent adattal sem, amely szerint a légzési lánc 3 magas energiájú helyén nem lenne azonos a $H^+/\sim$ arány (BRAND et al. 1978).

Másrészt viszont HINKLE 1973 mesterséges membránokon — liposzómákon és BLM-en — végzett kísérleteiben kimutatta, hogy pH-különbség és membrán-potenciál kialakulhat tényleges H^+-transzlokáció nélkül, pusztán transzmembrán elektron-transzfer útján.

Végezetül még két gondolatot szeretnék megemlíteni, amelyek a legutóbbi években merültek fel (ERNSTER 1977), és mégcsak adekvát kísérleti megközelítés sincs velük kapcsolatban:

1. A biológiai membránokban kialakuló H^+ elektrokémiai potenciálgrádiens az itt zajló energia-átalakító folyamatok primer lépése-e, avagy megelőzi esetleg egy konformációs változás?

2. Az energia-átalakítás csak az egész membránra kiterjedő H^+-grádiens közbeiktatásával történhet-e, vagy lehetségesek direkt mechanizmusok a membrán kisebb régióiban?

Mindezek a felvetett gondolatok, nyitva hagyott kérdések és bebizonyítatlan elképzelések világosan mutatják, hogy a Mitchell-féle kemiozmotikus teória — bár nagy vonalaiban elfogadták, s szerzője megkapta a Nobel-díjat — továbbra is élénken foglalkoztatja a kutatók fantáziáját.

Az Egészségügyi Minisztérium 1-07-0306-01-1/F számú kutatási főirányához kiemelt, szintre elfogadott kutatási témában végzett kutatómunka alapján.

IRODALOM

AKERMAN, K. E. O.: Charge transfer during valinomycin-induced Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria. FEBS Letters **93,** 293—296 (1978).

BAKEEVA, L. E., GRINIUS, L. L., JASAITIS, A. A., KULIENE, V. V., LEVITSKY, D. O., LIBERMAN, E. A., SEVERINA, I. I., SKULACHEV, V. P.: Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria. Biochim. Biophys. Acta **216,** 13—21 (1970).

BIELAWSKI, J., THOMPSON, T. E., LEHNINGER, A. L.: The effect of 2,4-dinitrophenol on the electrical resistance of phospholipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Res. Comm. **24,** 948—954 (1966).

BRAND, M. D., CHEN, CH. H., LEHNINGER, A. L.: Stoichiometry of H^+ ejection during respiration-dependent accumulation of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. **251,** 968—975 (1976a).

BRAND, M. D., REYNAFARJE, B., LEHNINGER, A. L.: Re-evaluation of the H^+/site ratio of mitochondrial electron transport with the oxygen pulse technique. J. Biol. Chem. **251,** 5670—5679 (1976b).

BRAND, M. D., HARPER, W. G., NICHOLLS, D. G., INGLEDEW, W. J.: Unequal charge separation by different coupling spans of the mitochondrial electron transport chain. FEBS Letters **95,** 125—130 (1978).

BRUNI, A.: The mechanism of action of atractyloside. in: Regulation of metabolic processes in mitochondria eds.: J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E. C. Slater Elsevier, Amsterdam, London, New York pp. 275—291 (1966).

CHANCE, B.: The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J. Biol. Chem. **240,** 2729—2748 (1965).

CHAPPELL, J. B., CROFTS, A. R.: The effect of atractylate and oligomycin on the behaviour of mitochondria towards adenine nucleotides. Biochem. J. **95,** 707—716 (1965).

CHAPPELL, J. B., HAARHOFF, K. N.: The penetration of the mitochondrial membrane by anions and cations. in: Biochemistry of mitochondria eds.: E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak Academic Press London and New York and PWN Warszawa pp. 75—93 (1967).

CHAPPELL, J. B., ARRABACA, J. D., DEANNA, R., MATHIEN—SHIRE, Y.: The requirement for anion symport for Ca^{2+}-transport by liver mitochondria. in: Abstracts of the 12-th FEBS Meeting Dresden, 1978. Abstract No. 2025 (1978).

ERNSTER, L.: Chemical and chemiosmotic aspects of electron transport-linked phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. Vol. **46,** pp. 981—995 (1977).

FONYÓ, A.: Phosphate carrier of rat liver mitochondria: its role in phosphate outflow. Biochim. Biophys. Res. Comm. **32,** 624—628 (1968).

FONYÓ, A., BESSMAN, S. P.: Inhibition of inorganic phosphate penetration into liver mitochondria by p-mercuribenzoate. Biochem. Medicine **2,** 145—163 (1968).

FONYÓ, A., LIGETI, E., PALMIERI, F., QUAGLIARIELLO, E.: Carrier mediated transport of phosphate in mitochondria. in: Biomembranes, Structure and Function. eds.: G. Gárdos and I. Szász, Akadémiai Kiadó Budapest and North Holland, Amsterdam pp. 287—306 (1975).

FONYÓ, A., PALMIERI, F., QUAGLIARIELLO, E.: Carrier-mediated transport of metabolites in mitochondria. in: Horizons in Biochemistry and Biophysics, Vol. 2. eds.: E. Quagliariello, F. Palmieri, Th. P. Singer; Addison-Wesley Publishing Comp. London pp. 60—105 (1976).

FONYÓ, A., LIGETI, E.: The role of intramitochondrial P_i in stimulation of respiration by calcium and strontium. FEBS Letters **93,** 289—292 (1978).

FONYÓ, A., LIGETI, E.: Intramitochondrial phosphate is the source of protons in the response of liver mitochondria to cations. FEBS Letters **96,** 343—345 (1978).

GREVILLE, D. G.: A scrutiny of Mitchell's chemiosmotic hypothesis on respiratory chain and photosynthetic phosphorylation. in: Current topics of bioenergetics, Vol. 3. ed: R. Sanadi; Academic Press, New York and London pp. 1—78 (1969).

GRINIUS, L. L., JASAITIS, A. A., KADZIAUSKAS, YU, P., LIBERMAN, E. A., SKULACHEV, V. P., TOPALI, V. P., TSOFINA, L. M., VLADIMIROVA, M. A.: Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles. Biochim. Biophys. Acta **216,** 1—12 (1970).

HINKLE, P. C.: Electron transfer across membranes and energy coupling. Fed. Proc. **32,** 1988—1992 (1973).

HOEK, J. B., LOFRUMENTO, N. E., MEIJER, A. J., TAGER, J. M.: Phosphate transport in rat-liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta **226,** 297—308 (1971).

HOPFER, V., LEHNINGER, A. L., THOMPSON, T. E.: Protonic conductance across phospholipid

bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **59,** 484—490 (1968).

KLINGENBERG, M., ROTTENBERG, H.: Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane. Eur. J. Biochem. **73,** 125—130 (1977).

LANOUE, K., MIZANI, S. D., KLINGENBERG, M.: Electrical imbalance of adenine nucleotide transport across the mitochondrial membrane. J. Biol. Chem. **253,** 191—199 (1978).

LEHNINGER, A. L.: Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of Ca^{++} by mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71,** 1520—1524 (1974).

LEHNINGER, A. L.: Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York (1977).

LIGETI, E., IKRÉNYI, K., FONYÓ, A.: The inhibitor-sensitivity and pathways of P_i uptake during calcium and strontium accumulation in liver mitochondria. FEBS Letters **107,** 205—208 (1979).

MEIJER, A. J.: Anion translocation in mitochondria. Academic Service, Ruinzicht 118, Amsterdam (1971).

MITCHELL, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature **191,** 144—148 (1961).

MITCHELL, P.: Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Glynn Res. Ltd. Bodmin (1966).

MITCHELL, P.: Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling. Biochem. Soc. Trans. **4,** 399—430 (1976).

MITCHELL, P., MOYLE, J.: Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. Nature **208,** 147—151 (1965).

MITCHELL, P., MOYLE, J.: Acid-base titration across the membrane system of rat liver mitochondria. Catalysis by uncouplers. Biochem. J. **104,** 588—600 (1967a).

MITCHELL, P., MOYLE, J.: Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. Biochem. J. **105,** 1147—1162 (1967b).

MITCHELL, P., MOYLE, J.: Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem. **7,** 471—484 (1969).

MOYLE, J., MITCHELL, P.: Electric charge stoichiometry of calcium translocation in rat liver mitochondria. FEBS Letters **73,** 131—136 (1977a).

MOYLE, J., MITCHELL, P.: The lanthanide-sensitive calcium phosphate porter of rat liver mitochondria. FEBS Letters **77,** 136—140 (1977b).

MOYLE, J., MITCHELL, P.: Lanthanide-sensitive calcium-monocarboxylate symport in rat liver mitochondria. FEBS Letters **84,** 135—140 (1977c).

MOYLE, J., MITCHELL, P.: Measurement of mitochondrial H^+/O quotients: effects of phosphate and N-ethylmaleimide. FEBS Letters **90,** 361—365 (1978).

NICHOLLS, D. G.: The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton electrochemical gradient across the inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution. Eur. J. Biochem. **50,** 305—315 (1974).

NICHOLLS, D. G.: Stoichiometries of proton translocation by mitochondria. Biochem. Soc. Trans. **5,** 200—203 (1977).

PAPA, S.: Proton translocation reactions in the respiratory chain. Biochim. Biophys. Acta **456,** 39—85 (1976).

PRESSMAN, B. C.: Biological application of ionophores. Ann. Rev. Biochem. Vol. **45,** pp. 501—530 (1976).

REYNAFARJE, B., BRAND, M. D., LEHNINGER, A. L.: Evaluation of the H^+/site ratio of mitochondrial electron transport from rate measurements. J. Biol. Chem. **251,** 7442—7451 (1976).

REYNAFARJE, B., LEHNINGER, A. L.: Electric charge stoichiometry of calcium translocation in mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm. **77,** 1273—1279 (1977).

REYNAFARJE, B., LEHNINGER, A. L.: The K^+/site and H^+/site stoichiometry of mitochondrial electron transport. J. Biol. Chem. **253,** 6331—6334 (1978).

ROTTENBERG, H.: The measurement of transmembrane electrochemical proton gradients. Bioenergetics **7,** 61—74 (1975).

ROTTENBERG, H., SCARPA, A.: Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. Biochemistry **13,** 4811—4817 (1974).

SKULACHEV, V. P., SHARAF, A. A., LIBERMAN, E. A.: Proton conductors in the respiratory chain and artificial membranes. Nature **216,** 718—719 (1967).

SLATER, E. C.: Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. Nature **172,** 975 (1953).

SLATER, E. C., ROSING, J., MOL, A.: The phosphorylation potential generated by respiring mitochondria. Biochim. Biophys. Acta **292,** 534—553 (1973).

STRAUB, J. P., COLPA BOONSTRA, J. P.: The effect of pH on the oxidation-reduction potential of cytochrome b in heart muscle preparations. Biochim. Biophys. Acta **60,** 650—652 (1962).

TING, H. P., WILSON, D. F., CHANCE, B.: Effects of uncouplers of oxidative phosphorylation on the specific conductance of bimolecular lipid membranes. Arch. Biochem. Biophys. **141,** 141—146 (1970).

TYLER, D. D.: The inhibition of phosphate entry into rat liver mitochondria by organic mercurials and by formaldehyde. Biochem. J. **107,** 121—123 (1968).

TYLER, D. D.: Evidence of a phosphate-transporter system in the inner membrane of isolated mitochondria. Biochem. J. **111,** 665—678 (1969).

URBAN, P. F., KLINGENBERG, M.: On the redox potentials of ubiquinone and cytochrome b in the respiratory chain. Eur. J. Biochem. **9,** 519—525 (1969).

WIECHMAN, A. H. C. A., BEEM, E. P., VAN DAM, K.: The relationship between H^+ translocation and ATP synthesis in mitochondria. in: Electron transfer chains and oxidative phosphorylation eds.: E. Quagliariello et al. North-Holland Comp., Amsterdam pp. 335—342 (1975).

A CA-PUMPA SAJÁTSÁGAINAK VIZSGÁLATA ÉP EMBERI VÖRÖSVÉRSEJTEKEN, IZOLÁLT MEMBRÁN FRAGMENTUMOKON ÉS KIFORDÍTOTT MEMBRÁN VEZIKULÁKON*

SZÁSZ ILMA, SARKADI BALÁZS, HASITZ MÁRIA, ENYEDI ÁGNES és GÁRDOS GYÖRGY

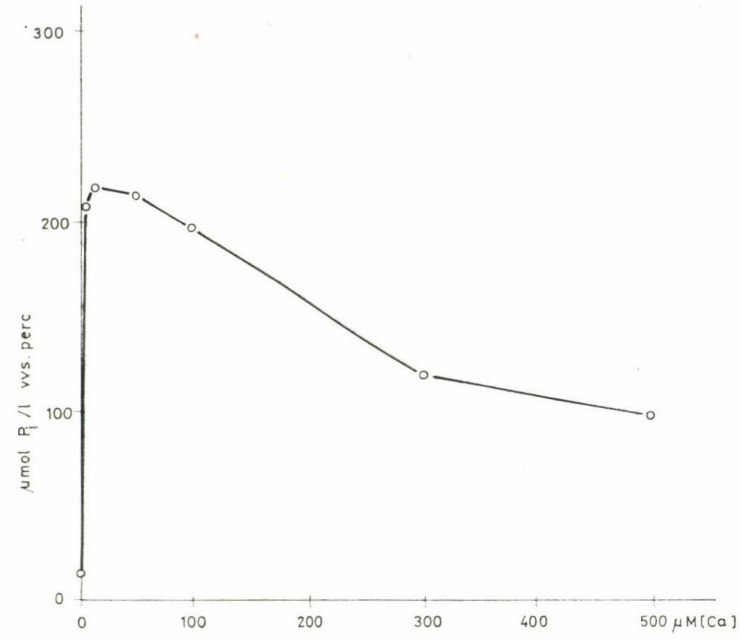
Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest és DOTE Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

I. Aktív Ca-transzport, CaMgATPáz aktivitás és Ca-függő membrán foszforiláció ép vörösvérsejtekben

A Ca-pumpa Ca-affinitása

Korábbi munkáinkban beszámoltunk arról az eljárásunkról, amelynek során A23187 kalcium-ionofór segítségével sikerült az emberi vörösvérsejteket „megtöltenünk" kalciummal úgy, hogy az ionofór eltávolítása után kalcium transzport vizsgálatokra alkalmasak voltak (SARKADI és mtsai 1976). Megállapítottuk, hogy intakt vörösvérsejteken a Ca-pumpa sebessége a belső Ca-szint emelésével 1 mM $[Ca]_i$-ig fokozatosan nő (K_{mCa} 300—500 μM) (SARKADI és mtsai 1977). Módszert dolgoztunk ki arra is, hogy az intakt sejtekben a CaMgATPáz aktivitását megmérjük (Szász 1970). A CaMgATPáz Ca-érzékenysége a Ca-pumpáéhoz hasonló volt (SARKADI és mtsai 1977). QUIST és ROUFOGALIS (1975) Ca-töltött vörösvérsejt ghostokon az aktív Ca-transzport és a CaMgATPáz aktivitás Ca-érzékenységét szintén relatíve alacsonynak találta. Az aktív Ca-transzport A23187 jelenlétében természetesen nem mérhető, a CaMgATPáz aktivitás viszont igen. Érdekes, hogy A23187 jelenlétében a CaMgATPáz Ca-affinitása jelentősen megnő: 10—100 μM kalcium koncentrációnál maximális aktivitás mérhető, magasabb koncentrációk már gátló hatásúak ($K_i > 200$ μM) (1. ábra). Normál vérek között a görbe jellegében nem, de az abszolút értékekben jelentős különbségek észlelhetők (a maximum 40—350 μmol P_i/l vvs. perc értéktartományban változott). Fizikai módszerekkel kimutatható, hogy az A23187 az általunk is alkalmazott koncentráció tartományban a membránszerkezetet már megváltoztatja (KLAUSNER és mtsai 1979). Ez a változás valószínűleg elősegíti a CaMgATPáz „aktiválódását". Ez az aktiválódás nem következik be, ha a sejtet acetilfenilhidrazin előkezelésnek (20 mg/ml vvs.) tesszük ki (2. ábra), ami Heinz-test képződéshez és a Heinz-testek és a membrán kölcsönhatásához vezet, de a membrán számára is közvetlen oxidatív ártalmat jelent (SZELÉNYI

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.



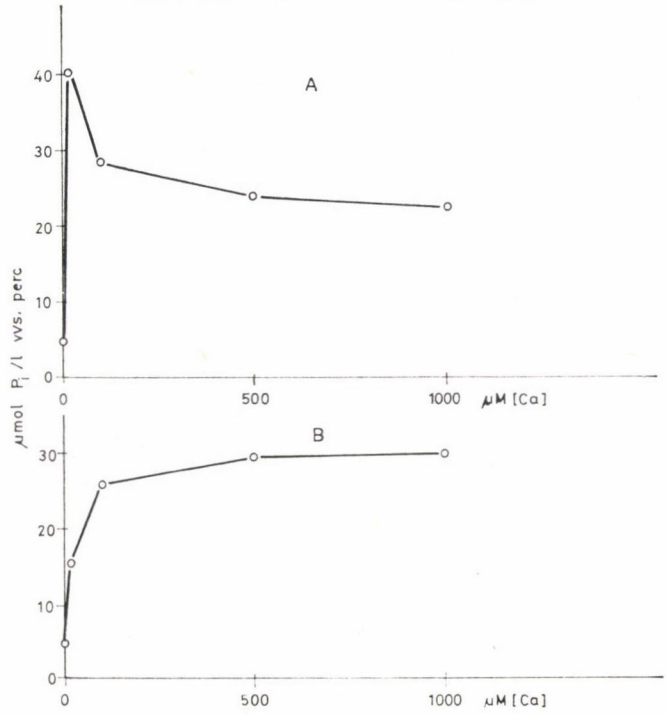
1. ábra. CaMgATPáz aktivitás intakt vörösvérsejteken A23187 jelenlétében. 150 mM NaCl + + 2,5 mM $MgCl_2$ (pH 7,4) oldattal ötször mosott vörösvérsejteket inkubáltunk 37 °C-on. Közeg: 2 µM A23187, 0,1 mM ouabain, 5 mM jódacetamid, emelkedő Ca-koncentráció (1, 10, 50, 100 ill. 500 µM) 0,155 M KCl-ben. Hkt: 16%. Az enzimaktivitás értékeket az első 10 percben felszabaduló anorganikus foszfát mennyiségéből számítottuk. A foszfort HAYASHI (1976) által módosított Murphy—Riley módszerrel határoztuk meg

és mtsai 1972). Az ionofór által előidézett aktiváló hatás kialakulását tehát az acetilfenilhidrazin által előidézett oxidatív ártalom megakadályozza.

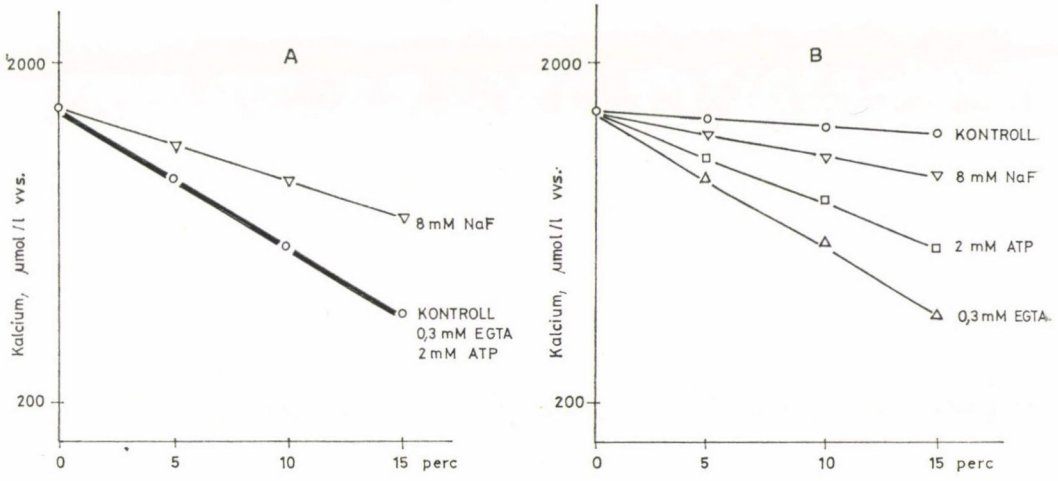
A fenti eredményeket összehasonlítva más adatokkal, pl. azon közlésekkel, amelyek szerint a Ca-EGTA pufferrel töltött vörösvérsejt ghostokban mind az aktív Ca-transzport, mind a CaMgATPáz aktivitás Ca-affinitása nagy (SCHATZMANN 1973), feltételezhető, hogy a membránban elhelyezkedő Ca-pumpa kétféle, kis és nagy Ca-affinitású állapotban fordulhat elő.

A Ca-pumpa gátlószerei

A Ca-töltött intakt vörösvérsejteken (amelyekből az ionofórt eltávolítottuk), a Ca-pumpát a következő anyagok gátolják jelentősen: lantán (és lantanidák), Hg^{2+}, rutheniumvörös, fluorid, SH-reagensek. Ezek közül gyakorlatilag impermeábilis a lantán (QUIST, ROUFOGALIS 1975, SARKADI és mtsai 1977) és a higany (SZEINBERG, CLEJAN 1964, SHAMOO 1975). A lantán a külső felszínhez kötődve viszonylag könnyen leválasztható nemcsak EDTA-val, EGTA-val, de extracelluláris ATP-vel is, sőt a részleges Ca-pumpa gátlást előidéző fluorid (amely lantánnal jól oldható sót képez) a lantános gátlást



2. ábra. CaMgATPáz aktivitás intakt vörösvérsejteken A23187 jelenlétében acetilfenilhidrazin előkezelés után. 150 mM NaCl + 2,5 mM $MgCl_2$ (pH 7,4) oldattal ötször mosott vörösvérsejteket 37 °C-on 2 órán át inkubáltuk *A.* 0,16 M KCl (pH 7,4)-ben, *B.* 0,16 M KCl (pH 7,4)-ben oldott 20 mg/ml vvs acetilfenilhidrazinnal. Az enzimaktivitás mérés feltételeit l. az 1. ábra magyarázatánál



3. ábra. Lantánnal reagáló vegyületek hatása Ca-töltött intakt vörösvérsejtek Ca-kiáramlására és CaMgATPáz aktivitására. A vörösvérsejteket A23187 segítségével jelzett Ca-mal töltöttük, majd az ionofórt eltávolítottuk (SARKADI és mtsai 1977). A Ca-kiáramlást a ^{45}Ca-nak a felülúszóban való megjelenése alapján mértük. Közeg: 130 mM KCl + 30 mM imidazol HCl (pH 7,4) + 2,5 mM $CaCl_2$. *A.* lantán nélkül, *B.* 0,2 mM $LaCl_3$

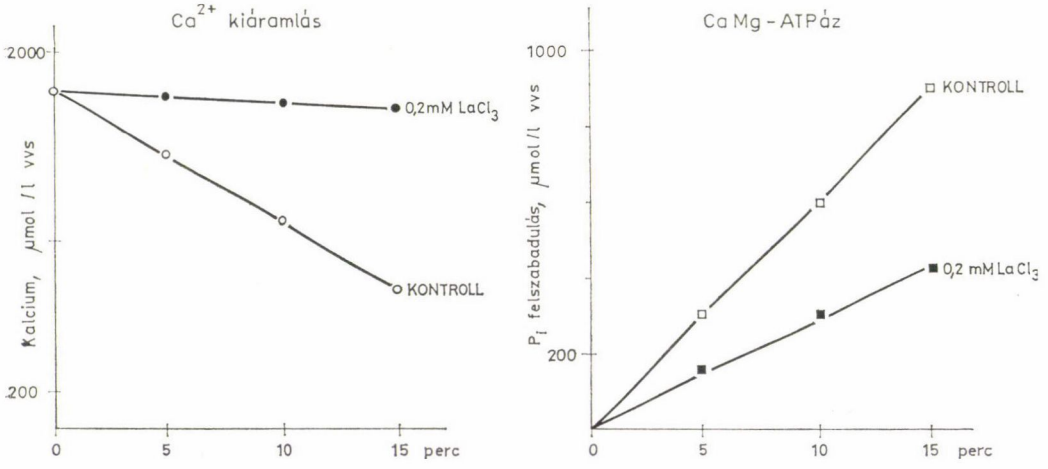
jelentősen csökkenti (3. ábra). Ezek az eredmények világosan mutatják, hogy a lantán nem penetrál, hanem a sejt külső felszínén fejti ki Ca-pumpa gátló hatását.

A Ca-pumpa sztöchiometriája

Az ATPáz aktivitást azon elv alapján mértük, hogy foszfoglicerinaldehid dehidrogenáz (PGAD) és 2,3-difoszfoglicerát foszfatáz (2,3-DPGáz) gátolt vörösvérsejteken a felszabadult anorganikus foszfát gyakorlatilag ATP-ből származik. Előző vizsgálatainktól eltérően a két enzim gátlásához nem a jódacetát-tetrationát kombinációt használtuk, hanem 5 mM jódacetamidot önmagában, mivel kimutattuk, hogy ez az SH-reagens ebben a koncentrációban nemcsak a PGAD-t, hanem a 2,3-DPGázt is gátolja, ugyanakkor a Ca-pumpára hatástalan. Azt tapasztaltuk, hogy a Ca-pumpa impermeábilis gátlószerei, a lantán (és a higany) 250 μM koncentrációban a Ca-effluxot mintegy 90—95%-ban, a CaMgATPáz aktivitást mintegy 50%-ban gátolták (4. ábra). Az impermeábilis gátlószerek számára nem hozzáférhető „CaMgATPázok" mögött feltételezhetően a következő enzimaktivitások állhatnak: foszfolipáz C-digliceridkináz-foszfatidsav foszfatáz, valamint CaMgproteinkináz-proteinfoszfatáz enzimrendszerek, és esetleg „szétkapcsolódott" Ca-pumpa molekulák. A lantán-szenzitív CaMgATPázt a lantán szenzitív Ca-effluxhoz viszonyítva a Ca : ATP sztöchiometria 2 : 1-nek adódik (SARKADI és mtsai 1977).

Különböző kationok szerepe a Ca-pumpa működésében

A Ca-pumpa sebességét kívülről hozzáadott egyértékű kationok (K, Na) nem befolyásolják. Fontos azonban az intracelluláris Mg jelenléte. A23187

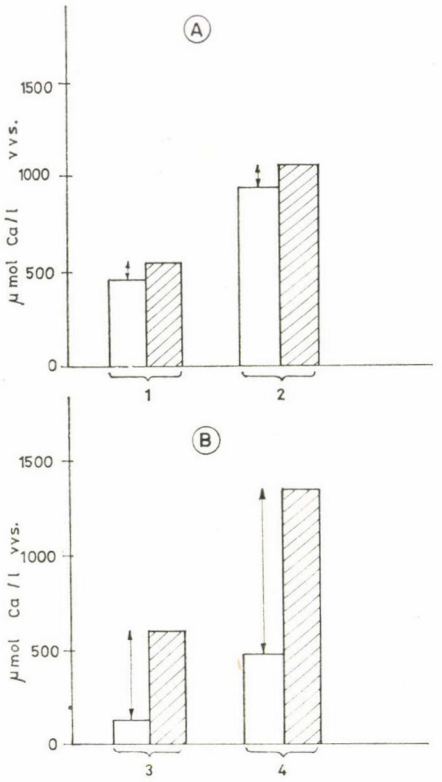


4. ábra. Lantán hatása Ca-töltött intakt vörösvérsejtek Ca-kiáramlására és CaMgATPáz aktivitására. Ca-töltés és efflux mint a 3. ábránál, foszfor meghatározás HAYASHI (1976) szerint. A rendszerek 5 mM jódacetamidot is tartalmaztak

+ EDTA kezeléssel előidézett Mg-depléció a sejteket microsphaerocytákká alakítja, az aktív Ca-transzportot és a CaMgATPáz aktivitást teljesen leállítja, viszont a passzív Ca-felvétel mellett jól mérhető, lantán-szenzitív Ca : Ca exchange jelentkezik (Szász és mtsai 1978b). További vizsgálatokat igényel annak eldöntése, hogy ez a transzportjelenség a Ca-pumpa egy sajátos működésének tekinthető-e.

Klinikai vizsgálatként alkalmazható CaMgATPáz aktivitásmérés

Mint már említettük, az A23187 jelenlétében mért CaMgATPáz aktivitásnak normál vérek esetében is igen nagy szórása van, ezért klinikai vizsgálatra nem alkalmazható. Az ionofóros Ca-töltést követően az ionofór eltávolítása után mért értékeknél már jól megállapítható a normál tartomány : összCaMgATPáz : 59,8 ± 7,2 (SD), lantánszenzitív frakció : 27,8 ± 2,4 (SD); az eljárás azonban klinikai vizsgálatok céljára túlságosan bonyolult. Ezért az ionofóros töltési eljárást követő lépéseket úgy módosítottuk, hogy a CaMgATPáz mérési eljárás klinikai vizsgálatra alkalmas legyen. Az eredeti töltési eljárás után alkalmazott ötszörös, nagy térfogatban végzett albuminos mosás helyett csak kétszeres, kisebb térfogatban alkalmazott albuminos mosást iktatunk be. A szuszpenzióban maradt ionofór nyomokat részben lekötöttük a rendszerhez adott 0,8% albuminnal, részben pedig Mn-nal reagáltattuk. A mangán alkalmazásának célja az volt, hogy megakadályozzuk a sejtek ionofór mediált lantán felvételét. Az A23187 ugyanis 200-szor jobban köti a mangánt és kétszer jobban a magnéziumot, mint a kalciumot, a lantánt pedig a kalciumnál is kevésbé. 200 μM Mn, 2 mM Ca, 2 mM Mg és 0,2 mM La koncentráció mellett ionofór-mediált lantán transzporttal már nem kell számolnunk, a lantán nem lép be a sejtek belsejébe. Kísérleteink szerint mangán jelenlétében nemcsak ionofór mediált lantán transzporttal, de még jelentős ionofór mediált kalcium transzporttal sem kell számolnunk, még akkor sem, ha a külső közegből a kalciumot és magnéziumot is elhagyjuk. Amikor a sejt kalciummal töltött, a közegben mangán és lantán van jelen, és a rendszer ionofór nyomokat tartalmaz, a lantán-szenzitív Ca-efflux és CaMgATPáz aktivitás megfelel az ionofór mentes Ca-töltött vörösvérsejtekben észlelteknek. Mangán hiányában viszont a sejtek az intracelluláris kalciumtól megszabadulni nem tudnak, jelezve, hogy a rendszerben maradt ionofór nyomok kalciumot transzportálnak (5. ábra). A rendszerben maradt szabad ionofór mennyisége azonban messze kevesebb, mint azok a koncentrációk, amelyek membránszerkezet változást okoznak. Módszerünkkel 10 normál véren 1—2 mM$[Ca]_i$ mellett a teljes CaMgATPáz aktivitás 50,84 ± ± 7,4 (SD)-nek, a lantán szenzitív CaMgATPáz aktivitás 32,8 ± 6,4 (SD)-nek adódott. Jelen vizsgálati rendszerünkben a lantán inszenzitív frakció jelentősen alacsonyabb (18,04 ± 6,7), mint az ionofór teljes eltávolítása után mért korábbi értékeink (32,0 ± 5,3). Ennek oka valószínűleg a Mn protein-



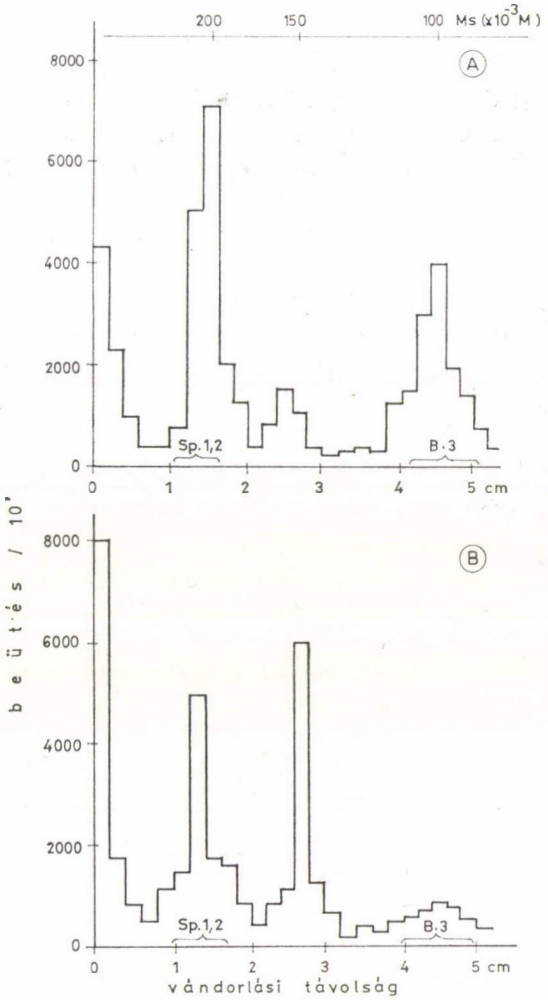
5. ábra. Ca-efflux 200 μM Mn^{2+} mellett A23187 nyomok jelenlétében. A vörösvérsejteket A23187 segítségével töltöttük jelzett Ca-mal, az ionofórt csak részlegesen távolítottuk el (két mosás 3×-os térfogatú, 0,5% albumin tartalmú 0,16 M KCl-ben). A sejtek ^{45}Ca aktivitását mértük 10 perces 37 °C-os inkubálás után. Inkubáló közeg: 1,25% albumin tartalmú 0,16 M KCl (pH 7,0). *A.* Mangán nélkül, *B.* 200 μM $MnCl_2$-dal. Üres hasáb: kontroll, vonalkázott hasáb: 0,2 mM $LaCl_3$. Nyíl: La-szenzitív Ca-efflux (10'. Kiinduló sejt [Ca] : *1* = 656 μmol/l; *2* = 1218 μmol/l; *3* = 654 μmol/l; *4* = 1565 μmol/l

kináz gátló hatásában keresendő. Klinikai CaMgATPáz mérő módszerünkkel a lantán szenzitív frakció (vagyis a Ca-pumpához rendelt ATPáz) csökkenését észleltük sarlósejtes anaemiában szenvedő betegeken.

A membrán Ca-függő foszforilációja

^{32}P-ATP tartalmú intakt vörösvérsejtekben eddig csak a spektrin és a band 3 membrán régiókban mutattak ki ^{32}P-beépülést (GREENQUIST, SHOHET 1975). Mi adenin-inozin-^{32}P előkezeléssel a sejt ATP készletét intenzíven jeleztük (SZÁSZ és mtsai 1978a). Ezt követően különböző kezelésekkel (A23187, propranolol, ATP-depléció, Mg-depléció) Ca-felvételt idéztünk elő, majd a sejteket hemolizáltuk és WOLF és SCHATZMANN (SCHATZMANN 1973) szerint membránt preparáltunk belőlük. A membrán SDS-poliakrilamidgél elektroforetogramján a 150 000 daltonos régióban intenzív jelölődést észleltünk.

Ez a jelölődés ATP- és Mg-depletált sejtekben is megjelent (6. ábra). Amennyiben az ATP-depléció folyamán lantán is volt a rendszerben, ebben a régióban a foszforiláció még intenzívebb volt. (A hemolízis időpontjában a sejtben már csak 0,1 μM nagyságrendű ATP volt, ami a hemolízis során tízszeresére hígult. Ehhez a hemolizátumhoz a megfelelő koncentrációban adott lan-



6. ábra. Membrán polipeptidek foszforilációja Ca-felvétel során ^{32}P-ATP tartalmú intakt vörösvérsejtekben. Az ATP kiinduló specifikus aktivitása a sejtekben: 20 000—40 000 cpm/μmol. Inkubációs közegek: *A.* 150 mM NaCl, 1 mM Trisz-EDTA, 5 mM Trisz-HCl (pH 7,0). *B.* 145 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$, 2 mM jódacetamid, 10 mM inozin, 5 mM Trisz-HCl (pH 7,0). Inkubációs idő: 90 perc. t = 37 °C. Hkt: 30%. Vörösvérsejt ATP koncentráció 90'-nél: *A.* 1,6 mM, *B.* 1 μM. Inkubálás után a sejtekből hűtve membránt preparáltunk (SCHATZMANN 1973). 100 μg membrán fehérjét SDS-poliakrilamid gél elektroforézisnek vetettünk alá (SHAPIRO és mtsai 1967). A gél-szegmentumok radioaktivitás mérése GEZELIUS (1977) szerint történt

tán a foszforilációt nem befolyásolta, hatását tehát az intakt sejt inkubációs időszakára tehetjük.) Feltételezhető, hogy az inkubáció során a lantán az aktiválódó Ca-pumpa molekulák foszforilált formájához kapcsolódott a sejt külső felszínén és azok defoszforilációját akadályozta meg. (Hg^{2+} előkezelés után a jelenség nem volt észlelhető, valószínűleg a haemoglobin nagy Hg^{2+} affinitása miatt, ami a hemolízis során a Hg^{2+} haemoglobinhoz való átkötődését eredményezhette.)

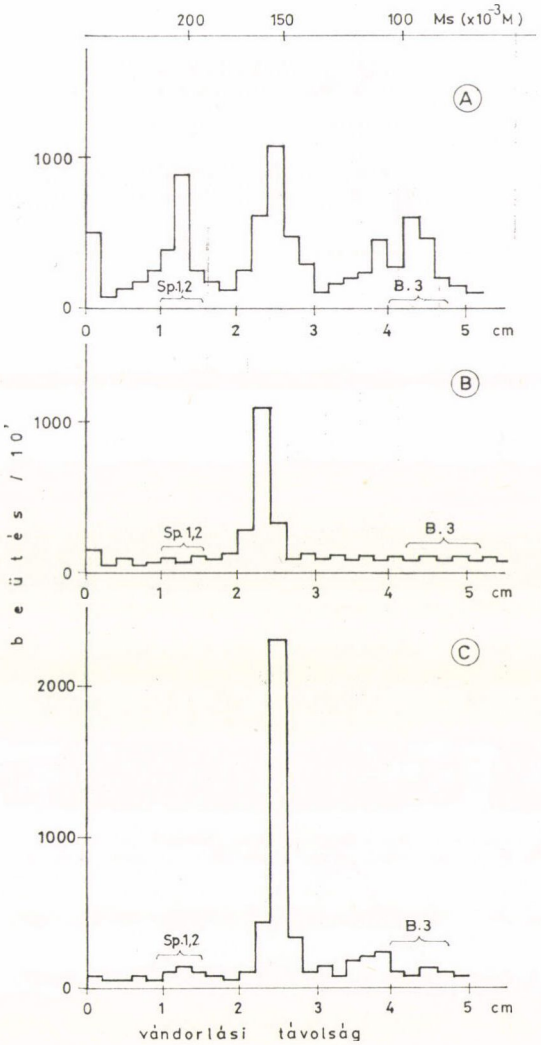
II. CaMgATPáz, Ca-függő membránfoszforiláció izolált membrán-fragmentumokon és kifordított membrán vezikulákon (inside-out vesicles, IOV), aktív Ca-transzport vizsgálata IOV-n

Ca és La hatása a membrán és IOV foszforilációjára és defoszforilációjára

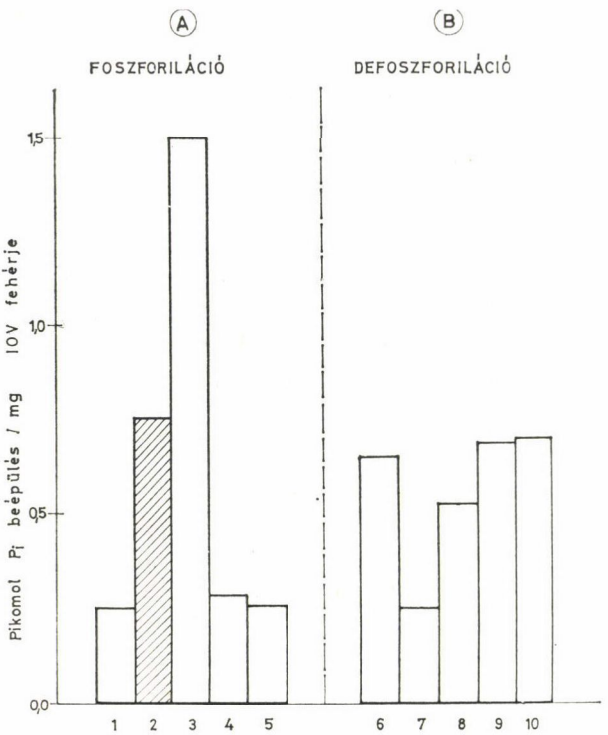
Amennyiben izolált membrán fragmentumokat kezeltünk ^{32}P-ATP-vel, EGTA + Ca puffer-rendszerekben a spektrin 2, a band 3 és a 150 000 daltonos régió egyaránt foszforilálódott, és a teljes membránba épült radioaktivitás szabad Ca jelenlétében az EGTA-s rendszerhez viszonyítva nem nőtt, hanem csökkent. (Ugyanígy csökken a foszforiláció szabad Ca jelenlétében az IOV-k Ca-transzportjának vizsgálatára összeállított rendszerekben: ATP 500 μM, Mg 5 mM, Ca 1—300 μM.) EDTA + Ca tartalmú rendszerekben azonban csak a 150 000 daltonos régióban kaptunk ^{32}P-beépülést, és 250 μM szabad Ca az EDTA-s kontrollhoz viszonyítva jelentősen megemelte a teljes membránba épült radioaktivitás mértékét (7. ábra). A 150 000 daltonos régió foszforilálódó fehérje komponensét a Ca-pumpa foszforilálódó alegységének tekinthetjük (KNAUF és mtsai 1974). A foszforilációs reakció Ca-affinitása magas (K_{mCa} : 0,2 μM), és mint láttuk, Mg-ot nem igényel. Lantán hatására mind izolált membránon, mind IOV-n létrejön a foszforiláció (K_{mLa} : 0,005 nm) és mértéke sokkal nagyobb, mint Ca esetében (8. ábra). 8 mM KF jelenléte a lantánnal indukált foszforiláció mértékét nem csökkenti, hanem fokozza.

Nagy mennyiségű hideg ATP hozzáadásakor a Ca-foszforilált membrán defoszforilációja követhetővé válik. 250 μM lantán ezt a defoszforilációt mintegy 70%-ban gátolja. Ez a gátlás azonos mértékű izolált membrán fragmentumon és IOV-n, holott az utóbbi objektumon a transzport lépést követően a kalcium kötőhelyek a vezikula belseje felé fordulnak, s így lantán számára nem hozzáférhetőek. A gátlás hasonló mértéke arra utal, hogy a Ca-pumpa működése ciklusában csak rövid ideig fordulnak a kalcium kötőhelyek a vezikula belseje felé. A defoszforiláció teljes gátlása csak magasabb (500—1000 μM) lantán koncentrációknál észlelhető, amelyek már a foszforilációt is gátolják (8. ábra). Lantánnal foszforilált membrán hideg ATP hozzáadására csak részlegesen defoszforilálódik, mutatva, hogy a lantános foszfori-

láció „zsákutca", a teljes reakciólánc lejátszódását a lantán meggátolja. Felhívjuk még a figyelmet arra, hogy izolált membránfragmentumokon és IOV-n a lantán hatása teljesen azonos volt, jelezve, hogy ha a belső Ca-kötőhelyek a lantán számára hozzáférhetőek, akkor azokkal reagál, s innen — szemben az ép vörösvérsejtekkel — ATP-vel, F^--dal le nem választható.



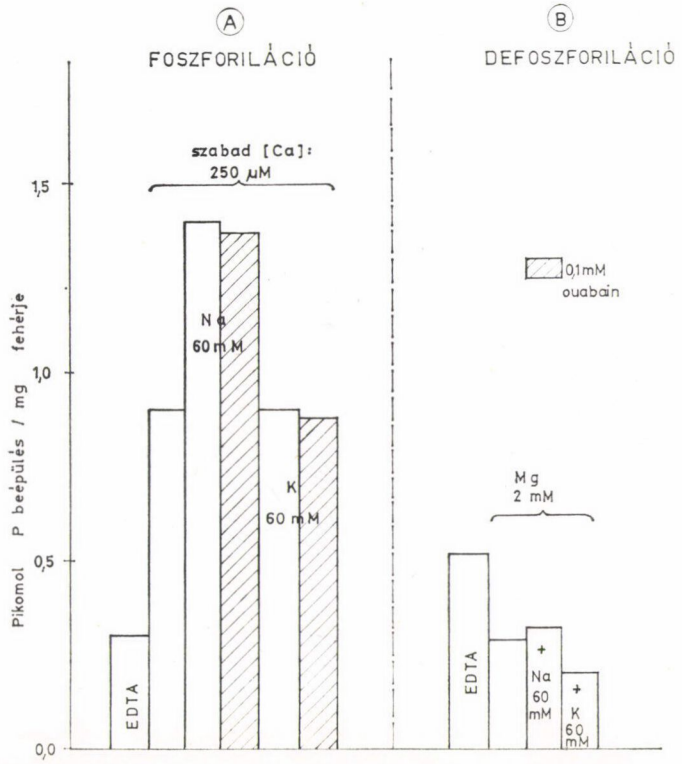
7. ábra. Izolált membrán foszforilációja ^{32}P-ATP-ről, Ca, EDTA + Ca, EDTA + La jelenlétében (SDS-poliakrilamidgél elektroforézis vizsgálat). SCHATZMANN (1973) szerint preparált membránt használtunk (0,4 mg fehérje/ml kísérleti elegy). Inkubációs közeg: 0,5 μM ^{32}P-ATP, 30 mM imidazol-HCl (pH 7,0) + *A.* 0,25 mM $CaCl_2$, *B.* 0,5 mM Trisz-EDTA + 0,75 mM $CaCl_2$, *C.* 0,5 mM Trisz-EDTA + 0,75 mM $LaCl_3$. Inkubációs idő: 30 mp. t = 0 °C. Alapos 6% TCA, 1 mM ATP, 10 mM H_3PO_4-val való mosás után elektroforézis és mérés, mint a 6. ábránál



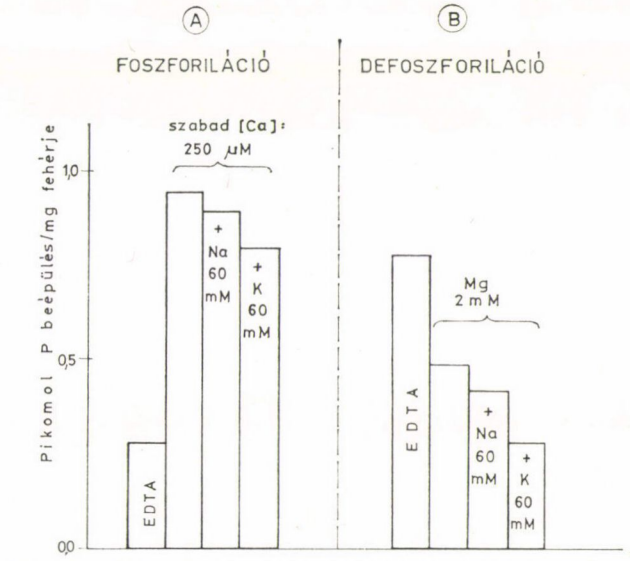
8. ábra. Lantán hatása IOV foszforilációjára és defoszforilációjára. Inkubációs közeg: 2,5 μM ^{32}P-ATP, 125 mM KCl, 30 mM imidazol HCl (pH 7,0). *A.* Foszforilációs kísérletek. *1* 0,5 mM Trisz-EDTA, *2* 0,5 mM Trisz-EDTA + 0,75 mM $CaCl_2$, *3* 0,5 mM Trisz-EDTA + 0,75 mM $LaCl_3$, *4* 0,5 mM Trisz-EDTA + 1,5 mM $LaCl_3$, *5* 250 μM $CaCl_2$ + 250 μM $HgCl_2$. Inkubációs idő: 30 mp, t = 0 °C. *B.* Defoszforilációs kísérletek. Foszforiláció *2.* rendszer szerint. 30 mp-nél + + 1 mM ATP + *6* 0,5 mM Trisz-EDTA, *7* 0,5 mM $MgCl_2$, *8* 0,5 mM $MgCl_2$ + 0,25 mM $LaCl_3$, *9* 0,5 mM $MgCl_2$ + 1 mM $LaCl_3$, *10* 0,5 mM $MgCl_2$ + 0,25 mM $HgCl_2$. Inkubálási idő: 15 mp. Mosás, mint a 6. ábránál, szolubilizálás, mérés Szász és mtsai (1978a) szerint

K és Na hatása a membrán és IOV Ca-indukált foszforilációjára és a defoszforilációra

Mint már említettük ép vörösvérsejten a külső K vagy Na jelenléte a Ca-pumpa sebességét nem befolyásolta; IOV-n a Ca-transzport sebességét növelte (SARKADI és mtsai 1978). Izolált membránfragmentumok CaMgATPáz aktivitását szintén fokozta (BOND, GREEN 1971, SCHATZMANN, ROSSI 1971). A vörösvérsejt membrán (valamint az agy mikroszóma) foszforilációja Mg + + Ca + Na jelenlétében nőtt, míg Mg + Ca + K jelenlétében csökkent az univalens kationt nem tartalmazó kontrollokhoz viszonyítva (SZÁSZ 1975). Mivel ouabain az előbbi esetben csökkentette, utóbbi esetben növelte a foszforiláció mértékét, feltételezhetjük, hogy a foszforilációban a K — Na pumpa foszforilált intermedierje is szerepet játszik. A K — Na-pumpa Mg hiányában nem foszforilálódik, míg — mint az előbbiekben láttuk — a Ca-pumpa



9. ábra. Ca + Na vagy K (± ouabain) hatása a vörösvérsejt membrán foszforilációjára és defoszforilációjára. A foszforiláció és defoszforiláció feltételeit l. 8. ábra magyarázatában

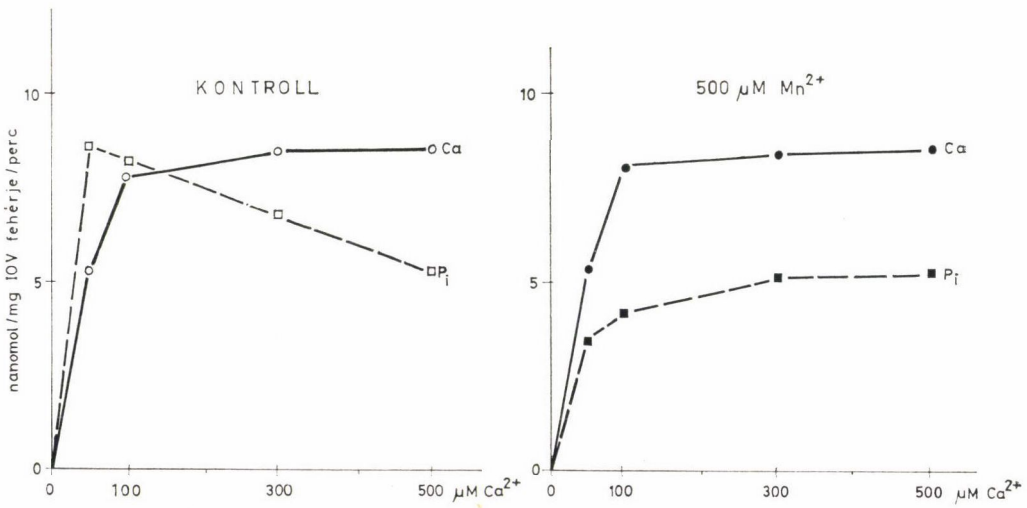


10. ábra. Ca + Na vagy K hatása IOV-k foszforilációjára és defoszforilációjára. Feltételeket l. 8. ábra magyarázatában

igen. Ezért a Na vagy K hatását a Ca-pumpa foszforilációjára EDTA + Ca jelenlétében vizsgáltuk meg. Izolált membránon a Na jelen esetben is fokozta, K pedig csökkentette a foszforilációt, a ouabain azonban hatástalan volt (9. ábra). Foszforilációt csak a 150 000 daltonos régióban észleltünk, a K—Na-pumpa foszforilálódó alegységének megfelelő 105 000 daltonos régióban nem. IOV-n mind a Na, mind a K csökkentette a foszforilációt (Na kisebb mértékben), s jól látható volt a defoszforiláció gyorsítása (10. ábra). Úgy látszik tehát, hogy fragmentált membránon, amennyiben megakadályozzuk a K—Na-pumpa foszforilációját, még mindig van Na-mal stimulálható foszforiláció (CaMgNa proteinkináz aktivitás?). Ennek molekuláris hordozóit IOV preparálás folyamán majdnem teljesen elveszítjük. A fenti eredményeket összegezve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Ca-pumpa működése során mind a Na, mind a K a membrán belső felszínével reagálva a defoszforilációt gyorsítja. Ez a következtetés összhangban van azzal a közléssel, hogy a vörösvérsejtmembrán p-nitrofenilfoszfatáz aktivitása Ca jelenlétében K vagy Na hatására fokozódik (REGA és mtsai 1973).

CaMgATPáz és sztöchiometria vizsgálatok IOV-n

IOV-n igyekeztünk a Ca-akkumuláció Ca : ATP sztöchiometriáját igazolni. A CaMgATPáz aktivitás Ca függése azonban ezen az objektumon erősen eltért a Ca-transzportétól. Míg a Ca-transzport K_{mCa} értéke 50 μM körül volt és 200—300 μM Ca maximálisan aktiváló hatású volt, a CaMgATPáz a μmoláris Ca-tartományban már maximális aktivitást adott és 200 μM Ca

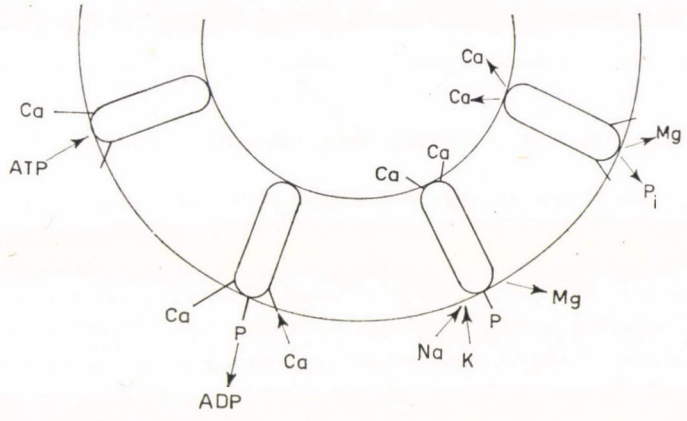


11. ábra. Mn hatása IOV-k aktív Ca felvételére és CaMgATPáz aktivitására különböző Ca koncentrációknál. 0,4 mg IOV fehérje/ml rendszer. Közeg: 550 μM ATP, 5 mM Mg, 120 mM KCl, 30 mM imidazol HCl (pH 7,0). Inkubációs idő: 10 perc. t = 37 °C. Foszfor meghatározás HAYASHI (1976) szerint, Ca-felvétel mérés SARKADI és mtsai (1978) szerint

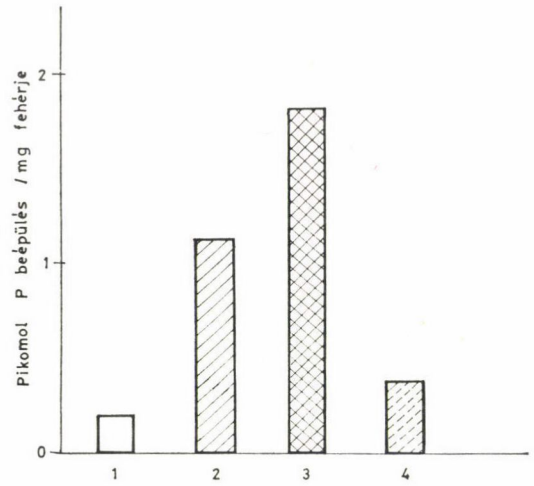
koncentrációnál hanyatlott (11A ábra). Az izolált membránfragmentumok CaMgATPáz aktivitásának Ca-érzékenysége is igen hasonló (Szász és mtsai 1977). Feltételeztük, hogy a membrán belső felszínén a nem Ca-pumpához rendelt egyéb enzimrendszerek zavaró hatásával állunk szemben (bár meg kell jegyeznünk, hogy ép vörösvérsejtekben ezek aktivitása közel párhuzamos volt a Ca-pumpa ATPázával). A membrán belső oldalán ható, szelektív Ca-pumpa gátlószert nem találtunk, lantán, higany, vanadát, quercetin, acetilfenilhidrazin minden Ca-aktivált ATPáz aktivitást eltüntetett. Trivalens kationokkal (Al, Fe) gátolva a foszfolipáz C aktivitását lényeges változást nem észleltünk. Egyedül a Mg-proteinkinázokat gátló Mn tette annyira hasonlóvá a Ca-transzport és a CaMgATPáz aktivitásának görbéit, hogy sztöchiometria számításokat is végezhettünk (11B ábra). A Ca :ATP arány 1,3—1,9 közötti értékeket adott, készítményenként jelentősen változó mértékben. Gondolnunk kell arra, hogy a Mn mint membránstabilizálószer hathat, s az IOV-ben kis Ca koncentrációnál esetleg „szétkapcsolt" pumpa molekulák restitúcióját segíti elő. Az intakt sejtek A23187 jelenlétében Mn által előidézett lantán-inszenzitív CaMgATPáz aktivitás gátlása (l. fent) azonban arra utal, hogy a Ca-pumpától független ATP→Pi átalakulási folyamatok is gátlódnak. Hasonló, de még kifejezettebb hatást az IOV-k ATP nélkül 2—3 Mn Ca-mal történő előkezelése után is elértünk: 200 μM[Ca]$_i$-nál 1,97—2,29 Ca : P sztöchiometria értékekkel. Mn jelenlétében és Ca előkezelés után nyert eredményeink a 2 : 1 Ca : ATP sztöchiometria arányt látszanak alátámasztani.

A Ca-pumpa mechanizmusa

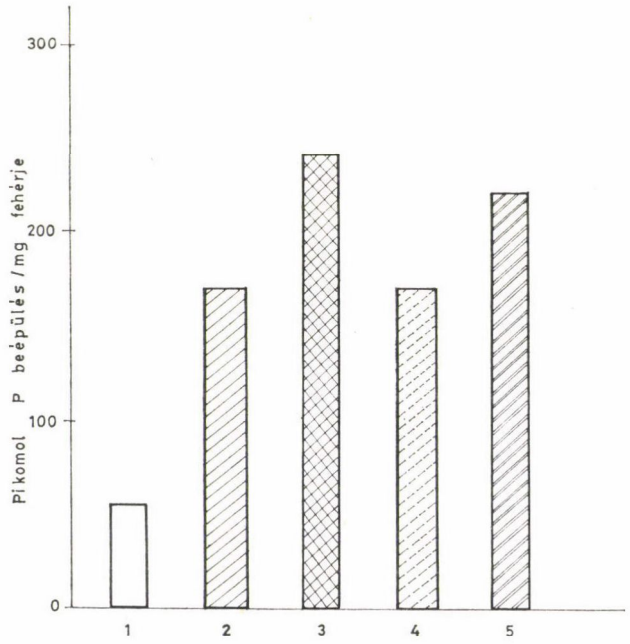
Kísérleteink alapján a Ca-pumpa működését a következőképpen képzeljük el (12. ábra): A magas Ca-affinitású Ca-kötőhelyre a membrán belső felszínén Ca kötődik és katalizálja 150 000 daltonos foszforilálódó alegység ^{32}P-ATP-ről történő foszforilációját. Ezt követően az alacsonyabb Ca-affini-



12. ábra. A Ca-pumpa működés feltételezett lépései IOV-n



13. ábra. Foszforiláz b kináz és foszforiláz foszfatáz hatása IOV-k foszforilációjára 0 °C-on. 0,4 mg IOV fehérje/ml. Közeg: ATP: 2,5 μM *1.* 500 μM EDTA *2—4.* 100 μM Mg, 25 μM Ca. Adalékok: *3.* foszforiláz b kináz (0,015 E/ml) *4.* foszforiláz foszfatáz (1,5 E/ml). Inkubációs idő: 1 perc. t = 0 °C



14. ábra. Foszforiláz b kináz, foszforiláz foszfatáz és kalmodulin hatása IOV-k foszforilációjára 37 °C-on. 0,4 mg IOV fehérje/ml. Közeg: ATP: 100 μM *1.* 500 μM EDTA, *2—4.* 5 mM Mg, 100 μM Ca. Adalékok: *3* foszforiláz b kináz (0,015 E/ml), *4* foszforiláz foszfatáz (1,5 E/ml), *5* DEAE-cellulózon tisztított vörösvérsejt kalmodulin (0,05 mg/ml). Inkubációs idő: 1 perc, t: 37 °C

tású kötőhely is köt Ca-ot, s a molekula térszerkezete úgy változik meg, hogy két Ca-ot a membrán külső felszínére juttat (kérdéses, hogy a nagy affinitású kötőhelyhez kötődő Ca is transzportálódik-e, vagy a kis affinitású kötőhelyhez kapcsolódik két Ca?). A belső felszínen Mg és K vagy Na kötődik, katalizálja a molekula defoszforilációját, a Ca a pumpa molekuláról leválik és a pumpa felveszi kiinduló állapotát.

A Ca-pumpa aktivitás regulációja

Az alacsony Ca affinitású Ca-kötőhelyek affinitása a pumpa aktíválódási folyamata során megnőhet. Az itt vázolt molekuláris mechanizmus működése tehát egy reguláló rendszer által szabályozott. Ez valószínűleg a bimolekuláris lipid réteg belső felszínén húzódó hálózatban lokalizálódik s IOV preparáláskor részben eltávolítjuk, míg a vörösvérsejt oldható, ún. aktivátor fehérjéjének hozzáadásakor visszaadjuk. Lehetséges, hogy egy — a vörösvérsejt membránban kimutatott — CaMgproteinkináz-proteinfoszfatáz rendszer foszforilációs folyamattal szabályozza a Ca-pumpa működését. Azok az IOV-készítmények, amelyeknek Ca-pumpa rendszere magas Ca-affinitású volt, ugyanolyan magas „CaMgATPáz" aktivitásúak ($\sim$ 30 nmol P_i/mg fehérje . perc 10 μM Ca-koncentrációnál), mint az izolált membrán fragmentumok. Alacsony Ca-affinitással rendelkező IOV-készítmények „CaMgATPáz" aktivitása ennek csak mintegy 1/5-e volt. A foszforilációs reguláció vizsgálata érdekében már ismert Ca-dependens enzimeket, a COHEN (1975) szerint részlegesen tisztított nyúl vázizom foszforiláz b kinázt és a Brandt és mtsai (1974) szerint tisztított nyúl vázizom foszforiláz foszfatázt adtuk az IOV-khez. EDTA + Ca tartalmú rendszerekben ezek az enzimek a foszforilációt nem befolyásolták. Mg jelenlétében viszont a kináz a foszforilációt mintegy 1,5-szeresre emelte, a foszfatáz pedig jelentősen csökkentette (13. ábra). A Ca-transzportot a kináz fokozta, a foszfatáz viszont semmi hatást nem mutatott. Ezért a foszforilációs kísérleteket a transzport vizsgálatoknak megfelelő körülmények között (hőmérséklet, ATP koncentráció) megismételtük. Ilyenkor a kináz hatása megmaradt, a foszfatáz semmi hatást nem fejtett ki (14. ábra). A kináz enzim hatásossága hőkezelés után nem változott. Ez arra utal, hogy a hatásért hőstabil Ca-kötő alegysége, a kalmodulin (LARSEN, VINCENZI 1979) felelős. Lehetséges, hogy ez, az IOV-n megmaradt proteinkinázokhoz kapcsolódva hat, de még nem tekinthető bizonyítottnak, hogy foszforilációs reakció szerepet játszik a regulációban. A kalmodulin szerepe viszont igen valószínűnek tekinthető. A foszforiláció szerepének tisztázását nagyon megnehezíti az a tény, hogy Ca és Mg jelenlétében nagyszámú vörösvérsejt membránkomponens foszforilálódik, amelyek közül egyelőre nem tudjuk elkülöníteni az esetleg a Ca-pumpa működéshez kapcsolt komponenst. Ezért a továbbiakban igyekszünk az IOV-t megtisztítani e foszforilálódó komponensektől és az aktiválást ismert tisztított frakciók hozzáadásával előidézni.

Köszönetnyilvánítás

A technikai kivitelezésben nyújtott lelkes, megbízható segítségért ezúton is köszönetet mondunk Andrási Lászlóné, Dr. Sarkadi Ádámné és Dr. Stokum Gyuláné asszisztenseknek.

A munka az Egészségügyi Minisztérium 3. sz. „Életfolyamatok szabályozásának mechanizmusa (Bioreguláció)" megnevezésű tárcaszintű kutatás főirányhoz elfogadott „Vörösvérsejtek transzport folyamatainak mechanizmusa. Vörösvérsejtek funkcionális és anyagcsere vizsgálata" c. témában végzett kutatómunka alapján készült (6—03—0306—01—1/Gá).

IRODALOM

Bond, G. H., Green, J. W.: Biochim. Biophys. Acta **241,** 393 (1971).
Brandt, H., Killilea, S. D., Lee, E. Y. C.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **61,** 598 (1974).
Cohen, P.: Eur. J. Biochem. **34,** 1 (1973).
Gezelius, G.: Anal. Biochem. **80,** 627 (1977).
Greenquist, A. C., Shohet, S. B.: in "Erythrocyte Structure and Function", ed. Brewer, G. J., Alan, R. Liss, Inc., New York p. 515 (1975).
Hayashi, M.: Anal. Biochem. **76,** 9 (1976).
Klausner, R. D., Fishman, M. C., Karnovsky, M. J.: Nature **281,** 82 (1979).
Knauf, P. A., Proverbio, F., Hoffman, J. F.: J. Gen. Physiol. **63,** 324 (1974).
Larsen, F. L., Vincenzi, F. F.: Science **204,** 306 (1979).
Quist, E. E., Roufogalis, B. D.: FEBS Letters **50,** 135 (1975).
Rega, A. F., Richards, D. E., Garrahan, P. J.: Biochem. J. **136,** 185 (1973).
Sarkadi, B., Szász, I., Gárdos, G.: J. Membrane Biol. **26,** 357 (1976).
Sarkadi, B., Szász, I., Gerlóczy, A., Gárdos, G.: Biochim. Biophys. Acta **464,** 93 (1977).
Sarkadi, B., Macintyre, J. D., Gárdos, G.: FEBS Letters **89,** 78 (1978).
Schatzmann, H. J.: J. Physiol. **235,** 551 (1973).
Schatzmann, H. J., Rossi, G. L.: Biochim. Biophys. Acta **241,** 379 (1971).
Shamoo, A. E., MacLennan, D. H.: J. Membrane Biol. **25,** 65 (1975).
Shapiro, A. L., Vinuela, E., Maizels, J. V., Jr.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **28,** 815 (1967).
Szász, I.: Vörösvérsejtek ATP-igényes folyamatainak vizsgálata. Kandidátusi értekezés (1970).
Szász, I.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **10,** 25 (1975).
Szász, I., Sarkadi, B., Gárdos, G.: J. Membrane Biol. **35,** 75 (1977).
Szász, I., Hasitz, M., Sarkadi, B., Gárdos, G.: Mol. Cell. Biochem. **22,** 147 (1978a).
Szász, I., Sarkadi, B., Schubert, A., Gárdos, G.: Biochim. Biophys. Acta **512,** 331 (1978b).
Szeinberg, A., Clejan, L.: Biochim. Biophys. Acta **93,** 564 (1964).
Szelényi, J. G., Breuer, J. H., Győrffy, Gy., Hasitz, M., Horányi, M., Hollán, S. R.: Haematologia **6,** 327 (1972).

AZ EMBERI TROMBOCITA MEMBRÁN GLÜKOPROTEINJEIRŐL*

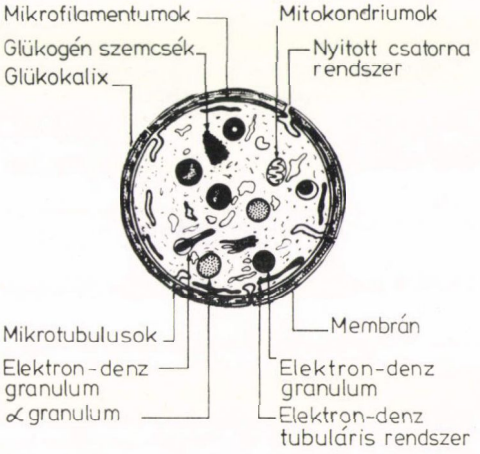
HASITZ MÁRIA

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest

A trombocita és a trombocita membrán

A trombocita normál körülmények között 2—4 μm átmérőjű és 1μm vastag korong. A sejtben nincsen mag. Vannak mitokondriumok, glükogén szemcsék, alfa granulumok, denz granulumok és lizozómák. Ekvatoriálisan helyezkedik el a 15—20 nm vastag kontraktilis fehérjékből álló mikrotubuláris rendszer. Ugyancsak kontraktilis elemek alkotják a mikrofilamentumokat (1. ábra).

A trombocita plazma membránja két részből tevődik össze: ‚unit-membrán'-ból és az azt borító glükokálixból. A sejtet behálózza a plazma oldal felé nyitott csatornarendszer, amely szintén plazma membránnal borított. A trombocita ‚unit-membrán'-jának vastagsága 7—8 nm, a glükokálixé 10—20 n. A glükokálix igen gazdag szénhidrátokban (3, 44). Összehasonlítva a vérben keringő többi sejttel csak a trombocita rendelkezik ilyen vastag glükokálixszal, így a trombocita membránja 3—8× olyan vastag, mint a vö-



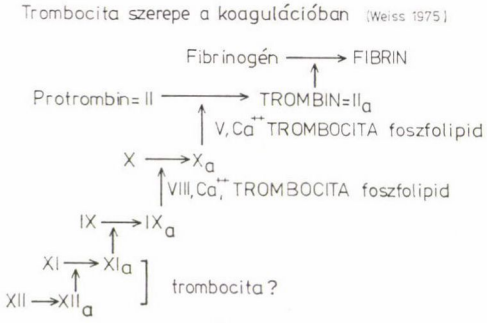
1. ábra. A trombocita ultrastruktúrájának sematikus rajza (43)

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

rösvérsejté illetve, a fehérvérsejteké (13). A trombocita membrán 57% fehérjét, 33% lipidet és 8% szénhidrátot tartalmaz. A szénhidrát eloszlása: 75% fehérjéhez asszociált és 25% mukopoliszacharida. Összetevői: 8% sziálsav, 29% hexozamin és 63% hexóz (2). A sziálsav tartalom 50—60%-a található a membrán glükoproteinekben (14). A membrán megismerésében komoly problémát jelent, hogy a külső köpeny könnyen adszorbeálja a legkülönbözőbb anyagokat a plazmából. In vitro hatásokra pedig, jelenlegi tudásunk szerint a glükokalix legtöbb összetevője a vízoldható fázisba kerül. Ezért ma még nincs módszer a glükokálix összetételének tanulmányozására, csak a glükoprotein komponensét, a glükokálicint ismerjük.

A trombocita és a trombin fiziológiás kölcsönhatásai

A trombocita membrán fontos szerepet játszik a hemosztázis felületi reakcióiban. Különböző külső ingerek aktiválják a trombocitákat és elindítják a trombociták jellegzetes echinocyter alakváltozását és aggregációját, majd szekréciós folyamatait. Ennek következtében a sejt a következő anyagokat választja ki: adenozin-difoszfát, adenozin-trifoszfát, kalcium, szerotonin, savanyú hidrolázok, béta tromboglobulin, trombocita négyes faktor és trombocita növekedési faktor. Ezt az összetett jelenséget nevezzük az angol irodalom alapján ‚release'-nek. Evvel egyidőben hozzáférhetővé válik a plazma membránhoz lokalizálható (4) trombocita hármas faktor, amely foszfatidil-szerint és foszfatidil-inozitolt tartalmaz (13). A plazmában levő véralvadási faktorok aktiválódásához a felszabadult és a felszínen hozzáférhetővé váló trombocita eredetű anyagokra is szükség van. A véralvadási rendszer aktiválódása zuhatagszerűen megy végbe (2. ábra). Ebben a folyamatban a protrombinból keletkező trombin az egyik legfontosabb in vivo trombocita aggregáló ágens. A trombin által okozott trombocita aggregációt és szekréciót legalább olyan behatóan tanulmányozták, mint a trombin okozta fibrinogén-fibrin átalakulást.



2. ábra. A véralvadási faktorok aktiválási menetének sémája (42)

A trombocita fiziológiás trombin kötése reverzibilis (39), de kinetikailag igen összetett jelenség. A trombocita felszínén levő trombin receptor trombin kötése specifikus; amennyiben nem köt protrombint és aktiválási közti termékeket (40), de nem teljesen fajspecifikus, miután majdnem azonosan köti a humán és borjú trombint (37).

A trombin proteolitikus enzim, a trombocitával való reakció közben mérhető néhány jellemzője nem felel meg az enzim katalizált reakciók jellemzőinek pl. a hőtermelődés trombin koncentráció függése (35). Modelleket és különféle teóriákat dolgoztak ki, hogy feloldják azt az ellentmondást, hogy a trombin kötés reverzibilis, és nyilvánvalóan nincs „turn over". MARTIN és mtsai felhívták a figyelmet a trombocita felszínén elhelyezkedő trombin receptor természetére (19), szerintük ugyanis a stimulus mértékét a trombin és az általa modifikált receptor komplex egyensúlyi koncentrációja határozza meg. Elektronmikroszkópos autoradiografiával úgy találták, hogy a ^{125}J-trombin inkább kötődik a glükokálixhoz, mint a membránhoz (39). TOLLEFSEN és mtsai preparálták a trombin + receptor komplexet, molekulasúlyát 200 000-nek találták, és vizsgálataik alapján bizonyossá vált az is, hogy egyféle molekula működik a trombocita felszínén, mint trombin receptor, negatív kooperativitásban (41). Ugyanis az ún. nagy trombin aktivitású tartományban (0,05—0,6 nM) 500 receptor molekula található, disszociációs konstans 2 nM. 2,5 nM koncentráció felett számuk ugrásszerűen megnőtt 30—50 000-re, disszociációs konstans 30 nM. (7, 8, 39). Fiziológiásan 100 trombin molekula megkötése elindítja az aggregáció és szekréció reakcióit (36). A trombin koncentráció növekedésével létrejövő receptor szám növekedés csak úgy lehetséges, ha a trombin hatására a receptorok száma megnőhet.

A glükokálix glükopr oteinje, a glükokálicin

LOMBART és munkatársai a trombocita membrán gyártásánál keletkező vízoldható frakcióban identifikálták, majd preparálták a glükokálix glükoproteinjét (17). A glükokálicin elnevezéssel utaltak eredetére.

A glükokálicin molekulasúlya 148 000 ± 5 000. A glükokálicin felszíni eredetű, mert 1. a teljes sejt neuraminidáz kezelésével a glükokálicin sziálsav tartalma teljes egészében leemészthető. 2. a sejt kimotripszin kezelésére a glükokálicin szétválik makroglükopeptidre (118 000 ± 5 000) és peptid fragmentumra (45 000 ± 2 000). A makroglükopeptid azonosnak bizonyult azzal, amit a teljes sejt kimotripszines emésztésénél is nyertek (30). 3. a sejtet ^{14}C-gliciletilészterrel kezelve transzglutamináz jelenlétében a glükokálicin is jelölődik. 4. tripszinnel, illetve kimotripszinnel kezelt sejt nem aggregál antiglükokálicin-csirke-antiszérummal. (27)

A glükokálicin 60 g% (46 mol%) szénhidrátot tartalmaz és a teljes sziálsav mennyiség 10%-át. Fontosabb szénhidrát összetevői: galaktóz: N acetil-

galaktózamin: N acetilglükozamin: sziálsav = 2 : 1 : 1 : 2 arányban, de kis mennyiségben tartalmaz: glükózt (2,3 mol%), mannózt (1,2 mol%) és fukózt (1,9 mol%). Fontosabb aminosav összetevői szerint (4,9%), treonin (7,6%), leucin (6,7%), prolin (6,8%), aszparagin (4,7%), illetve glutamin maradékok (5,8%). Alacsony a lipofil aminósavak aránya, bár nem kizárható, hogy a részletes szekvencia vizsgálatnál feltárható lesz hidrofób rész is a molekulában (28). A trombocita membrán kutatás területén elterjedt az a hibás nézet, hogy csak az a fehérje van a felszínen, amely ^{125}J-dal jelölhető laktoperoxidáz jelenlétében (5, 6, 31, 32, 33, 34, 45). A glükokálicin nem jelölődött. Ennek oka, amint az aminósav összetétel vizsgálatok során kiderült az, hogy a molekula kevés tirozint tartalmaz és azt is csak a peptid fragmentumban. Ebből viszont az következik, hogy a glükokálicin peptid fregmentumának tirozin tartalmú része a sejtben nem hozzáférhető a ^{125}J számára (28).

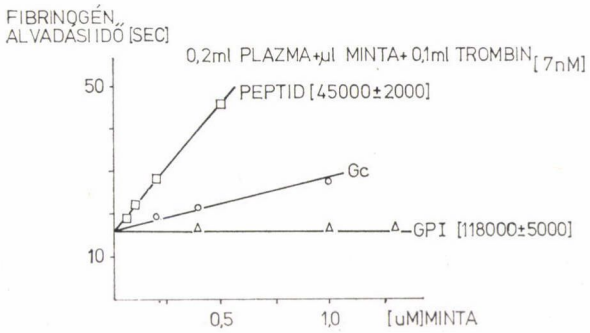
A glükokálicin mint trombin receptor

Okumura és Jamieson megvizsgálták, hogy milyen hatással van a glükokálicin a teljes sejt különböző ágensek okozta in vitro aggregációjára: trombin és risztocetin jelenlétében a sejtek aggregációja csökken, azaz az aggregációs idő megnyúlt; hatástalan volt az adenozin-difoszfát és kollagén okozta trombocita aggregációra (26).

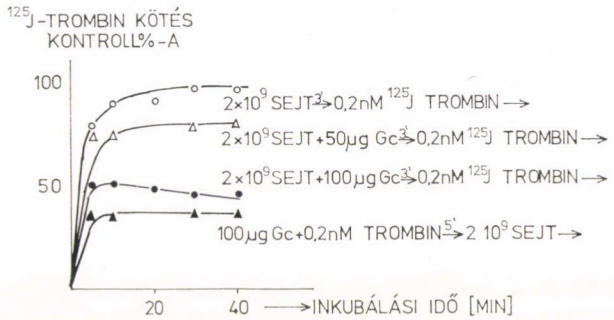
A trombin aktivitás jellemzésére széles körben elterjedt a trombin által indukált fibrinogén-fibrin átalakulás idejének mérése. A glükokálicin tripszines emésztésével nyert peptid fragmentum (45 000 $\pm$ 2 000) még jobban meghosszabbította a fibrinogén alvadási időt, mint maga a glükokálicin, míg a makroglükopeptid hatástalannak bizonyult. Ebből következik, hogy a peptid rész képes kötést létesíteni a trombinnal, csökkentve ezzel a trombin mennyiségét és megnövelve a fibrinogén-fibrin átalakulás idejét, ezek szerint tehát a glükokálicin molekula peptid része a felelős a trombin kötésért (29). Ez látható a 3. ábrán.

Megmértük a trombociták ^{125}J-trombin kötését az idő függvényében. A trombin felvétel kb. 10 perc múlva elérte a maximumot, glükokálicin jelenlétében csökkent trombin kötés jött létre (4. ábra). Ezek után megnéztük, hogy milyen hatással van a glükokálicin a sejt által megkötött jelzett trombin leválására. A sejteket jelölt trombinnal kezeltük, majd kontrollként százszoros feleslegben adtunk hideg trombint és mértük a jelölt trombin felszabadulását. Ha hideg trombin felesleg helyett glükokálicint adtunk a rendszerhez, az is leválasztotta a kötött trombint (5. ábra). Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a glükokálicin reverzibilisen gátolja a trombin kötést.

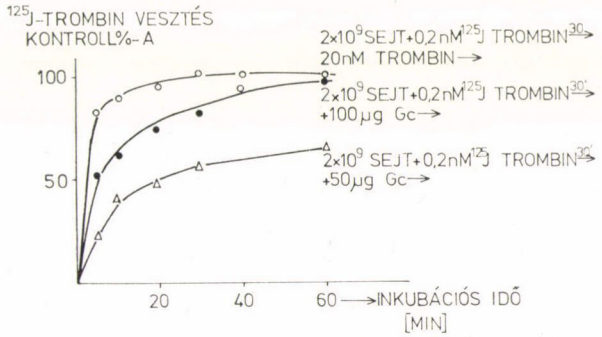
Ezen kísérletek eredményeként állítottunk össze egy trombin kötés gátlás tesztet, amelyet további kísérleteinkben hasznosítottunk (29). Kis trombin koncentráció tartományban (0,1—0,6 nM) megnéztük a glükokálicin



3. ábra. **Fibrinogén alvadási idő mérése különböző mennyiségű glükokálicin és annak tripszines emésztésével nyert frakciók jelenlétében (29)**



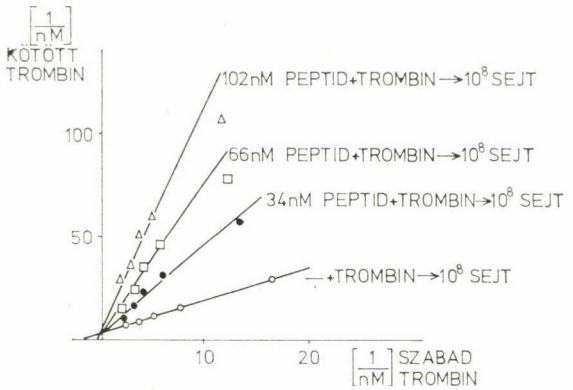
4. ábra. **A glükokálicin trombin kötés gátlása. A megfelelően kezelt és inkubált sejteket RAWP Millipore szűrőn gyűjtöttük össze és Beckman γ-számlálóban értékeltük (29)**



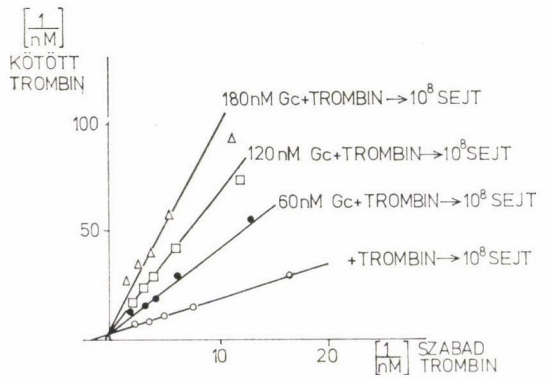
5. ábra. **A glükokálicin hatása a trombocita által megkötött trombin felszabadulására (29)**

és a belőle nyert peptid fragmentum trombin kötés gátlását. A 6. és 7. ábrán látható a kötött trombin és a szabad trombin összetartozó értékeinek kettős reciprok ábrázolása. Mindkét anyag kompetitív gátlást hozott létre, a makroglükopeptid hatástalan volt ebben a rendszerben is. Ábrázolva az egyenesek meredekségét az inhibitor koncentráció (ez esetben a glükokálicin és a peptid

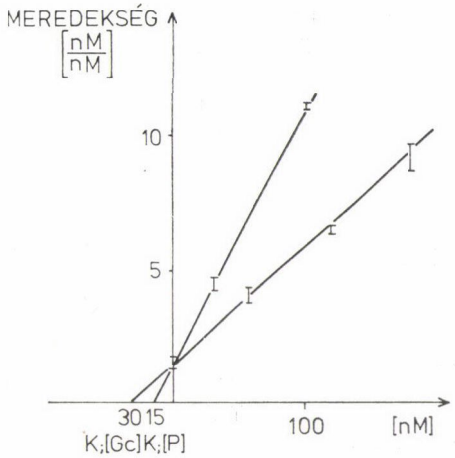
fragmentum) függvényében, az x tengely negatív metszete megadja a gátlási konstanst. Az ábrázolást mutatja a 8. ábra: a gátlási konstans a peptid fragmentumra 15 nM és a glükokálicinre 30 nM. Nagy trombinkoncentrációban hasonló gátlás mutatkozott és a gátlási konstans 30 nM-nak adódott. Ebben a tartományban az összetartozó görbeseregek analízise nem adott egyértelmű elsőrendű összefüggést minden esetben. Úgy tűnik, hogy a nagy trombin koncentrációban, a kis trombin affinitású receptor tartományban más hatások is szerepet játszanak. Valószínűleg kialakul egy (glükokálicin-trombin-trombocita) komplex, amelynek asszociációja és disszociációja is befolyásolja a reakciót. Egyelőre nincs bizonyíték arra, hogy ez in vivo is létrejönne vagy csak az in vitro teszt korlátozottságának következménye. Ezek az összehasonlító in vitro kísérleteink azt bizonyították, hogy a trombin kötés gátlási konstansa és a kötött trombin disszociációs konstansa a nagy és kis trombin affinitású receptor tartományban azonos értékek. A szeparált glüko-



6. ábra. A glükokálicin trombin kötés gátlása kis trombin koncentráció tartományban (0,1 — — 0,6 nM) (29)



7. ábra. A glükokálicin tripszines emésztésével nyert peptid fragmentum trombin kötés gátlása kis trombin koncentráció tartományban (0,1 — 0,6 nM) (29)

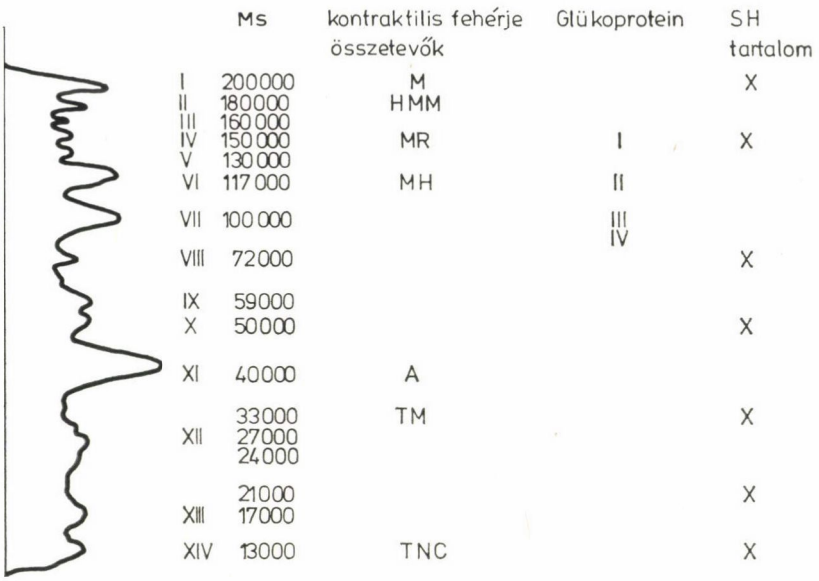


8. ábra. A gátlási konstans meghatározása. Felvettük a glükokálicin és annak tripszines emésztésével nyert peptid fragmentum kis trombin koncentráció tartományban történt trombin kötés gátlásának kettős reciprok ábrázolásából (6. és 7. ábrák) számított meredekségnek a koncentráció függését. (29)

kálicin megfelel azoknak a feltételeknek (reverzibilis trombin kötés; trombin kötés gátlása és a gátlás jellege, a molekula súlya és membránban való elhelyezkedése), amivel körülírták a trombocita trombin receptorát.

A trombocita membrán glükoproteinjei

A membrán fehérjéket alkotó polipeptid láncok száma igen nagy: 40 felett van. A 9. ábrán saját számozási rendszerünket tüntettem fel. Tizennégy fő komponens különíthető el normál keresztkötésű 5% SDS-poliakrilamid gélen (10). Ezek többségéről tudjuk már, hogy heterogén frakciók. Viszonyítási alapként feltüntettem a trombocita membránban található kontraktilis elemek összetevőit (16, 20) és az SH-tartalmú fehérjéket (1). Megjelöltem az ebben a rendszerben elválasztható membrán glükoproteinek helyét is (27). 1970-ben már megfigyelték, hogy a trombocitákról háromféle glükopeptidet lehet preparálni (30). Megfigyeltük, hogy enyhén modifikált sejten vagy beteganyagon a 100 000—150 000 molekula súly tartomány igen variábilisnak bizonyult (10). Ebben a régióban található a trombocita membrán glükoproteinjeinek fő tömege. Perjódsavas Schiff-festés és ^{125}J jelölhetőség alapján normál keresztkötésű poliakrilamid gélen 3 glükoproteint tudtak elkülöníteni (2, 21, 22, 25, 31), majd az elekroforézis technikák segítségével és in vitro proteáz kezelések hatásának elemzésével kiderült, hogy számuk háromnál jóval több (27, 34). Alacsony koncentrációjú SDS (0,05%)-vel oldott trombocita membránból agarózzal immobilizált búzacsíra agglutininnel végzett affinitás kromatográfiával sikerült elválasztani a trombocita



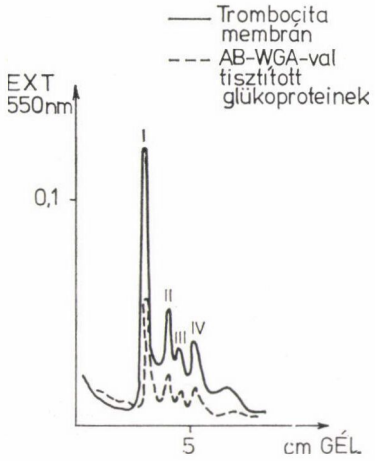
9. ábra. Normál keresztkötésű 5%-SDS-poliakrilamid gél rendszerben javasolt számozási rendszerünk a trombocita membrán fehérjék jellemzésére (10) összevetve az irodalmi adatokkal

membrán glükoproteineket a többi membrán fehérjétől. A glükoproteinek mennyiségileg és minőségileg is megegyeztek a kiindulási mintában levő glükoproteinekkel (10. ábra). Az így nyert preparátum szénhidrát tartalomra, fehérjére előhíva is azonos anyagot tartalmazott (11. ábra). Az SDS-poliakrilamid gélből elvált anyag mennyiségi fehérje meghatározása nagy mértékben megegyezett a PAS festés alapján számítható arányokkal (lásd 1. táblázat). Az eredmények alátámasztották azokat az irodalmi adatokat is, amelyek szerint a trombocita membrán glükoproteinjei nem mennyiségi arányukban kötik a fehérje festésre használt coomassiee festékeket (9, 32).^{125}J jelölt sejtből készített membrán kétdimenziós elektroforetikus futtatása után a ^{125}J tartalmú foltok elhelyezkedése nem egyezett meg a PAS festett glükoprotein foltokkal (34). Az általam preparált glükoproteinek kétdimenziós elektroforé-

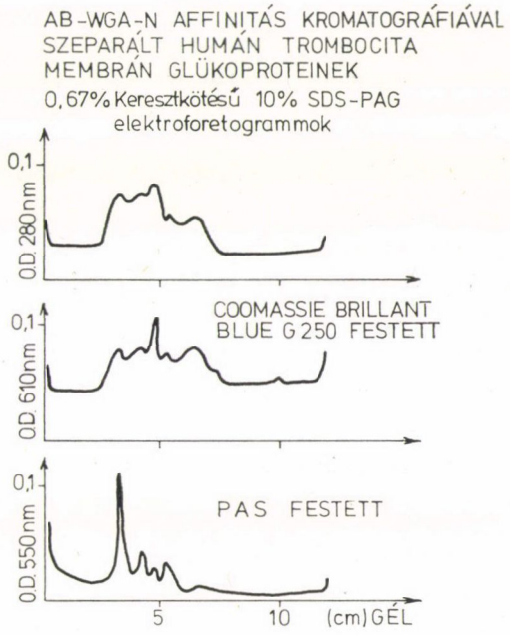
1. táblázat

Az affinitás kromatográfiával tisztított glükoproteinek mennyiségi összehasonlítása

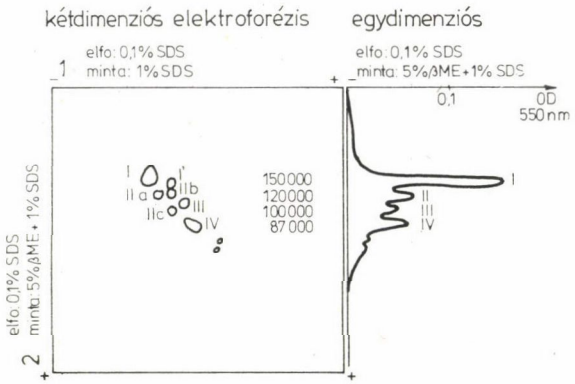
Glükoproteinek	I	II	III	IV
Szénhidrátra előhívott (PAS festett) gélek (11. ábra)	44,5	22,2	11,1	22,2
Gélből eluált anyag fehérje tartalmának aránya mikrofolin módszerrel mérve	46,9	24,3	11,9	16,9



10. ábra. **PAS-festett 1/150 keresztkötésű 10%-SDS-poliakrilamid gél denzitogramja. A trombocita membrán és a búzacsíra agglutininen végzett affinitás kromatográfiával tisztított membrán glükoproteinek összehasonlítása**



11. ábra. **Szénhidrátra és fehérje előhívott 1/150 keresztkötésű 10%-SDS-poliakrilamid gél denzitogramja. Az affinitás kromatográfiával tisztított glükoproteinek minőségi összehasonlítása**



12. ábra. Affinitás kromatográfiával tisztított membrán glükoproteinek eloszlása, két dimenziós elektro-foretogram. Sematikus ábra

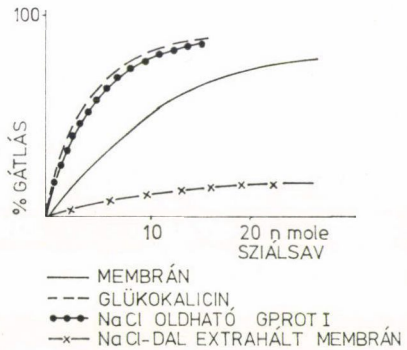
zissel való tanulmányozása azt bizonyította, hogy a PAS festhető és fehérjére festhető glükoproteinek azonosak (12. ábra). Immobilizált búzacsíra agglutininnel NACHMAN és mtsai 150 000 és 200 000 molekulasúlyú glükoproteint preparáltak (23), CLEMETSON és mtsai pedig a glükoprotein I-et (5). Azonban az általuk és általam alkalmazott eljárás néhány pontban lényegesen eltér: más a búzacsíra agglutinint immobilizáló ágens, más fajta és mennyiségű antiproteázokat és fehérje oldására más, más detergenst alkalmaztunk. Mindkét idézett munkacsoport 1% detergens koncentrációt alkalmazott, pedig KAHANE és mtsai szerint a vörösvérsejt glükoproteinekből fele annyi kötődik ebben a koncentrációban a búzacsíra agglutininhez, mint az általam alkalmazott 0,05%-os koncentrációban (15). Ez a kötési képesség csökkenés úgy látszik heterogén és a glükoprotein I-et kevésbé érinti, mint a többi glükoproteint. Valószínűleg azért, mert a glükoprotein I gazdagabb di, és tri N-acetilglükozaminban, amelyeknek nagyobb az affinitásuk a búzacsíra agglutininhez, mint a mono cukroknak (24). A glükoprotein I egy fő és egy minor komponensből áll. A glükoprotein II és III rendkívül heterogén. Egyelőre csak a glükoprotein IV tűnik homogénnek. Más munkám alapján kiderült, hogy a glükoprotein I, amely ezzel a módszerrel is homogénnek mutatkozik, a membránban való orientáltsága alapján heterogén.

A trombocita membrán glükokálicin/glükoprotein I trombin kötésben játszott szerepe

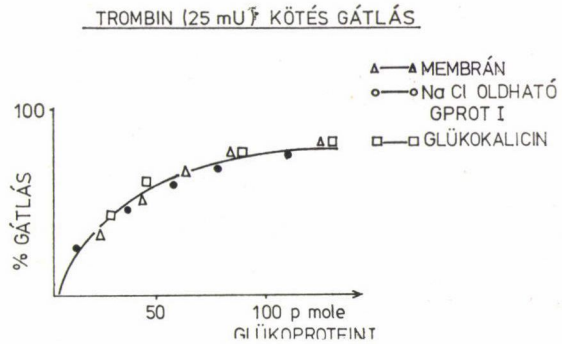
A trombocita lizisekor a 150 000 molekulasúlyú glükoprotein egy része vízoldhatóvá válik, ezt nevezték el glükokálicinnek és bebizonyították glükokálix eredetét (26, 27, 28), másik része membránhoz kötötten marad, ezt nevezik glükoprotein I-nek. Molekulasúlya redukáló körülmények között azonos a glükokálicinéval (27). További jellemzésére szükség volt olyan prepará-

lási módszerre, amivel a glükoprotein I-et el lehetett választani a többi glükoproteinektől. A trombocita membránt nagy sókoncentrációval kezelve oldhatóvá válik a glükoprotein I fele (11). Ez a minta egyéb komponenseket is tartalmaz, amitől búzacsíra agglutininen végzett affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg. Az így nyert minták analízise azt mutatta, hogy a glükoprotein I molekulasúlya, elektroforetikus mobilitása alapján a töltése, immunológiai viselkedése és búzacsíra agglutininnel szembeni viselkedése, teljesen azonos a glükokálicinnel (12).

Az azonosságok kimutatása után logikus volt megnézni, hogyan viselkedik a glükoprotein I a trombin kötésben. Megvizsgáltuk, hogy sziálsav tartalomra azonos mennyiségű trombocita membrán, glükokálicin és glükoprotein I milyen mértékben gátolják a trombocita trombin kötését. 25 mU trombin jelenlétében különböző lefutású telítési görbét kaptunk (13. ábra). Ha a trombin kötés gátlást a glükokálicin/glükoprotein I mennyiségére vonatkoztattuk, azonos görbét adtak (14. ábra). Az a tény, hogy a membrán is

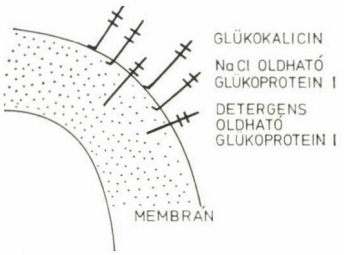


13. ábra. **A trombocita membrán, a glükokálicin és a sóoldható glükoprotein I trombin kötés gátlása 25 mU trombin jelenlétében sziálsav tartalomra vonatkoztatva (29)**



14. ábra. **A trombocita membrán, a glükokálicin és a sóoldható glükoprotein I trombin kötés gátlása 25 mU trombin jelenlétében, a minták glükokálicin/glükoprotein I tartalmára vonatkoztatva (29)**

azonos trombin kötés gátlást, mutatott, ha azt a benne levő glükoprotein I-re vonatkoztattuk, azt bizonyítja, hogy a só oldás után membránban maradt glükoprotein I (detergens oldható glükoprotein I)-nek is azonos a szerepe a trombin kötésben, mint a glükokálicin és glükoprotein I-nek. Munkánk alapján valószínűsíthető, hogy a glükokálicin/glükoprotein I azonos glükoproteinek és betöltik a trombocita trombin receptorának funkcióját (29), külön-



15. ábra. A glükokálicin/glükoprotein I membránban való elhelyezkedésének modellje (12)

bözőségük csak a membránban való orientáltságukban keresendő (12). Az elhelyezkedésre vonatkozó elképzelésünket sematikusan mutatja a 15. ábra. Glükoprotein I só oldás után membránban maradt része (a detergens oldható glükoprotein I) erősebben kötődik a lipoglükoprotein mátrixhoz, mint a sóoldható glükoprotein I és a glükokálicin. Azonban, ha ez a három glükoprotein molekula azonos és mindenben azonos, nehéz elképzelni, miért létezik három különböző alakban: lazán kötve (glükokálicin), hidrofób kötésekkel (sóoldható glükoprotein I) és szorosan (?) kötve (detergens oldható glükoprotein I). Erre kétféle magyarázat lehetséges. Az egyik az, hogy a sejt élete folyamán ez a glükoprotein öregszik és ennek következtében kerül egyre külsőbb régiókba a trombocita egyébként vastag membránjában. A másik elképzelésünk az, hogy ez a háromféle alak csak membrán készítési műtermék abban az értelemben, hogy in vivo ténylegesen csak egyfajta molekula létezik. Ez azonban annak megfelelően, ahogy a sejt funkciója, életkora és külső körülményei megkívánják, a folyékony membrán (38) különböző rétegeiben látja el feladatát. Ezt a glükoproteint a sejt lízisekor „fixáljuk" abban a rétegben illetve állapotban, amelyben éppen volt. Ez a teóriánk (12) választ adhat arra a kérdésre is, hogy a sejt funkciója közben a trombin receptorok száma megszaporodhat (19, 29, 39). Kis koncentrációjú trombin jelenlétében 500 kötőhely mutatható ki, azaz van olyan állapotban, hogy peptid része trombint képes kötni. Ahogy növekszik a trombin koncentráció a szekretáló sejtek a megkötött /vagy eltávozott glükokálicin/ glükoprotein I pótlására felszínre juttatják a membrán glükoprotein I-t. A trombin koncentráció növekedésével olyan folyamatok játszódnak le, amelynek következtében hozzáférhetővé válik a kötésért felelős peptid rész, amely a többi környező

molekula és saját sok cukrot is tartalmazó feje következtében eddig védve volt. Eközben azonban lejátszódik az aggregáció és szekréció folyamatainak bonyolult láncolata is.

Összefoglalva:

A trombocita membrán glükoproteinjei részben glükokálix, részben „unit-membrán" eredetűek. Trombin kötési vizsgálataink alapján állíthatom, hogy e különbözőképpen preparálható glükoproteinek szoros funkcionális rokonságban vannak. Munkánk alapján a glükokálicin/glükoprotein I komplexet tekintjük a trombocita trombin receptorának.

IRODALOM

1. Ando, Y., Steiner, M.: Biochim. Biophys. Acta **419,** 51 (1976).
2. Barber, A. J., Jamieson, G. A.: J. Biol. Chem. **245,** 6357 (1970).
3. Behnke, O.: Ser. Haematol. **3,** 3 (1970).
4. Caen, J. P., Castaldi, P. A., Leclerc, J. C., Inceman, S., Larrieu, M. J., Probst, M., Bernard, J.: Am. J. Med. **41,** 4 (1966).
5. Clemetson, K. J., Pfueller, S. L., Lüscher, E. F., Jenkins, C. S. P.: Biochim. Biophys. Acta **464,** 493 (1977).
6. Crowford, N., Taylor, D. G.: Br. Med. Bull. **33,** 199 (1977).
7. Detwiler, T. C., Feinman, R. D.: Biochemistry **12,** 282 (1973).
8. Detwiler, T. C., Feinman, R. D.: Biochemistry **12,** 2462 (1973).
9. George, J. N., Potterf, R. D., Lewis, P. C., Sears, D. A.: J. Lab. Clin. Med. **88,** 232 (1976).
10. Hasitz, M., Harsányi, V., Rácz, Z., Hollán, S. R.: Haematológia **10,** 343 (1976).
11. Hasitz, M., Okumura, T., Jamieson, G. A.: Fed. Proc. **24,** 94 (1977).
12. Hasitz, M., Okumura, T., Jamieson, G. A.: Kísérletes orvostudomány **32,** 132 (1980).
13. Holmsen, H.: Clin Haematol **1,** 235 (1972).
14. Jamieson, G. A., Barber, A. J., Urban, C.: in Glycoproteins of blood cells and plasma Eds: Jamieson G. A., Greenwalt T. J., Lippencott Co., Philadelphia—Toronto (1971).
15. Kahane, I., Furtmayr, H., Marchesi, V. T.: Biochim. Biophys Acta **426,** 464 (1976).
16. Lindemans, J., Bouma, B. N., Sixma, J. J.: Thromb. Res. **5,** 33 (1974).
17. Lombart, C., Okumura, T., Jamieson, G. A.: Febs Lett. **41,** 30 (1974).
18. Marcus, A. J., Zucker—Franclin, D., Safier, L. B., Ullman, H. L.: J. Clin. Invest **45,** 14 (1966).
19. Martin, B. M., Wasiewski, W. W., Fenton, J. W. II., Detwiler, T. C.: Biochemistry **15,** 4886 (1976).
20. Muszbek, L., Kuznicki, J., Szabó, T.: 106 p. in VIII. Magyar Haematológiai Kongresszus kivonatai (1978).
21. Nachman, R. L., Ferris, B.: J. Biol. Chem. **247,** 4468 (1972).
22. Nachman, R. L., Hubbard, A., Ferris, B.: J. Biol. Chem. **248,** 2928 (1973).
23. Nachman, R. L., Tarasov, E., Weksler, B. B., Ferris, B.: Thromb. Res. **12,** 91 (1977).
24. Nagata, Y., Burger, M. M.: J. Biol. Chem. **246,** 3116 (1971).
25. Nurden, A. T., Caen, J. P.: Br. J. Haematol. **28,** 253 (1974).
26. Okumura, T., Jamieson, G. A.: Thromb. Res. **8,** 701 (1976).
27. Okumura, T., Jamieson, G. A.: J. Biol. Chem. **251,** 5944 (1976).
28. Okumura, T., Lombart, C., Jamieson, G. A.: J. Biol. Chem. **251,** 5950 (1976).
29. Okumura, T., Hasitz, M., Jamieson, G. A.: J. Biol. Chem. **253,** 3435 (1978).
30. Pepper, D. S., Jamieson, G. A.: Biochemistry **9,** 3706 (1970).
31. Phillips, D. R.: Biochemistry **11,** 4582 (1972).
32. Phillips, D. R., Agin, P. P.: Biochim. Biophys. Acta **352,** 218 (1974).
33. Phillips, D. R., Jenkins, C. S. P., Lüscher, E. F., Larrieu, M. J.: Nature **257,** 599 (1975).

34. PHILLIPS, D. R., AGIN, P. P.: J. Biol. Chem. **252,** 2121 (1977).
35. ROSS, P. D., FLETCHER, A. P., JAMIESON, G. A.: Biochim. Biophys. Acta **313,** 106 (1973).
36. SHUMAN, M. A., MAJERUS, P. W.: J. Clin. Invest. **56,** 945 (1975).
37. SHUMAN, M. A., TOLLEFSEN, D. M., MAJERUS, P. W.: Blood **47,** 43 (1976).
38. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: Science **175,** 720 (1972).
39. TOLLEFSEN, D. R., FEAGLER, J. R., MAJERUS, P. W.: J. Biol. Chem. **249,** 2646 (1974).
40. TOLLEFSEN, D. R., JACKSON, C. M., MAJERUS, P. W.: J. Clin. Invest **56,** 241 (1975).
41. TOLLEFSEN, D. M., MAJERUS, P. W.: Biochemistry **15,** 2144 (1976).
42. WEISS, H. J.: N. Engl. J. Med. **293,** 531 (1975).
43. WHITE, J. G.: 86 p. in The platelets, Williams and Williams, Baltimore MD (1971).
44. WHITE, J. G.: 46. p. in The circulating platelet, Ed: Johnson S. A., Academie Press, New York (1971).
45. WHITE, G. C.: II., Workman E. F. Jr., Lundblad R. L.: J. Lab. Clin. Med. **91,** 76 (1978).

NÁTRIUM-PUMPA (Na+K-AKTIVÁLTA MEMBRÁN ATPáz) JELENTŐSÉGE A NEUROKÉMIAI TRANSZMISSZIÓ POSZTSZINAPTIKUS SZABÁLYOZÁSÁBAN*

TÖRÖK TAMÁS és VIZI E. SZILVESZTER

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézete, Budapest

Az ingerületátvitel egy kémiai anyag preszinaptikus membránból való felszabadulása és posztszinaptikus membrán receptoraihoz való kötődése révén megvalósuló fiziológiai folyamat.

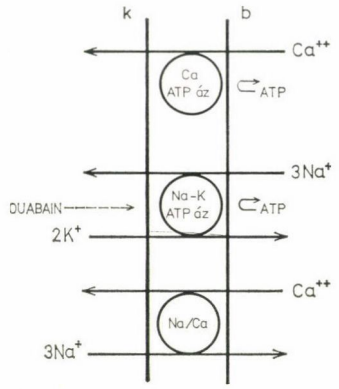
Az élő sejt intracelluláris tere nátriumban és kalciumban szegény, káliumban viszont gazdag. Ennek ellenkezője igaz az extracelluláris térre. Az intra és extracelluláris tér között fennálló egyenlőtlen Na-K ioneloszlást a Na-pumpa biztosítja. Ez a sejt működés egyik legősibb és legfontosabb működése. OVERTON már 1902-ben realizálta a Na-pumpa működésének jelentőségét. Munkájában rávilágított arra, hogy az emberi szív 70 év során $2{,}4 \times 10^9$-szer húzódik össze anélkül, hogy ezen óriási munkavégzés során az intracelluláris alacsony nátrium és magas kálium koncentrációja számottevően megváltozna. Az intracelluláris nátrium koncentráció alacsony szinten való tartása külső kálium függő (STEINBACH 1940), továbbá energia igényes folyamat (CALDWELL és mtsai 1960). Az energiát az ATP szolgáltatja (STRAUB 1952, GÁRDOS és STRAUB 1957).

SCHATZMANN (1953) vörösvérsejten leírta, hogy egy szívglikozidával gátolható pumpa mechanizmus működik. SKOU (1957) idegszövetben biokémiailag igazolta a Na-pumpa működését. Egy, a sejtmembránba lokalizált enzim (membrán ATPáz) felelős a Na-pumpa működéséért, melyet intracelluláris nátrium és extracelluláris kálium aktivál (1. ábra).

Szívglikozidok gátolják mind a Na + K-aktíválta membrán ATPázt (SKOU és mtsai 1971, SIEGEL és VOGT 1979), mind a Na-pumpát (CALDWELL és KEYNES 1959). Hatásuk a membrán külső oldalára lokalizálódik (BRINLEY és MULLINS 1968), továbbá gátló hatásukat a külső kálium ellensúlyozni képes (l. BAKER és WILLIS 1972).

Az utóbbi évek kutatásai során bizonyítást nyert, hogy a Na + K-aktíválta membrán ATPáz fontos szerepet játszik az ingerületátvitel preszinaptikus szabályozásában (VIZI 1972, 1973, 1974, 1975a, b, 1977, PATON, VIZI és ZAR 1971, VIZI és TÖRÖK 1978).

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.



1. ábra. A plazma membrán ion transzport folyamatai: *1.* ATP-függő Ca^{2+}-pumpa, melyet intracelluláris Ca^{2+} aktivál (SCHATZMANN 1966, SCHATZMANN és VINCENZI 1969). *2.* Ouabain függő Na^{+}-pumpa. A pumpa elektrogén, mivel 1 ATP hasítása során $3Na^{+}$ $2K^{+}$-ra cserélődik ki (TÖRÖK és VIZI 1979). *3.* Elektrogén Na^{+}/Ca^{2+} csere, melyet az ATP fokoz (BAKER és MCNAUGHTON 1978, DIPOLO és BEAUGÉ 1979), anélkül, hogy ATP hasítás létrejönne

Jelen munkánkban összefoglaló jelleggel a posztszinaptikus membrán érzékenysége és a Na-pumpa (membrán ATPáz) közötti kölcsönhatást tárgyaljuk. Az irodalmi adatok mellett saját kísérleti adatainkra is támaszkodunk.

Tengeri malac taenia coli simaizom készítmény (BÜLBRING 1954) jó lehetőséget kínált a posztszinaptikus membrán farmakológiai és fiziológiai jelenségeinek tanulmányozására, mivel a simaizom és az idegszövet közötti szinaptikus távolság nagy (GABELLA 1976), szövet acetilkolin tartalma alacsony (VIZI 1976) és spontán elektromos aktivitása a kolinerg beidegzésétől független.

A Na-pumpa stoichiometriája

A Na-pumpa elektrogén jellege azt jelenti, hogy 1 molekula ATP hasítása során több Na^{+} ion hagyja el a sejtet, mint amennyi K^{+} ion kerül felvételre (1. táblázat). Így a pumpa áramerősséget hoz létre a membránon keresztül, mely közvetlenül befolyásolja a membrán potenciált. Simaizomon a MULLINS és NODA (1963) valamint a GORMAN és MARMOR (1974) által leírt módosított „Goldman—Hodgkin—Katz" összefüggést használva a számított Na-pumpa kuplung arány 3Na : 2K : 1ATP (TÖRÖK és VIZI 1979). Idegi struktúrájú szinapszisban (ganglion cervicale superius) a kuplung arány ugyancsak 3 : 2 (BROWN és SCHOLFIELD 1974). A pumpa működését tekintve minden körülmények között elektrogén jellegű (THOMAS személyes közlés).

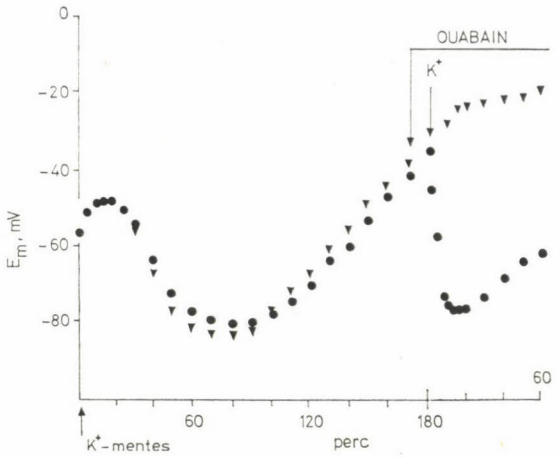
Kimutatták, hogy az elektrogén Na^{+} transzport külső kálium (K_k) függő (ADRIAN és SLAYMAN 1966, BOLTON 1971, 1973, NISHI és KOKETSU

1. táblázat

A Na-pumpa stoichiometriája (1 ATP hasítása során transzportált Na és K ionok mennyisége)

Preparátum	Na : K	Irodalmi adatok
Óriás axon (squid)	3 : 2	Baker és Shaw (1965).
	2 : 1	Sjodin és Beaugé (1967).
	változó	Brinley és Mullins (1974).
(loligo)	3 : 2	Hodgkin és Keynes (1955).
	2—3 : 1	Caldwell és mtsai (1960).
Rák neuron	3 : 2	Baker (1965).
Csiga neuron (Na^+ inj.)	3—4 : 2—3	Thomas (1969).
Molluszka neuron	2 : 1	Gorman és Marmor (1974).
Béka harántcsíkolt izom	3 : 1	Mullins és Noda (1963).
	változó	Adrian és Slayman (1966).
	3 : 2	Dydynska és Harris (1966).
	3 : 2	Erlij és Grinstein (1976).
	2 : 1	Beaugé és Sjodin (1976).
Patkány ganglion cervicale superius	3 : 2	Brown és Scholfield (1974).
Tengeri malac taenia coli simaizom	3 : 2	Brading és Widdicombe (1974).
	2 : 1	Casteels és Wuytack (1975).
	3 : 2	Droogmans és Casteels (1976).
	3 : 2	Török és Vizi (1979).
Emberi vörösvérsejt	3 : 2	Sen és Post (1964).
	3 : 2	Whittam és Ager (1965).
	3 : 2	Garrahan és Glynn (1967).
	3 : 2	Garrahan (1970).

1968, Casteels és mtsai 1971, Brown és mtsai 1969, 1972, Carpenter 1970, Kerkut és Thomas 1968, Thomas 1972, Lees és Wallis 1974, Baker és mtsai 1969, Rang és Ritchie 1968, Tomita és Yamamoto 1971, Wespi 1969). Megvonva a K^+-t a külső közegből a transzmitter felszabadulás fokozódik (Vizi 1972, Baker és Crawford 1975), mely a posztszinaptikus membrán depolarizációjában nyilvánul meg. A pumpa gátlás a fokozott transzmitter felszabadulás okozta depolarizáción túlmenően az effektor sejtet is depolarizálja, nehéz tehát eldönteni, hogy a fokozott transzmitter felszabadulás milyen mértékben felelős az elektrofiziológiai módszerekkel mért depolarizációért. Taenia coli simaizomon K^+-megvonásra három fázisú membrán potenciál változást észleltünk (2. ábra), amely viszont atropin rezisztensnek bizonyult (Török és Vizi, nem közölt adat), így a transzmitter, az ACh hatása kizárható. Ennek feltehetően az az oka, hogy a szinaptikus távolság taenia colin jóval nagyobb, mint más szinapszisokban (Gabella 1976). A kezdetben észlelt depolarizáció az elektrogén Na-pumpa gátlásának a következménye.



2. ábra. Tengeri-malac taenia coli simaizom. „Single sucrose-gap" módszer. K^+-mentes közeg hatására a membrán potenciál változást (E_m, mV) az idő függvényében (min) mértük. Az E_m változás három fázisú. 5,9 mM K^+-visszaadásra elektrogén hiperpolarizáció jön létre, melynek során a E_m 8 mV-al túlhaladja a E_K-t (Török és Vizi 1979) (●); 2×10^{-5}M ouabain az elektrogén hiperpolarizációt meggátolja (▼)

2. táblázat

A Na-pumpa „turnover rate"-je (1 pumpa helyen 1 perc alatt transzportált Na^+ száma)

Preparátum	„turnover rate" $(min)^{-1}$	Irodalmi adatok
Óriás axon	2 900	Baker és Shaw (1965).
Nyúl vágus rost		
(nyugalmi)	240	Keynes és Ritchie (1965).
•(PTHP)	1 500	Rang és Ritchie (1968).
(20 °C max)	1 740	denHertog és Ritchie (1969).
(37 °C)	3 480	
•(PTHP)	480	Landowne és Ritchie (1970).
(K^+-visszaadás)	1 320	
(K^+-visszaadás)	1 380	Vizi és Török, nem közölt adat
Béka harántcsíkolt izom	••180. $(imp.)^{-1}$	Ritchie és mtsai (1976).
(nyugalmi)	200	Erlij és Grinstein (1976).
(K^+ visszaadás)	15 000	
Tengeri malac taenia coli simaizom		
(nyugalmi)	1 320	Brading és Widdicombe (1974).
(K^+-visszaadás)	5 340	Török és Vizi (1980).
Tengeri malac ileum (max.)	15 660	Bolton (1973).
Emberi vörösvérsejt	6 000	Hoffman és Ingram (1969).
	10 500	Ellory és Keynes (1969).
Különböző szövetek	3500—15 000	Baker és Willis (1972).

• tetanusz utáni hiperpolarizáció során
•• egy ingerlést követően

5,9 mM külső K^+ visszaadása elektrogén hiperpolarizációt eredményez, melynek során a membrán potenciál 41 mV-tal nő. Ilyen körülmények között egyedül és kizárólag az elektrogén Na-pumpa felelős a membrán potenciál változásért, hiszen 2×10^{-5} M ouabain a hiperpolarizációt teljesen meggátolta (2. ábra). Ugyanakkor az ouabainnal gátolható Na^+ vesztés 4,08 p-mol . cm^{-2} . · sec^{-1} (Török és Vizi 1980) és mivel 1 μm^2 sejtmembrán 250—300 pumpa helyet tartalmaz (Brading és Widdicombe 1974), a pumpa „turnover rate"-je 5340/min. (2. táblázat). Nyugalmi körülmények között a pumpa „turnover rate"-je 1320/min (Brading és Widdicombe 1974). Ileumon acetilkolinnal kiváltott depolarizáció után a pumpa maximális turnover rate-je 15 660 (Bolton 1973), mely jó összefüggésben áll Baker és Willis (1972) által más szöveteken megadott maximális pumpa turnover rate-tel (3500—15 000: 2. táblázat).

A Na-pumpa által létrehozott áramerősség

Ha a Na-pumpa stoichiometriája 3 : 2 : 1, úgy a Na^+-vesztés 1/3-a nincs kapcsolatban K^+ belépéssel. Nyugalmi körülmények között a teljes pumpált Na^+ mennyisége 2,79 p-mol · cm^{-2} · sec^{-1} (Brading és Widdicombe 1974), így 0,93 · 10^{-7} A · cm^{-2} a pumpa által létrehozott áramerősség (3. táblázat). Mivel a membrán ellenállás 50—80 kΩcm^{-2} (Tomita 1970), a Na-pumpa 2,7—5,4 mV-os feszültséggel működik közre a membrán potenciál fenntartásában.

3. táblázat

A Na-pumpa által létrehozott áramerősség. (1 cm^2 membrán felületen 0,1 μA-ben kifejezve)

Preparátum	$\times 10^{-7}$ A. $(cm)^{-2}$	Irodalmi adatok
Tintahal axon (max.)	50,00	Hodgkin és Keynes 1955
Nyúl vágusz rost		
•(PTHP, max.)	4,00	Landowne és Ritchie 1970
(K^+-visszaadás)	0,97	Vizi és Török, nem közölt adat
Tengeri malac taenia coli simaizom		
(nyugalmi)	8,00	Casteels 1969
(nyugalmi, Cl^- hiány)	1,20	Droogmans és Casteels 1976
(K^+-visszaadás, max.)	7,40	
(nyugalmi)	••0,93	Brading és Widdicombe 1974
(K^+-visszaadás)	••1,36	Török és Vizi 1980
	•••0,41	
Tengeri malac ileum (max.)	10,00	Bolton 1973

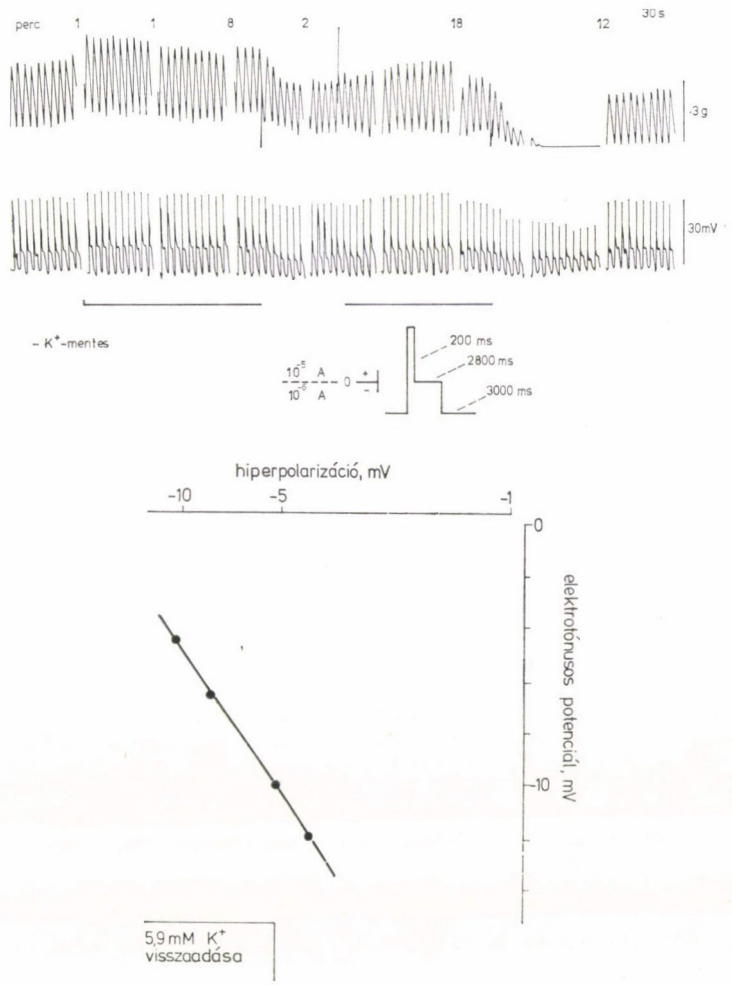
• tetanusz utáni hiperpolarizáció során
•• sejt térfogat/felszín arány: 1,5 μm (Freeman—Narrod és Goodford (1962)
••• sejt térfogat/felszín arány: 0,39 μm (Gabella 1976)

Tintahal axonon a maximális „pump current" 5 $\mu A \cdot cm^{-2}$ (HODGKIN és KEYNES 1955). Mivel simaizmon az akciós potenciál létrehozásában az extracelluláris Ca^{2+} döntő szerepet játszik (BRADING és TOMITA 1968, BÜLBRING és TOMITA 1969, BRADING, BÜLBRING és TOMITA 1969, NONOMURA és mtsai 1966) és az 1 μm^2 membrán felületre eső pumpahelyek száma alacsonyabb, mint ideg vagy harántcsíkolt izom preparátumokon (4. táblázat), érthető, hogy a pumpa simaizomon ilyen kis mértékű szerepet játszik a membrán potenciál fenntartásában nyugalmi körülmények között. Ha figyelembe vesszük, hogy minden egyes simaizom sejtmembrán felülete kb. 168 000 caveolát tartalmaz (GABELLA 1976) a sejt felszín/térfogat aránya 0,39 csupán, mely a membrán ellenállást 13—21 $k\Omega cm^{-2}$-re csökkenti (BRADING közlés alatt). Így a pumpa még kisebb mértékben működik közre a membrán potenciál fenntartásában. Na^+ terhelést követően (K^+-mentes kezelés) a külső közegbe visszaadott K^+ elektrogén hiperpolarizációt hoz létre (2., 3a. ábra), melynek nagysága a kezdeti Na^+ terhelés függvénye (3. ábra). A hiperpolarizáció mértéke és a membrán vezetőképessége között összefüggést találtunk (3b. ábra).

4. táblázat

A μm^2 membrán felületre eső Na-pumpa helyek száma (a meghatározások alapját ^3H-ouabain és -TTX kötődések képezik)

Preparátum	Na-pumpa helyek száma $(\mu m^2)^{-1}$	Irodalmi adatok
Óriás axon	270	HODGKIN és HUXLEY 1952
	10^3—10^4	BAKER és WILLIS 1972
	550	LEVINSON és MEVES 1975
	100	MULLINS 1975
Nyúl vágusz rost	550	LANDOWNE és RITCHIE 1969
	750	LANDOWNE és RITCHIE 1970
	110	RITCHIE és mtsai 1976
Rák ideg	49	KEYNES és mtsai 1971
Homár óriás axon	1200	NARAHASHI és mtsai 1964
Homár ideg	36	KEYNES és mtsai 1971
	90	RITCHIE és mtsai 1976
Béka harántcsíkolt izom	380	ALMERS és LEWINSON 1975
	1600	ERLIJ és GRINSTEIN 1976
Tengeri malac taenia coli simaizom	250—300	BRADING és WIDDICOMBE 1974
Emberi vörösvérsejt	1	ELLORY és KEYNES 1969
	1	DUNHAM és HOFFMAN 1971
	>1	BAKER és WILLIS 1972
Különböző szövetek	500—1500	BAKER és WILLIS 1972



3. ábra. **Tengeri-malac taenia coli simaizom. „Double sucrose-gap" módszer. *a)* K^+-mentes közeg hatása az izom elektromos és mechanikus aktivitására. 10^{-5}A (200 msec időtartamú) kifelé irányuló áram „spike"-t: 10^{-6}A (3000 msec időtartamú) befelé irányuló áram elektrotónusos potenciált hoz létre. K^+-mentes közeg depolarizációt, kontrakciót és átmeneti membrán ellenállás növekedést okoz. 5,9 mM K^+-visszaadására hiperpolarizáció, relaxáció és membrán vezetőképesség növekedés jön létre, melynek intenzitása a kezdeti Na^+-terhelés függvénye. *b)* Összefüggés az elektrogén hiperpolarizáció (abszcissza, logaritmikus lépték) és a membrán ellenállás (ordináta, lineáris lépték) között különböző ideig tartó Na^+-terhelés (K^+-mentes közeg) után visszaadott 5,9 mM K^+ hatására**

Figyelembe véve, hogy a sejt felszín/térfogat aránya 1,5 μm (FREEMAN—NARROD és GOODFORD 1962), 4,08 p-mol · cm^{-2} · sec^{-1} a pumpa által transzportált Na^+ mennyisége és az általa létrehozott áramerősség 1,36 · 10^{-7} A · cm^{-2}. Így a számított membrán potenciál változás 7—11 mV. Ha azonban GABELLA (1976) eredményét vesszük figyelembe az áramerősség 0,41 · 10^{-7} A · cm^{-2} és a membrán potenciál változás 0,5—0,9 mV mindössze. Meg kell

azonban jegyezni, hogy K^+-visszaadására a membrán vezetőképessége nő (lásd 3a ábrát), tehát az E_m változás számított értékei valószínűleg még alacsonyabbak. A mért hiperpolarizáció 8 mV-tal meghaladja a számított E_K-t. Elsőrendű kinetikával (KAO és NISHIYAMA 1969) számított Na vesztés „rate konstansa" 50-szer nagyobb, mint a Na^+ felhalmozódásé K^+-mentes közegben (TÖRÖK és VIZI 1979).

Összefoglalva tehát az elektrogén Na-pumpa gátlása során mért depolarizáció (5—7 mV) közel egyezik a számított értékkel, viszont a pumpa izgatása során jelentkező hiperpolarizáció messze túlhaladja a számított E_m változást. Ouabainról — mely a hiperpolarizációt teljesen meggátolta — tudjuk, hogy: a membrán külső oldalán hat (CALDWELL és KEYNES 1959, BRINLEY és MULLINS 1968), az extracelluláris Na^+ elősegíti a membránhoz való kötődését (BAKER és MANIL 1968, BAKER és WILLIS 1972), a $(K)_k$ viszont gátolja azt (BAKER és CONNELLY 1966, BAKER és WILLIS 1969, 1970). Úgy tűnik tehát, hogy a membrán külső oldalára lokalizálódó, ouabainnal gátolható és K^+-mal aktiválható pumpahely (membrán ATPáz) felelős teljes mértékben az ilyen körülmények között mért E_m változásért.

Az elektrogén Na-pumpa és a szövet kalcium koncentráció közötti összefüggés

Az intracelluláris ionizált kalcium koncentráció nagyságrendekkel alacsonyabb mint az extracelluláris (CALDWELL 1969, ASHLEY 1971, CASTEELS és mtsai 1973). Óriás axonon a Ca-efflux Na-függő (BAKER és mtsai 1969). Az óriás axonhoz hasonlóan számos szöveten (KALIX 1971, BIRKS és COHEN 1968, REUTER és SEITZ 1968, BLAUSTEIN és ECTOR 1976, GLITSCH és mtsai 1970, BAKER 1972, REUTER és mtsai 1973, BLAUSTEIN 1977, KATASE és TOMITA 1972, BRADING 1973, 1978, BRADING és WIDDICOMBE 1976, STAHL és SWANSON 1972, BAKER és MCNAUGHTON 1976, BLAUSTEIN és HODGKIN 1969, DIPOLO és BEAUGÉ 1979) a Na-elektrokémiai grádiense felelős a Ca^{2+} sejtből való kiűzéséért (1. ábra). ATP szükséges a Na/Ca cseréhez (BAKER és MCNAUGHTON 1976, DIPOLO és BEAUGÉ 1979), melynek oka ma még ismeretlen. A Na^+ elektrokémiai grádiensének létrehozásáért azonban a Na-pumpa felelős (BAKER 1972).

Ha K^+-megvonással gátoljuk a pumpát, az intracelluláris Na^+ felhalmozódással párhuzamosan csökken a Na-grádiens. A szövet Na^+ tartalma $9{,}5 \pm 0{,}8$ m-mol $\cdot$ kg^{-1} friss súly (f. s.)-ról $62{,}1 \pm 3{,}8$ m-mol $\cdot$ kg^{-1} f. s.-ra nő, a K^+ $53{,}8 \pm 2{,}5$ m-mol $\cdot$ kg^{-1} f. s.-ról $0{,}7 \pm 0{,}1$ m-mol $\cdot$ kg^{-1} f. s.-ra csökken az ötörás Na-terhelés során. A szövet Ca-tartalma azonban nem változik (5. táblázat). Ennek valószínű oka az, hogy a SCHATZMANN (1966) által elsőként proponált plazma membrán ATP-függő Ca^{2+}-pumpa kapacitása (1. ábra) kompenzálni képes a Na^+ grádiens lecsökkenéséből származó fokozott Ca^{2+} belépést. Ideg preparátumok Ca^{2+}-tartalma sem változik szig-

5. táblázat

Tengeri malac taenia coli • La^{3+}-módszerrel mért iontartalmai

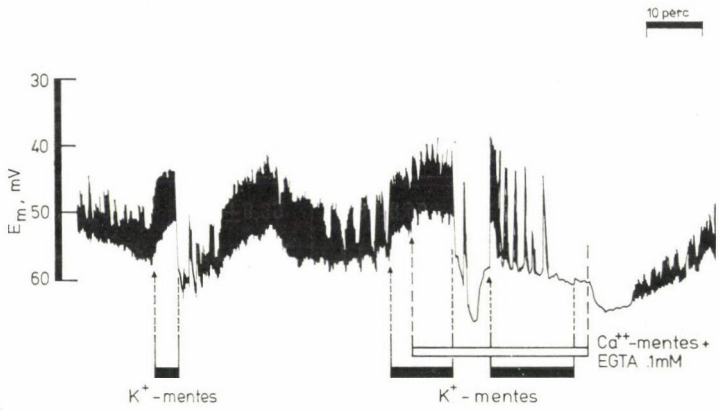
	friss/nedves szövet súly %	m-mole.kg^{-1} friss súly		
		K^+	Na^+	Ca^{++}
Kontroll	76,8±0,9	53,8±2,5	9,5±0,8	2,0±0,2
K-mentes (5 óra)	88,7±1,1	0,7±0,1	62,1±3,8	2,0±0,2
5,9 mM K-visszaadása (10 perc)	80,6±2,5	10,7±0,3	51,9±2,0	2,5±0,2
23,6 mM K-visszaadása (10 perc)	80,9±1,1	25,0±0,7	45,9±1,4	2,9±0,2
47,2 mM K-visszaadása (10 perc)	81,4±2,0	31,1±0,9	39,9±1,4	3,5±0,3

• az extracelluláris- és membrán-kötött ionok kimosásához 10 percen át 10 mM $LaCl_3$ tartalmú izotóniás szukróz oldatban tartottuk a preparátumokat 0 °C-on. (n=8)

A szövet iontartalmait Pye-Unicam atomabszorpciós spektrofotométerrel mértük.

nifikánsan a Na^+ terhelés során (Baker és Blaustein 1968, Vizi 1977). Ha azonban Na^+ terhelt preparátumon a nátrium grádienst megfordítjuk („reversed Na^+-gradient") azáltal, hogy az extracelluláris Na koncentrációt lecsökkentjük (Li^+, kolin stb. helyettesítés), nemcsak fokozott Ca^{2+}-belépést, hanem egy tiszta kalcium felhalmozódást kapunk az intracelluláris térben (Baker és Blaustein 1968, Brading 1978). Ugyancsak szignifikánsan nő a szövet Ca^{2+}-tartalma Na^+-terhelést (K^+-mentes közeg) követően, ha különböző (K_k) koncentrációkat adunk vissza a külső közegbe (5. táblázat). Ilyen körülmények között a külső K^+ emelésére az elektrogén hiperpolarizáció növekedik (Taylor és mtsai 1971), fokozódik a Na^+-vesztés és a K^+-felhalmozódás és a belépő Ca^{2+} mennyisége (l. 5. táblázat). A hiperpolarizáció eredményeként az izom elernyed, annak ellenére, hogy az intracelluláris Ca^{2+} — (valószínűleg szabad) — koncentráció emelkedik. Külső K^+ (23,6 : 47,2 mM) visszaadása esetén a Nernst összefüggés értelmében depolarizációt kellene kapnunk, vagyis az egyenlet ilyen körülmények között nem érvényes. A K^+- visszaadása pillanatában a sejtünk mindössze annyiban különbözik egy intakt sejttől, hogy az $(K^+)_b$ Na^+-ra cserélődött ki, valamint az E_m —5; —10 mV-ra csökkent.

Ouabain különbözőképpen befolyásolja a fenti változásokat: 1. hiperpolarizáció és relaxáció nem jön létre, 2. részben gátolja a Na^+-vesztést és K^+-felhalmozódást, 3. egyáltalán nem befolyásolja a Ca^{2+}-felhalmozódást. Az intracelluláris K^+koncentráció követi a Nernst egyenlet alapján számított passzív K^+ megoszlást. A ouabain-független (passzív) Na^+-vesztés extracelluláris Ca^{2+} függő (Baker és mtsai 1969, Dietmer és Ellis 1978). Extracelluláris Ca^{2+} szükséges az elektrogén hiperpolarizáció létrejöttéhez is (4. ábra). Na^+-terhelést követően a visszaadott K^+ bár repolarizálja a membránt,



4. ábra. Tengeri-malac taenia coli simaizom. „Single sucrose-gap" módszer. 5,9 mM K^+-megvonásának és -visszaadásának hatásai a membrán potenciálra (E_m, mV) és spontán tüske aktivitásra kalcium (2,5 mM) jelenlétében és hiányában (+ 0,1 mM EGTA). K^+-megvonásra 2,5 mM Ca^{2+} jelenlétében gyors depolarizáció és a tüske tevékenység frekvenciájának fokozódása jön létre. K^+-visszaadásra hiperpolarizáció és részleges tüske aktivitás gátlás jelentkezik. Ca^{2+}-hiányban (0,1 mM EGTA jelenlétében): az elektrogén hiperpolarizáció K^+-visszaadásra (a Ca^{2+} hiány időtartamától függően) csökken. Ca^{2+} visszaadására a E_m átmenetileg nő

azonban utóhiperpolarizáció nem jön létre, ha az extracelluláris kalciumot megvonjuk (0,1 mM EGTA jelenlétében). Más posztszinaptikus membránokon (cervikális ganglionon és gyomor preparátumon) az elektrogén hiperpolarizáció ugyancsak Ca^{2+}-függőnek bizonyult (Brown és mtsai 1972, Ohba és mtsai 1975). A jelenség igazi okát ma még nem ismerjük. Elgondolkoztató, hogy míg az élő sejt izgalmi jelenségeihez (depolarizáció, kontrakció, transzmitter anyagok szekréciója stb.) Ca^{2+} szükséges, addig ugyancsak extracelluláris Ca^{2+}-belépése szükséges a gátló jelenségei (hiperpolarizáció, relaxáció, transzmitter felszabadulás, gátlás) létrejöttéhez is.

A Na-pumpa és a posztszinaptikus nikotin- és muszkarinszerű receptor izgatása közötti kölcsönhatás

Cervicalis ganglionon elsőként Pascoe (1956), Brown (1966), Kosterlitz és mtsai (1968) vetették fel, hogy az elektrogén Na-pumpa szerepet játszhat a posztszinaptikus receptor ACh-nal és karbamilkolin-nal való izgatásánál. Az általuk létrehozott depolarizációt ugyanis egy viszonylag hosszan tartó ún. „utóhiperpolarizáció" követte a kimosás után. K^+-mentes közeg az utóhiperpolarizációt csökkentette (Kosterlitz és mtsai 1968). A hiperpolarizáció az elektrogén Na-pumpa működésének a következménye, melyről ismeretes, hogy működéséhez a $(K^+)_k$ elengedhetetlenül szükséges. Szimpatikus ganglionon az ún. lassú gátló posztszinaptikus potenciál (i. p. s. p.) ugyancsak az elektrogén pumpa aktivációjának a következménye (Nishi és Koketsu 1968). A hiperpolarizáció az esetben is létrejön, ha a membrán

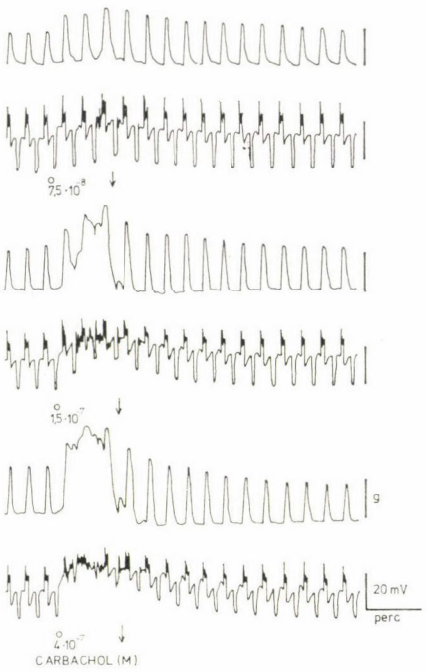
potenciál (E_m) eléri a E_K-t (KOSTERLITZ és mtsai 1970, LEES és WALLIS 1974). Az utóhiperpolarizáció hőmérséklet függő (PASCOE 1956, BROWN és mtsai 1972, BROWN és SCHOLFIELD 1974), ouabainnal gátolható (LEES és WALLIS 1974, BROWN és mtsai 1969, 1972, BROWN és SCHOLFIELD 1974), valamint külső Na^+ $(Na^+)_k$ függő (KOSTERLITZ és mtsai 1970, LEES és WALLIS 1974). Az utóhiperpolarizáció és az azt megelőző depolarizáció nagysága egyenes arányban áll (BROWN és mtsai 1972). K^+-mentes oldatban a depolarizáció ACh hatására létrejön, a hiperpolarizáció azonban csak akkor fejlődött ki, ha a K^+-t visszaadták a külső közegbe (KOSTERLITZ és mtsai 1970). A E_m növekedése anyagcsere és ionális függőségét tekintve a mielinmentes idegroston RITCHIE és STRAUB (1957) valamint RANG és RITCHIE (1968) által leírt tetanusz utáni hiperpolarizációhoz (PTHP) nagyon közel áll. Az utóhiperpolarizáció amplitúdója külső K^+ (12,5 mM) visszaadása esetén növekszik (LEES és WALLIS 1974), továbbá ha a Cl^--t nem penetráló anionnal (isetionat, benzenszulfonat) helyettesítették (BROWN és mtsai., 1969), mely a depolarizációt nem befolyásolta, a membrán ellenállást viszont növelte.

Az extracelluláris K^+ Cs^+-mal való helyettesítése esetén az utóhiperpolarizáció csökken (BROWN és mtsai 1969). A Cs^+-ról ismeretes hogy mintegy $10\times$ gyengébb a Na-pumpát izgató hatása mint a K^+-é (BAKER és CONNELLY 1966, RANG és RITCHIE 1968).

BROWN és SCHOLFIELD (1974) szolgáltattak direkt bizonyítékot arra, hogy a nikotinszerű receptor izgatása után valóban a Na-pumpa felelős az utóhiperpolarizációért. Karbamilkolin 47,8 m-mol-lal növelte az intracelluláris Na^+ koncentrációt. Ismeretes, hogy a $(Na^+)_i$ emelkedése a Na-pumpát izgatja (BRINLEY és MULLINS 1968).

KERKUT és mtsai (1969) Aplysia neuron posztszinaptikus membránján kimutatták, hogy az ACh hiperpolarizációt okoz, melynek oka feltehetően a Na^+ belépés fokozódásán keresztül az elektrogén Na-pumpa izgatása lehet. A hiperpolarizációt a K^+-megvonása, a Na^+ Li^+-mal való helyettesítése és ouabain alkalmazása gátolta. Ileum és taenia coecum, posztszinaptikus muszkarinszerű receptor izgatása ACh-nal szintén depolarizációt okoz (BOLTON 1971, BURNSTOCK 1958, BÜLBRING és BURNSTOCK 1960, BÜLBRING és KURIYAMA 1963). Kimosás után hiperpolarizáció jön létre, mely következménye lehet az intracelluláris Na^+ megemelkedésének (BOLTON 1971). Ileumon az utóhiperpolarizáció ACh kimosását követően 6,5 mV, melyet $1{,}25\times10^{-6}$ g/ml ouabain felfüggeszt (BOLTON 1971). K^+-mentes és Na^+-hiányos oldatban az ACh utáni repolarizáció késik.

Taenia coli posztszinaptikus muszkarinszerű receptorainak izgatása karbamilkolinnal depolarizációt és kontrakciót hoz létre (5. ábra). Az elektrotónusos potenciál változása koncentráció függőnek bizonyult. Ha küszöbkoncentrációban $(7{,}5\times10^{-8}$ M) alkalmaztuk a vegyületet, a membrán ellen-



5. ábra. Tengeri-malac taenia coli simaizom. „Double sucrose-gap" technika. Váltakozó polaritású (időtartam: 5 sec) depolarizáló (5×10^{-6}A), ill. hiperpolarizáló (9×10^{-7}A) áram által kiváltott tüske aktivitás, ill. elektrotónusos potenciál. Karbakol hatásai a membrán potenciálra, tüske tevékenységre, membrán vezetőképességre és mechanikus aktivitásra. $7{,}5 \times 10^{-8}$M karbakol hatására a membrán ellenállás nő, emelve a koncentrációt csökken. A depolarizáció és kontrakció koncentráció függő

állás nőtt, emelve a koncentrációt csökkent. 5×10^{-5} M koncentrációban alkalmazva a vegyületet elektrotónusos potenciál gyakorlatilag nem mérhető. Gátolva a pumpát (K^+-mentes közeg, ill. ouabain alkalmazása) a depolarizáció és kontrakció a pumpa gátlás erősségétől függően csökkent, mely az intracelluláris Na^+, K^+ koncentrációk megváltozásának lehet a következménye (6. táblázat). Simaizomon a szarkoplazmatikus retikulum (SR) a sejttérfogat 2%-át teszi ki (Devine, Somlyo és Somlyo 1973). A SR Na^+-gradiense a Na-pumpa gátlása során csökken, így a Ca^{2+}-t felhalmozó képessége zavart szenved (Brading személyes közlés). Mivel a SR membránja rendkívül közel van a plazma membránhoz (Gabella 1971, 1973), az ún. membrán junkciók mentén elhelyezkedő muszkarinszerű receptorok depolarizációja nem képes Ca^{2+}-t felszabadítani a SR-ból (Brading 1976).

Az elektrogén Na-pumpa fokozott működése (K^+-visszaadása során) felfüggesztette a posztszinaptikus muszkarinszerű receptor depolarizációjával kiváltott kontrakciót (6. ábra).

Felmerül a kérdés, hogy milyen mérvű intracelluláris Na^+ felhalmozódás szükséges a gátló hatás létrejöttéhez. 1 órás Na^+ terhelés során a szövet

6. táblázat

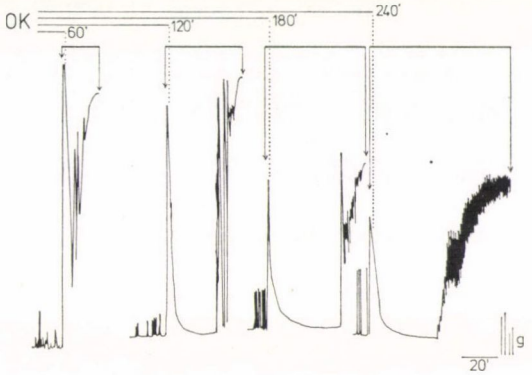
Tengeri-malac taenia coli • La^{3+}-módszerrel mért iontartalmai a $(K^+)_k$ megvonása után különböző időtartamokban, továbbá a $(K^+)_k$ visszaadása után karbamilkolin és ouabain hiányában és jelenlétében (1^h)

	friss/nedves szövetsúly (%)	m-mol.kg^{-1} friss súly	
		K^+	Na^+
Kontroll	89,1±1,3	55,0±1,7	10,8±0,7
K-mentes (1^h)	86,2±0,9	37,5±1,5	23,4±0,8
K-mentes (2^h)	81,3±2,3	19,3±0,6	41,5±2,1
K-mentes (3^h)	82,8±2,1	5,0±0,7	54,8±2,0
K-mentes (5^h)	88,7±1,1	0,7±0,1	62,1±3,8
5,9 mM K-visszaadása (1 óra)	81,5±1,9 ••91,3±1,4	57,2±1,7 4,7±0,3	15,3±0,4 67,5±2,5
5,9 mM K-visszaadása + karbamilkolin (5×10^{-5} M) (1 óra)	84,8±1,7 ••92,8±0,6	46,9±1,8 5,7±0,2	20,9±1,0 60,6±2,0

• az extracelluláris- és membrán-kötött ionok kimosására 10 percen át 10 mM $LaCl_3$ tartalmú izotóniás szukróz oldatban tartottuk a preparátumokat 0 °C-on ($n = 8$).
•• 10^{-5} M ouabain jelenlétében.

A szövet iontartalmait Pye-Unicam atomabszorpciós spekrofotométerrel mértük.

Na^+-tartalma több mint 2×-re nő (6. táblázat), mely azonban még nem elegendő 5×10^{-5} M karbamilkolin hatásának felfüggesztésére (6. ábra). Ha a Na terhelést fokozzuk (2, 3, 4 óra) a visszaadott K^+ meggátolja a már kifej-



6. ábra. 5×10^{-5}M karbakol (↓——↓) hatása taenia coli simaizom izometriás körülmények között mért mechanikus aktivitására különböző ideig tartó (60' : 120' : 180' : 240') Na^+-terhelés (OK) során. A kontrakció amplitúdója a Na^+-terheléssel párhuzamosan csökken. Karbakol jelenlétében visszaadott 5,9 mM K^+ 120' : 180' : 240'-es Na^+-terhelés után relaxációt hozott létre. A relaxáció időtartama egyenes arányban áll a kezdeti Na^+-terhelés idejével. Megj.: A K^+-t 3 perccel a karbakol alkalmazása után adtuk vissza

lődött kontrakciót, melynek időtartama és a kezdeti Na-felhalmozódás mértéke egyenes arányban áll.

Az elektrogén Na^+-transzport és a katekolaminok közötti kölcsönhatás

Számos szöveten a katekolaminok fokozzák a jelzett Na^+-efflux-ot, mely ouabainnal gátolható (7. táblázat). Soleus izomroston CLAUSEN és FLATMAN (1975, 1977) kimutatták, hogy a katekolaminok hatására a Na^+-kiáramlás fokozódásán túlmenően a Na^+-belépés (influx) is csökken, melyek gátolhatók hűtéssel, ouabain alkalmazásával és β_2-receptor antagonistákkal.

Simaizomon adrenalin és noradrenalin (NA) hatására létrejövő hiperpolarizáció és membrán ellenállás csökkenés α-receptoron keresztül valósul

7. táblázat

Katekolaminok hatásai a membrán potenciálra, ion-transzport folyamatokra különböző szöveteken

Preparátum	Katekolaminok	Irodalmi adatok
Nyúl vágusz rost	ouabain érzékeny Na^+-vesztés	VIZI és TÖRÖK (nem közölt adat)
Patkány rekeszizom	^{24}Na-efflux növekedés	EVANS és SMITH 1973
Béka sartorius izom	ouabain érzékeny ^{24}-Na-efflux növekedés	HAYS és mtsai 1974
Harántcsíkolt izom	Na—K transzport változás membrán potenciál változások	BOWMAN és NOTT 1969 DANIEL és mtsai 1969
Lassú izomrostok	ouabain érzékeny hiperpolarizáció	SOMLYO és SOMLYO 1969
Tengeri malac soleus és és extensor izom	hiperpolarizáció β_2-receptor	TASHIRO 1973
Patkány soleus izom	hiperpolarizáció, Na-vesztés ouabain és hőmérséklet érz. hiperpol., β_2-receptor, membr. ellenállás nő, ^{22}Na-efflux nő ^{22}Na-influx csökken ^{42}K-influx nő ^{42}K-efflux csökken	DOCKRY és mtsai 1966 CLAUSEN és FLATMAN 1975 WANG és CLAUSEN 1976 CLAUSEN és FLATMAN 1977
Nyúl és béka pitvar izom	^{24}Na-efflux nő	HAAS és TRAUTWEIN 1963
Tengeri malac taenia coli simaizom	^{42}K-influx nő Na-pumpa fokozódás hiperpolarizáció ouabain érzéketlen hiperpolarizáció, Ca-függő, α-receptor K vez. kép. nő ouabain érzékeny hiperpolarizáció, és Na-vesztés Ca-függő, α-receptor	BORN és BÜLBRING 1956 BURNSTOCK 1958 BÜLBRING és TOMITA 1969b, 1977b TÖRÖK és mtsai 1977

meg és extracelluláris Ca^{2+}-függő (BÜLBRING és TOMITA 1969b, 1977b), éppúgy mint az ACh felszabadulást gátló hatásuk (VIZI 1968, PATON és VIZI 1969, VIZI 1972).

GODFRAIND és mtsai (1974) kimutatták, hogy a NA fokozza a Na + K-aktiválta ATPázt, mely hatáshoz Ca^{2+} jelenlétére van szükség. A NA membrán ATPázt izgató hatását más szerzők is igazolták (SCHAEFER és mtsai 1972, YOSHIMURA 1973, LOGAN és O'DONOVAN 1975, GILBERT és mtsai 1975, VERA ÁDÁM—VIZI és mtsai 1979).

Kísérleteinkben az adrenalin csökkentette a $(Na^+)_b$-t, mely ouabainnal gátolható volt (TÖRÖK és mtsai 1977, TÖRÖK és VIZI közlés alatt). Az adrenalin alkalmazását követően az intracelluláris Na^+ koncentráció csökkenése az első 10 percben jóval intenzívebb volt ($0{,}21 \cdot min^{-1}$), mint az azt követő 50 perc során ($0{,}05 \cdot min^{-1}$), melynek oka valószínűleg az, hogy a kezdeti gyors intracelluláris Na^+ koncentráció csökkenés miatt a Na^+-pumpa részleges gátlás alá kerül.

IRODALOM

1. ÁDÁM—VIZI, VERA, VIZI, E. S. and HORVÁTH, I.: Stimulation by noradrenaline of Na^+K^+-ATPase in different fractions of rat brain cortex. J. Neural Transm. **46,** 59—69 (1979).
2. ADRIAN, R. H. and SLAYMAN, C. L.: Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle. J. Physiol. (Lond.) **184,** 970—1014 (1966).
3. ALMERS, W. and LEVINSON, S. R.: Tetrodotoxin binding to normal and depolarized frog muscle and the conductance of a single sodium channel. J. Physiol. (Lond.) **247,** 483—509 (1975).
4. BAKER, P. F.: The sodium pump. Endeavouor, **25,** 166—172 (1966).
5. BAKER, P. F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. Prog. Biophys. Mol. Biol. **24,** 177—223 (1972).
6. BAKER, P. F. and BLAUSTEIN, M. P.: Sodium dependent uptake of calcium by crab nerve. Biochem. Biophys. Acta **150,** 167—170 (1978).
7. BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P., HODGKIN, A. L. and STEINHARDT, R. A.: The effect of sodium concentration on calcium movements in giant axon of Loligo forbesi. J. Physiol. (Lond.) **192,** 43—44P (1967).
8. BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P., HODGKIN, A. L. and STEINHARDT, R. A.: The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. J. Physiol. (Lond.) **200,** 431—458 (1969a).
9. BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P., KEYNES, R. D., MANIL, J., SHAW, T. I. and STEINHARDT, R. A.: The ouabain sensitive fluxes of sodium and potassium in squid giant axon. J. Physiol. (Lond.) **200,** 459—496 (1969b).
10. BAKER, P. F. and CONNELLY, C. M.: Some properties of the external activation site of the sodium pump in crab nerve. J. Physiol. (Lond.) **185,** 270—297 (1966).
11. BAKER, P. F. and CRAWFORD, A. C.: A rate on the mechanism by which inhibitors of the sodium pump accelerate spontaneous release of transmitter from motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) **247,** 209—226 (1975).
12. BAKER, P. F. and MANIL, J.: The rate of action of K^+ and ouabain on the sodium pump in squid axons. Biochem. Biophys. Acta **150,** 328—330 (1968).
13. BAKER, P. F. and MCNAUGHTON, P. A.: Kinetics and energetics of calcium efflux from intact squid giant axons. J. Physiol. (Lond.) **259,** 103—144 (1976).
14. BAKER, P. F. and SHAW, T. I.: A comparison of the phosphorus metabolism of intact squid nerve with that of the isolated axoplasm and sheath. J. Physiol. (Lond.) **180,** 424—438 (1965).
15. BAKER, P. F. and WILLIS, J. S.: On the number of pumping sites in cell membranes. Biochem. Biophys. Acta **183,** 646—649 (1969).
16. BAKER, P. F. and WILLIS, J. S.: Binding of cardiac glycoside ouabain to intact cells. J. Physiol. (Lond.) **224,** 441—462 (1972a).

17. BAKER, P. F. and WILLIS, J. S.: Inhibition of the sodium pump in squid giant axons by cardiac glycosides: dependance on extracellular ions and metabolism. J. Physiol. (Lond.) **224,** 463—475 (1972b).
18. BIRKS, R. J. and COHEN, M. W.: The action of sodium pump inhibitors on neuromuscular transmission. Proc. Roy. Soc. B. **170,** 381—399 (1968).
19. BLAUSTEIN, M. P.: Sodium ions, calcium ions, blood preasure regulation and hypertension: a reassesment and a hypothesis. Am. J. Physiol. **232,** 165—173 (1977).
20. BLAUSTEIN, M. P. and HODGKIN, A. L.: The effect of cianide on the efflux of calcium from squid axons. J. Physiol. (Lond.) **200,** 497—527 (1969).
21. BOLTON, T. B.: Electrophysiological evidence of an electrogenic sodium pump in the longitudinal muscle of guinea-pig ileum and its involvement in the response to acetylcholine. J. Physiol. (Lond.) **218,** 58—59P (1971).
22. BOLTON, T. B.: Effect of electrogenic sodium pumping on the membrane potential of longitudinal muscle from terminal ileum of guinea-pig. J. Physiol. (Lond.) **228,** 693—712 (1973).
23. BORN, G. V. R. and BÜLBRING, E.: The movement of potassium between smooth muscle and the surrounding fluid. J. Physiol. (Lond.) **131,** 690—703 (1956).
24. BOWMAN, W. C. and NOTT, M. W.: Actions of sympathomimetic amines and their antagonists on skeletal muscle. Pharmacol. Rev. **21,** 27—72 (1969).
25. BRADING, A. F.: Ion distribution and ion movements in smooth muscle. Phil. Trans. Roy. Soc. B. **265,** 35—46 (1973).
26. BRADING, A. F.: Calcium induce increase in membrane permeability in the guinea-pig taenia coli: evidence for involvement of a sodium-calcium exchange mechanism. J. Physiol. (Lond.) **275,** 65—84 (1978).
27. BRADING, A. F.: Electrophysiology of smooth muscle. Britsh Medical Bulletin, in press. (1980).
28. BRADING, A. F., BÜLBRING, E. and TOMITA, T.: The effect of sodium and calcium on the action potential of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. J. Physiol. (Lond.) **200,** 637—654 (1969).
29. BRADING, A. F. and TOMITA, T.: The action potential of the guinea-pig taenia coli in low sodium solution. J. Physiol. (Lond.) **197,** 30—31P (1968).
30. BRADING, A. F. and WIDDICOMBE, J. H.: An estimate of the sodium/potassium pump activity and the numbers of pump sites in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli, using ^{3}(H)-ouabain. J. Physiol. (Lond.) **238,** 235—249 (1974)
31. BRADING, A. F. and WIDDICOMBE, J. H.: Interaction between sodium and calcium movements in smooth muscle. Smooth Muscle Pharmacology and Physiology, Inserm. Vol. **50,** 235—246 (1975).
32. BRINLEY, F. J. and MULLINS, L. J.: Sodium fluxes in internally dialysed squid axons. J. gen. Physiol. **52,** 181—211 (1968).
33. BRINLEY, F. J., Jr., and MULLINS, L. J.: Effects of membrane potential on sodium and potassium fluxes in squid axons. Ann. N. Y. Acad. Sci. **242,** 406 (1974).
34. BROWN, D. A.: Effects of hexamethonium and hyoscine on the drug-induced depolarization of isolated superior cervical ganglia. Br. J. Pharmac. **26,** 521—537 (1966).
35. BROWN, D. A., BROWNSTEIN, M. J. and SCHOLFIELD, C. N.: On the nature of the drug induced after-hyperpolarization in isolated rat ganglia. Br. J. Pharmac. **37,** 511—513P (1969).
36. BROWN, D. A., BROWNSTEIN, M. J. and SCHOLFIELD, C. N.: Origine of the after-hyperpolarization that follows removal of depolarizing agents from the isolated superior cervical ganglia of the rat. Br. J. Pharmac. **44,** 651—671 (1972).
37. BROWN, D. A. and SCHOLFIELD: Changes of intracellular sodium and potassium ion concentrations in rat superior cervical ganglia induced by depolarizing agents. J. Physiol. (Lond.) **242,** 307—319 (1974).
38. BURNSTOCK, G.: The action of adrenaline on excitability and membrane potential in the taenia coli of the guinea-pig and the effect of DNP on this action and on the action of ACh. J. Physiol. (Lond.) **143,** 183—194 (1958).
39. BÜLBRING, E. and BURNSTOCK, G.: Membrane potential changes associated with tachyphylaxes and potentiation of the response to stimulatory drugs in smooth muscle. Br. J. Pharmac. Chemother. **15,** 611—624 (1960).
40. BÜLBRING, E.: Membrane potentials of smooth muscle fibres of the taenia coli of the guinea-pig. J. Physiol. (Lond.) **125,** 302—315 (1954).
41. BÜLBRING, E. and KURIYAMA, H.: Effects of changes in the external sodium and calcium concentrations on spontaneous electrical activity in smooth muscle of guinea-pig taenia coli. J. Physiol. (Lond.) **166,** 29—58 (1963).

42. BÜLBRING, E. and TOMITA, T.: Increase of membrane conductance by adrenaline in the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. Proc. Roy. Soc. B. **172,** 89—102 (1969a).
43. BÜLBRING, E. and TOMITA, T.: Effect of Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+} on the action of adrenaline in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. Proc. Roy. Soc. B. **172,** 121—136 (1969b).
44. BÜLBRING, E. and TOMITA, T.: The α-action of catecholamines on the guinea-pig taenia coli in K-free and Na-free solution and in the presence of ouabain. Proc. Roy. Soc. B. **197,** 255—269 (1977a).
45. BÜLBRING, E. and TOMITA, T.: Calcium requirement for the α-action of catecholamines on guinea-pig taenia coli. Proc. Roy. Soc. B. **197,** 271—284 (1977b).
46. CALDWELL, P. C.: Energy relationships and the active transport of ions. Curr. Top. Bioenerg. **3,** 251—278 (1969).
47. CALDWELL, P. C., HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D. and SHAW, T. I.: The effects of injecting "energy-rich" phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axon of loligo. J. Physiol. (Lond.) **152,** 561—590 (1960).
48. CALDWELL, P. C. and KEYNES, R. D.: The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon. J. Physiol. (Lond.) **148,** 8P (1959).
49. CARPENTER, D. O.: Membrane potential produced directly by the Na^+-pump in aplysia neurons. Comp. Biochem. Physiol. Vol. **35,** 371—385 (1970).
50. CASTEELS, R.: Calculation of the membrane potential in smooth muscle cells of the guinea-pig's taenia coli by the Goldman equation. J. Physiol. (Lond.) **205,** 193—208 (1969).
51. CASTEELS, R., DROOGMANS, G. and HENDRICKX, H.: Electrogenic sodium pump in smooth muscle of the guinea-pig's taenia coli. J. Physiol. (Lond.) **217,** 297—313 (1971).
52. CASTEELS, R., DROOGMANS, G. and HENDRICKX, H.: Active ion transport and resting potential in smooth muscle cells. Phil. Trans. R. Soc. B. **265,** 47—56 (1973).
53. CASTEELS, R. and WUYTACK, F.: Calcium pumping in the smooth muscle cells of the taenia coli. J. Physiol. (Lond.) **249,** 19—20P (1975).
54. CLAUSEN, T. and FLATMAN, J. A.: Catecholamines stimulate active electrogenic Na-K transport in rat skeletal muscle. Europ. Soc. Clin. Invest. 9th Ann. Meeting, Abstr. No. 193 (1975).
55. CLAUSEN, T. and FLATMAN, J. A.: The effect of catecholamines on Na-K transport and membrane potential in rat soleus muscle. J. Physiol. (Lond.) **270,** 383—414 (1977).
56. DANIEL, E. E., PATON, D. M., TAYLOR, G. S. and HODGSON, B. J.: Adrenergic receptors for catecholamine effects on tissue electrolytes. Fedn. Proc. **29,** 1410—1425 (1970).
57. DEVINE, C. E., SOMLYO, A. V. and SOMLYO, A. P.: Sarcoplasmic reticulum and mitochondria as cation accumulating sites in smooth muscle. Phil. Trans. Roy. Soc. B. **265,** 17—23 (1973).
58. DIETMER, J. W. and ELLIS, D.: The intracellular sodium activity and cardiac purkinje fibres during and reactivation of the Na-K pump. J. Physiol. (Lond.) **284,** 241—259 (1978).
59. DI POLO, R. and BEAUGÉ, L.: Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axon. Nature (Lond.) **278,** No 5701, 271—273 (1979).
60. DOCKRY, M., KERNAN, R. P. and TAUGNEY, A.: Active transport of sodium and potassium in mammalian skeletal muscle and its modification by nerve and by cholinergic and adrenergic agents. J. Physiol. (Lond.) **186,** 187—200 (1966).
61. DROOGMANS, G. and CASTEELS, R.: Membrane potential and ion transport in smooth muscle cells. in: Physiology of Smooth Muscle, ed. by Bülbring, E. és Shuba, M. F., Raven Press: New York (1976).
62. DUNHAM, P. B. and HOFFMAN, J. F.: Active cation transport and ouabain binding in high potassium and low potassium red blood cells of sheep. J. gen. Physiol. **58,** 94—116 (1971).
63. DYDYNSKA, M. and HARRIS, E. J.: Consumption of high-energy phosphates during active Na and K interchange in frog muscle. J. Physiol. (Lond.) **182,** 92—109 (1966).
64. ELLORY, J. C. and KEYNES, R. D.: Binding of tritiated digoxin to human red cell ghots. Nature (Lond.) **221,** 776 (1969).
65. ERLIJ, D. and GRINSTEIN, S.: The number of sodium ion pumping sites in skeletal muscle and its modification by insulin. J. Physiol. (Lond.) **259,** 13—31 (1976a).
66. ERLIJ, D. and GRINSTEIN, S.: Stimulation of the sodium pump by azide and high internal sodium: changes in the number of pumping sites and turnover rate. J. Physiol. (Lond.) **259,** 33—45 (1976b).
67. EVANS, R. H. and SMITH, J. W.: Mode of action of catecholamines on skeletal muscle. J. Physiol. (Lond.) **232,** 81—82P (1973).
68. FREEMAN—NARROD, M. and GOODFORD, P. J.: Sodium and potassium content of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli at different temperatures and tensions. J. Physiol. (Lond.) **163,** 399—410 (1962).

69. GABELLA, G.: Relationship between sarcoplasmic reticulum and caveloae intracellulares in the intestinal smooth muscle. J. Physiol. (Lond.) **216,** 42P (1971).
70. GABELLA, G.: Fine structure of smooth muscle. Phil. Trans. Roy. Soc. B. **265,** 7—16 (1973).
71. GÁRDOS, G. and STRAUB, F. B.: Über die rolle Adenosintriphosphorsaure (ATP) in der K-permeabilität der menschlichen roten Blutkörperchen. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **12,** 1—8 (1957).
72. GILBERT, I. C., WYLLIE, M. G. and DAVISON, D. V.: Nerve terminal ATPase as possible trigger for neurotransmitter release. Nature (Lond.) **255,** 237—238 (1975).
73. GARRAHAN, P. J. and GLYNN, I. M.: The stoichiometry of the sodium pump. J. Physiol. (Lond.) **192,** 217—235 (1967).
74. GLITSCH, M. G., REUTER, R. H. and SCHOLZ, H.: The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. J. Physiol. (Lond.) **209,** 25—43 (1970).
75. GODFRAIND, T., KOCH, M. C. and VERBEKE, N.: The action of EGTA on the catecholamines stimulation of rat brain Na-K ATPase. Biochem. Pharmacol. Vol. **23,** 3505—3511 (1974).
76. GORMAN, A. L. F. and MARMOR, M. F.: Long-term effect of ouabain and sodium pump inhibition on a neuronal membrane. J. Physiol. (Lond.) **242,** 49—60 (1974).
77. HAAS, H. G. and TRAUTWEIN, W.: Increase of sodium efflux increased by epinephrine in the heart of the frog. Nature (Lond.) **197,** 80—81 (1963).
78. DEN HERTOG, A. and RITCHIE, J. M.: A comparison of the effects of temperature, metabolic inhibitors and of ouabain on the electrogenic component of the sodium pump in mammalian nonmyelinated nerve fibres. J. Physiol. (Lond.) **204,** 523—538 (1969).
79. HODGKIN, A. L. and HUXLEY, A. F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. (Lond.) **117,** 500—544 (1952).
80. HODGKIN, A. L. and KEYNES, R. D.: Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. J. Physiol. (Lond.) **128,** 28—60 (1955).
81. HOFFMAN, J. F. and INGRAM, C. J.: Cation transport and the binding ^{3}(H)-ouabain to intact red cells. Proceedings of the First International Symposium on Metabolism and Permeability of Erythrocytes and Thrombocytes. Georg Thieme Verlag. Kg., Stuttgart 420 (1969).
82. KALIX, P.: Uptake and release of calcium in rabbit vagus nerve. Pflügers Arch. **326,** 1—14 (1971).
83. KAO, C. Y. and NISHIYAMA, A.: Ion concentrations and membrane potentials of myometrium during recovery from cold. Am. J. Physiol. **217,** (2), 525—531 (1969).
84. KATASE, T. and TOMITA, T.: Influences of sodium and calcium on the recovery process from potassium contracture in the guinea-pig taenia coli. J. Physiol. (Lond.) **224,** 489—500 (1972).
85. KERKUT, G. A., BROWN, L. C. and WALKER, R. J.: Post synaptic stimulation of the electrogenic Na-pump. Life Sci. Vol. **8,** Part. 1, 297—300 (1969).
86. KERKUT, G. A. and THOMAS, R. C.: An electrogenic Na-pump in snail nerve cells. Comp. Biochem. Physiol. Vol. **14,** 167—183 (1965).
87. KEYNES, R. D. and RITCHIE, J. M.: The movements of labelled ions in mammalian nonmyelinated nerve fibres. J. Physiol. (Lond.) **179,** 333—367 (1965).
88. KEYNES, R. D., RITCHIE, J. M. and ROJAS, E.: The binding of tetrodotoxin to nerve membrane. J. Physiol. (Lond.) **213,** 235—254 (1971).
89. KOSTERLITZ, H. W., LEES, G. M. and WALLIS, D. I.: Resting and action potentials recorded by the sucrose-gap method in the superior cervical ganglion of the rabbit. J. Physiol. (Lond.) **195,** 39—53 (1968).
90. KOSTERLITZ, H. W., LEES, G. M. and WALLIS, D. J.: Further evidence for an electrogenic sodium pump in a mammalian sympathetic ganglion. Br. J. Pharmac. **38,** 464—465P (1970).
91. LANDOWNE, D. and RITCHIE, J. M.: The density of sodium pumping sites in mammalian non-myelinated fibres. J. Physiol. (Lond.) **204,** 118—119P (1969).
92. LANDOWNE, D. and RITCHIE, J. M.: The binding of tritiated ouabain to non-myelinated nerve fibres. J. Physiol. (Lond.) **207,** 529—537 (1970).
93. LEES, G. M. and WALLIS, D. I.: Hyperpolarization of rabbit superior cervical ganglion cells due to activity of an electrogenic sodium pump. Br. J. Pharmac. **50,** 79—93 (1974).
94. LEVINSON, S. R. and MEVES, H.: The binding of tritiated tetrodotoxin to squid giant axons. Phil. Trans. Roy. Soc. B. **270,** 349—359 (1975).
95. LOGAN, J. G. and O'DONOVAN, D. J.: The effects of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine on synaptic membrane ATPases. J. Physiol. (Lond.) **250,** 47—49P (1975).

96. MULLINS, L. J. and NODA, K.: The influence of sodium-free solutions on the membrane potential of frog muscle fibres. J. gen. Physiol. **48,** 117—132 (1963).
97. NARAHASHI, T., MOORE, J. W. and SCOTT, W. R.: Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. J. gen. Physiol. **47,** 965—974 (1964).
98. NONOMURA, Y., HOTTA, Y. and OHASHI, H.: Tetrodotoxin and manganase ions: Effects on electrical activity and tension in taenia coli of guinea-pig. Science **152,** 97—99 (1966).
99. OHBA, M., SAKAMOTO, Y. and TOMITA, T.: Spontaneous rhytmic activity of the smooth muscle of the guinea-pig stomach and effects of ionic environments. Smooth Muscle Pharmacology and Physiology, INSERM, Vol. **150,** 301—316 (1975).
100. PASCOE, J. E.: The effects of ACh and other drugs on the isolated superior cervical ganglion. J. Physiol. (Lond.) **132,** 242—255 (1956).
101. PATON, W. D. M. and VIZI, E. S.: The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig longitudinal muscle strip. Br. J. Pharmac. **35,** 10—28 (1969).
102. PATON, W. D. M., VIZI, E. S. and ZAR, M. A.: The mechanism of acetylcholine release from parasympathetic nerves. J. Physiol. (Lond.) **215,** 819—848 (1971).
103. RANG, H. P. and RITCHIE, J. M.: On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations. J. Physiol. (Lond.) **196,** 183—221 (1968).
104. REUTER, H., BLAUSTEIN, M. D. and HAEUSLER, G.: Na-Ca exchange and tension development in arterial smooth muscle. Phil. Trans. Roy. Soc. B. **265,** 87—94 (1973).
105. REUTER, H. and SEITZ, N.: The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J. Physiol. (Lond.) **185,** 451—470 (1968).
106. RITCHIE, J. M., ROGART, R. B. and STRICHARTZ, G. R.: A new method for labelling saxitoxin and its binding to non-myelinated fibers of the rabbit vagus, lobster walking leg and garfish olfactory nerves. J. Physiol. (Lond.) **261,** 477—494 (1976).
107. RITCHIE, J. M. and STRAUB, R. W.: The hyperpolarization which follows activity in mammalian non-medullated nerve fibres. J. Physiol. (Lond.) **136,** 80—97 (1957).
108. SCHAEFER, A., SEREGI, A. and KOMLOS, M.: Ascorbic acid like effect on the soluble fraction of rat brain on adenosine triphosphatase and its relation to catecholamines and chelating agents. Biochem. Pharmacol. Vol. **23,** 2257—2271 (1972).
109. SCHATZMANN, H. J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocyten membran. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta II. 346—354 (1953).
110. SCHATZMANN, H. J. and VINCENZI, F. F.: Calcium movements across the membrane of human red cells. J. Physiol. (Lond.) **201,** 369—395 (1969).
111. SEN, A. K. and POST, R. L.: Stoichiometry and localization of ATP dependent Na and K transport in the erythrocyte. J. Biol. Chem. **239,** 345—352 (1964).
112. SIEGEL, G. J. and FOGT, S. K.: Effects of Pb^{2+} and other divalent cations on ouabain binding to E. electricus Electroplax(Na^+—K^+)Adenosine triphosphatase. Mol. Pharmacol. **15,** 43—48 (1979).
113. SJODIN, R. A. and BEAUGÉ, L. A.: The ion selectivity and concentration dependence of cation coupled active sodium transport in squid giant axons. Currs. Mod. Biol. **1,** 105—115 (1967).
114. SKOU, J. C.: The influence of some cations on ATPase from peripheral nerves. Biochem. Biophys. Acta **23,** 394—401 (1957).
115. SKOU, J. C., BUTLER, K. and W. HANSEN, O.: The effect of magnesium ATP, P_i and sodium on the inhibition of (Na^+ + K^+)-activated enzyme system by g-strophantin. Biochem. Biophys. Acta **241,** 443—461 (1971).
116. SOMLYO, A. P. and SOMLYO, A. V.: Pharmacology of excitation contraction coupling in vascular smooth muscle and in avian slow muscle. Fedn. Proc. **28,** 1634—1642 (1969).
117. STAHL, W. L. és SWANSON, P. D.: Calcium movements in brain slices in low sodium or calcium media. J. of Neurochem. Vol. **19,** 2395—2407 (1972).
118. STEINBACH, H. B.: Sodium and potassium in frog muscle. J. biol. Chem. **133,** 695—701 (1940).
119. STRAUB, F. B.: A vörösvértestek anyagcseréje és K-ion permeabilitása. MTA Orv. Tud. Oszt. Közl. **3,** 31—45 (1952).
120. TASHIRO, N.: Effects of isoprenaline on contraction of directly stimulated fast and slow skeletal muscle of the guinea-pig. Br. J. Pharmac. **48,** 112—123 (1973).
121. TAYLOR, G. S., PATON, D. M. and DANIEL, E. E.: Effect of Rb^+ and Cs^+ on electrogenic Na^+-pumping in rat myometrium. Comp. Biochem. Physiol. Vol. **38A,** 251—264 (1971).
122. THOMAS, R. C.: Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. J. Physiol. (Lond.) **201,** 495—514 (1969).

123. THOMAS, R. C.: Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. Physiol. Rev. **52**, 563—594 (1972).
124. TOMITA, T.: Electrical properties of mammalian smooth muscle. in: Smooth Muscle, ed. by Bülbring, E., Brading, A. F. és Tomita, T. London: E. Arnold publ. (1970).
125. TOMITA, T. and YAMAMOTO, T.: Effects of removing the external potassium on the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. J. Physiol. (Lond.) **212**, 857—868 (1971).
126. TÖRÖK, T. L. and VIZI, E. S.: Postsynaptic muscarinic receptors and sodium-pump activity. in: Progr. in Brain Research, Vol. **49**, ed. by Tucek, S., Elsevier Sci. Publ. Comp., Amsterdam 495. (1979).
127. TÖRÖK, T. L. and VIZI, E. S.: The role of sodium-pump activity in the hyperpolarization and in the subsequent depolarization of smooth muscle in response to stimulation of postsynaptic α_1-adrenoceptors. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **55**, 233—250 (1980).
128. TÖRÖK, T. L., VIZI, E. S. and KNOLL, J.: Calcium dependent hyperpolarization by adrenaline of taenia coli smooth muscle. in: Physiology and Pharmacology of Smooth Muscle. ed. by M. Papasova and E. Atanassova, Bulgarian Academy of Sci. publ. Sofia 75—82 (1977).
129. VIZI, E. S.: The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on release of acetylcholine from guinea-pig ileum longitudinal strips. Arch. exp. Path. Pharmac. **259**, 199—200 (1968).
130. VIZI, E. S.: Stimulation by inhibition of (Na^+ — K^+ — Mg^{2+})-activated ATPase of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. J. Physiol. (Lond.) **226**, 95—117 (1972).
131. VIZI, E. S.: Does stimulation of Na^+ — K^+ — Mg^{2+}-activated ATPase inhibit acetylcholine release from nerve terminals? Br. J. Pharmac. **48**, 346—347 (1973).
132. VIZI, E. S.: Possible connection between the release of acetylcholine and the activity of Na^+ — K^+-activated ATPase. in: Neurobiological basis of memory formation. ed. by H. Matthies. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 96—116 (1974).
133. VIZI, E. S.: The role of Na^+—K^+-activated ATPase in transmitter release: acetylcholine release from basal ganglia and its inhibiton by dopamine and noradrenaline. in: Subcortical mechanism and sensorimotor activities. ed. by T. L. Frigyesi, Hans Huber publ. Bern 63—89 (1975a).
134. VIZI, E. S.: Release mechanism of acetylcholine and the role of (Na^+—K^+)-activated ATPase. in: Cholinergic Mechanism. ed. by P. G. Waser., Raven Press publ., New York 199—211 (1975b).
135. The role of α-adrenoceptor situated in Auerbach's plexus in the inhibition of gastrointestinal motility. in: Physiology of Smooth Muscle ed. by Bülbring, E. és Shuba, M. F., Raven Press publ., New York (1976).
136. VIZI, E. S.: Termination of transmitter release by stimulation of sodium-potassium activated ATPase. J. Physiol. (Lond.) **267**, 261—280 (1977).
137. VIZI, E. S. and TÖRÖK, T. L.: (Na^+—K^+)-aktiválta ATPáz szerepe a neurokémiai transzmisszióban. MTA Biol. Oszt. Közl. **21**, 357—385 (1978).
138. WANG, P. and CLAUSEN, T.: Treatment of attachs in hyperkalaemic familial periodic paralysis by inhibition of salbutamol. Lancet **1**, 221—223 (1976).
139. WESPI, H. H.: Active transport and passive fluxes of K, Na and Li in mammalian nonmyelinated nerve fibres. Pflügers Arch. **306**, 262—280 (1969).
140. WHITTAM, R. and AGAR, M. E.: The connection between active cation transport and metabolism in erythrocytes. Biochem. J. **97**, 214—227 (1965).
141. YOSHIMURA, K.: Activation of Na—K activated ATPase in rat brain by catecholamines. Biochem. J. **74**, 389—391 (1973).

FÉNY- ÉS ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK EMBERI CAROTIS TESTEKEN

ÁBRAHÁM AMBRUS

Szeged

Összefoglalás

A carotis testek funkcionálisan elsősorban számbajöhető alkatrészei a glomussejtek és az idegrostok. A glomussejtek két csoportot alkotnak. Az egyikbe a kemoreceptorsejtek, a másikba a toksejtek tartoznak. A kemoreceptorsejtek poligonális testek. Citoplazmájukban az organellumok kifejezettek. A sejtmag kerekded, a kromatin homogén. A sejteket jellemzik az ozmiofil testek. A toksejtek hosszúkás, nyúlványos testek, a kemoreceptorsejtekhez társulnak, néha lepelként ráborulnak ezekre. Az idegrostok egy része a Schwann sejtekben helyezkedik el mezaxonmembránba burkolva. A másik, a nagyobbik rész, a kemoreceptor sejtekből álló kerek sejtfészket sűrű fonadékkal veszi körül. A fonadékból rostok húzódnak a kemoreceptorsejtekhez és boutonok formájában ezeken végződnek. Az idegvégződések a kemoreceptorsejtekkel szinapszisokat alkotnak. Ezeknek három formáját találtuk. Egyik a konvencionális szinapszis, a másik a zsákszinapszis, a harmadik a paralel kontaktus. A konvencionális szinapszisokban megvannak mindazok az alkotórészek, amelyek a központi idegrendszer neuronjaiban megállapításra kerültek. A zsákszinapszisok a boutonok felnagyított képei. Axolemmából, axoplazmából, szinaptikus vezikulumokból és mitokondriumokból állanak. A paralell kontaktusokban az axolemma és a citoplazma érintkezik egymással. Az axoplazmában szinaptikus vezikulumok és mitokondriumok vannak. A konvencionális szinapszisok periférikusan, a zsákszinapszisok és a paralell kontaktusok centrálisan vezetnek. A kemoreceptorsejtekben nincsenek neuronális bélyegek, következésképpen nem interneuronok. A reciprok szinapszisokhoz hiányoznak a morfológiai alapok. A kemoreceptorsejtek érzéksejtek.

Bevezetés

Az emberi carotis test (glomus caroticum) a carotis communis bifurcátiójában fekszik, RIEGELE (1928) szerint a mediális hátsó oldalon. Felső felével túlterjed az elágazáson és az artéria carotis interna falához simul. Vöröses, sár-

gás, tömör testecske. Hossza 5—7 mm, szélessége 2,5—4 mm, vastagsága 1,5 mm (HEYMANS—NEIL 1958). Először TAVBE tesz róla említést 1743-ban KJAERGAARD 1973). Ő szimpatikus ganglionnak tartotta és kicsiny volta miatt ganglion minutumnak nevezte. HALLER (1762) ganglion exiguum, NEUBAUER (1772) ganglion parvum névvel illette. ANDERSCH (1797) ganglion intercaroticumnak, LUSCHKA (1862) glandula caroticanak, ARNOLD (1865) glomeruli arteriosi intercaroticinek, MARCHAND (1891) nodulus caroticus-nak nevezte. Manapság a legtöbben a glomus caroticum elnevezést használjuk.

Vérellátását a carotis internából vagy a carotis externából, esetenként mind a kettőből kapja. Idegrostjainak nagy része a nervus glossopharyngeusból, a kisebb a nervus vagusból, a még kisebb rész a nyaki szinpatikusból ered.

Anyag, módszerek

Vizsgálatainkat hullákból kapott és súlyos asthma bronchialéban műtét útján eltávolított carotis testeken végeztük. Fénymikroszkópos vizsgálatainkhoz az anyagot 20%-os neutrális formalinban rögzítettük. Az anyagból fagyasztott metszeteket készítettünk. Ezek egy részét hemateinnel, hematoxilinnel és eozinnel festettük, a másik részt a Bielsovszky — Ábrahám és az Ábrahám-féle eljárás szerint impregnáltuk.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára az anyagot mindjárt a műtét után 1%-os Sörensen szerint pufferolt ozmium savba helyeztük. Ezután víztelenítettük és araldítba ágyaztuk. Az anyagból LKB ultramikrotommal ultravékony metszeteket készítettünk és ezeket angol, holland és japán elektronmikroszkópokkal vizsgáltuk. A metszetek és a felvételek Londonban a Middlesex Hospital Medical School Anatómiai és Biológiai Intézetének elektronmikroszkópos laboratóriumában, Budapesten a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézetének és a Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Anatómiai Intézetének elektronmikroszkópos laboratóriumában, Szegeden a József Attila Tudományegyetem Általános Állattani és Biológiai Intézetének elektronmikroszkópos laboratóriumában és a Szegedi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézetének elektronmikroszkópos laboratóriumában készültek. Munkánk elvégzésében segített Eric Neil a Middlesex Hospital Élettani Intézetének az igazgatója, Peter Gould a Middlesex Hospital Anatómiai Intézetének readere, Szabó Dezső a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézete elektronmikroszkópos laboratóriumának a vezetője, Szentágothai János a Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Anatómiai Intézetének igazgatója és Guba Ferenc a Szegedi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézetének igazgatója. A segítségért mindnyájuknak ezúttal is köszönetet mondunk.

Fénymikroszkópos vizsgálatok

A glomus caroticumot vastag kötőszöveti tok veszi körül, amely túlnyomó részben kollagén rostokból áll. A tokból nyalábok lépnek a szerv belsejébe és ezt kisebb-nagyobb darabokra tagolják. A válaszfalakban húzódnak a véredények és az idegrostok.

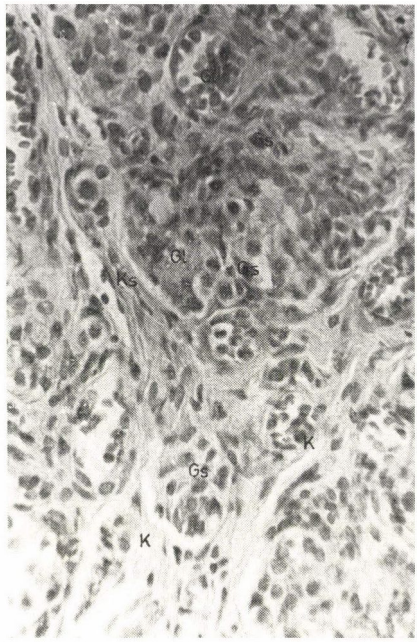
A kötőszöveti tokon belül helyezkedik el a tulajdonképpeni glomus állomány, amely kerekded fészkekbe rendeződő glomussejtekből áll. Egy ilyen sejtcsoportosulásnak glomerulus a neve. A sejtek között vannak nagyobb, tömörebb magvú, kerekded, esetlegesen kissé megnyúlt formák és főleg a glomerulusok szélén sötétebbre festődő, hosszúkás magvú alakok. Az előbbiek a kemoreceptorsejtek, az utóbbiak a toksejtek. Lebenyes tüdőgyulladásnál mind a két sejtféleség deformálódik, erősen argentofiliássá válik, egymáshoz tapad és együtt nagy formátlan csomókat alkot. Ugyanezt a képet kaptuk epevezetők gennyes gyulladása után is (1. ábra).

A glomus caroticum vérellátása rendkívül gazdag. A vért a glomus artériából kapja, amely az alsó póluson lép be a szerv belsejébe. Itt ágakra oszlik, amelyek a kötőszöveti tokban gazdag fonadékot formálnak. Ebből kisebb artériák lépnek az interglomeruláris kötőszövetbe és innen a glomerulusok belsejébe, ahol hajszálerekre hullanak szét. Az utóbbiak a gomerulusokban két vénában egyesülnek, amelyek az interglomeruláris kötőszövetben futó gyűjtővénákba nyílnak. Ezek lumenük általános növekedése közben kifelé haladnak és a glomust övező vénás fonadékba szakadnak. A hajszálerek és a kisvénák között rendkívül gyakoriak a szinuszok, illetőleg a szinuszoid tágulatok, amelyek különösen légzési zavarok (anoxia) esetében erősen kitágulnak.

Az emberi glomus caroticum rendkívül gazdag beidegzés alatt áll. A nervus glossopharyngeusból, vagusból és a nyaki szimpatikuszból eredő idegrostok száma olyan nagy, hogy egy jól impregnált készítményen az idegrostoktól az alapszövetből alig lehet valamit látni.

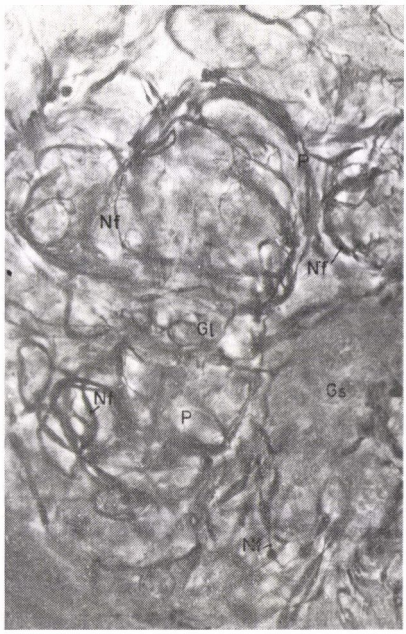
A kötőszöveti tokban húzódó idegtörzsekből és az idegrostnyalábokból a glomus belsejébe lépő fonadékoknak fénymikroszkóposan három formáját szoktuk megkülönböztetni. Egyik a periglanduláris fonadék (plexus periglandularis), a második a periglomeruláris fonadék (plexus periglomerularis) és a harmadik az intraglomeruláris fonadék (plexus intraglomerularis).

A plexus periglandularis elnevezés abból az időből származik, amikor a glomus caroticumot mirigynek tartották és glandula carotica névvel illették. Ez a fonadék a glomust határoló kötőszöveti rétegben helyezkedik el. Elég sok benne a velőhüvelyes rost, amelyek között sok velőtlen rostot lehet látni. Állatoknál (sündisznó, ló, sertés) idegsejtek is vannak benne (Ábrahám 1968). Kisebb számban az emberi glomusban is akadnak idegsejtek. Az idegsejtek, nem különben a fonadékok is az emlősök különböző fajaira jellemzők. A jellegzetesség főleg az egymástól távolabb eső fajok carotis testeinek a vizsgálata

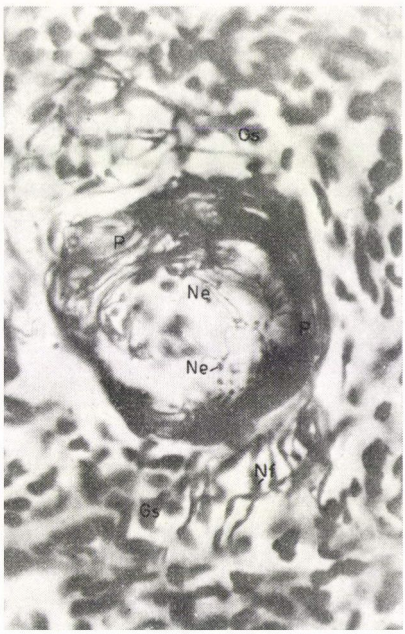


1. ábra. Homo: glomus caroticum. Bouin fixálás, hematein-eosin festés. Gs — glomussejt; Gl — glomerulus; Ks — kötőszöveti sejt; K — kollagén. Nagyítás: 600 ×

2. ábra. Homo: glomus caroticum. Bielszowszky—Gros-féle eljárás. Nf — idegrost; P — plexus perilglandularis; Gl — glomerulus; Gs — glomussejt. Nagyítás: 600 ×



3. ábra. Homo: glomus caroticum. Bielsowszky—Gros-féle eljárás. Nf — idegrost; P — plexus periglomerularis; Gl — glomerulus; Gs — glomussejt. Nagyítás: 640 ×



4. ábra. Homo: glomus caroticum. Bielsowszky—Ábrahám-féle eljárás. Gs — glomussejt; Nf — idegrost; P — plexus intraglomularis; Ne — idegvégződés. Nagyítás: 800 ×

során válik szembetűnővé. Egyes állatfajoknál az idegsejtek, vagy ezeknek egy része paraszimpatikus típusú, bipolaris sejt, amely a nervus glossopharyngeus sejtrendszerébe tartozik. Ilyeneket láttunk a sündisznó és a patkány glomus caroticumában. Máskor, ahogy ezt a disznó és a szarvasmarha carotis testeiben láttuk, az idegsejtek multipolárisak, a szimpatikus idegrendszerbe tartoznak és a nyaki szimpatikus sejtek elemei (2. ábra).

A periglomeruláris fonadék az egyes sejtfészkeket veszi körül és gazdag nyalábrendszereket küld a glomussejtek közé. Rostjait jellemzik a hosszúkás varixok, amelyekben élesen tűnnek elő a neurofibrillák (3. ábra).

A glomerulusba beépülő rostok alkotják az intraglomeruláris fonadékot (plexus intraglomerularis). Ez a fonadék az embernél annyira sűrű, hogy vastagabb jól impregnált metszeteken az idegrostoktól alig lehet benne glomussejtet látni. Az idegrostok néha spirális rendszereket formálnak, amelyeknek egyes rostjai főleg idősebb korban erősen varikózusak (ÁBRAHÁM 1964). Az intraglomurális fonadék végrostjai a kemoreceptor sejteken végződnek idegvégfejecskék formájában. Egy sejten rendszerint egy vagy két végződést látunk, de lehet három, sőt több is (4. ábra).

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Azok, akik a glomus caroticum szerkezetét elektronmikroszkóppal állati anyagon vizsgálták, a sejtformák és a szerkezet megítélésében eléggé különböző felfogást vallanak. Vannak, akik a két glomussejttípus mellett foglalnak állást és vannak, akik egy mellett kardoskodnak. Mi az emberi glomus caroticumban két egymás felé jól elhatárolható sejtformát látunk. Az egyik aránylagosan nagy és lekerekített, a másik hosszúkás és egyik vagy mind a két végén elkeskenyedik. Az első típusba tartozók a kemoreceptor sejtek (fősejtek, glomussejtek, epiteloidsejtek, receptorsejtek), a másodikba tartoznak a toksejtek (támasztó sejtek, szatellitasejtek, periglomeruláris sejtek). Az alábbiakban először a kemoreceptor sejtekkel, majd a toksejtekkel foglalkozunk. Később a véredényeket, az idegrostokat, a Schwann sejteket és a szinapszisokat ismertetjük.

Kemoreceptor sejtek

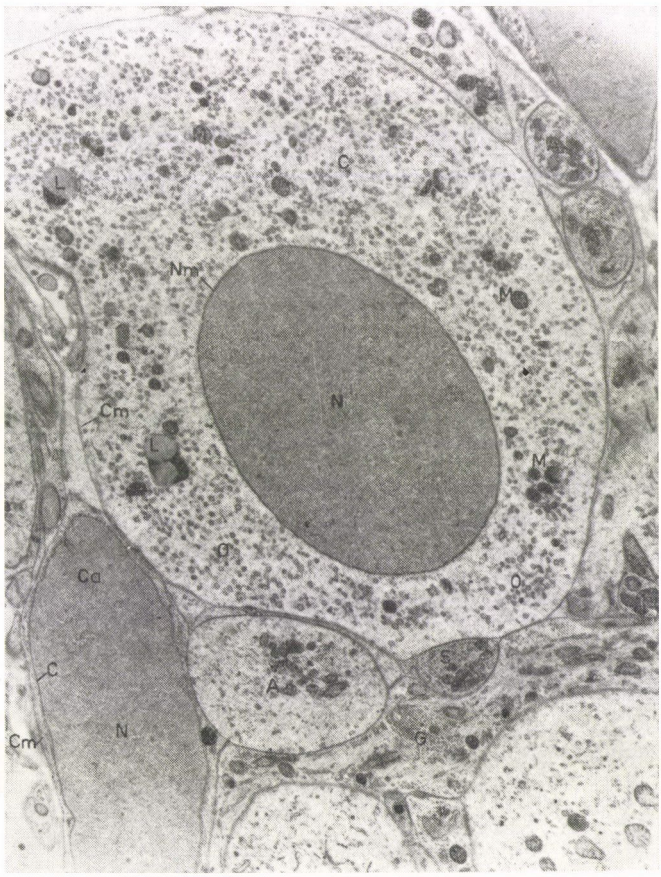
A kemoreceptor sejtek sejthártyája éles, a citoplazma szemecskézett. A szemecskék legnagyobb részét az ozmiofil testek teszik ki, amelyek a legtöbb sejtben az állomány minden részében megtalálhatók, hol kisebb, hol nagyobb mennyiségben. Ezek között helyezkednek el a sejtorganellumok, amelyek közül élesen rajzolódnak ki a következők: 1. endoplazmatikus retikulum, 2. mitokondriumok, 3. a lizoszómák, 4. golgikomplex, 5. ozmiofil testek.

1. Az endoplazmatikus retikulum a sejtnek csak egyik részére terjed ki. Fejlettebb formájában a nyúlványokban látható. Kisebb-nagyobb lumenű

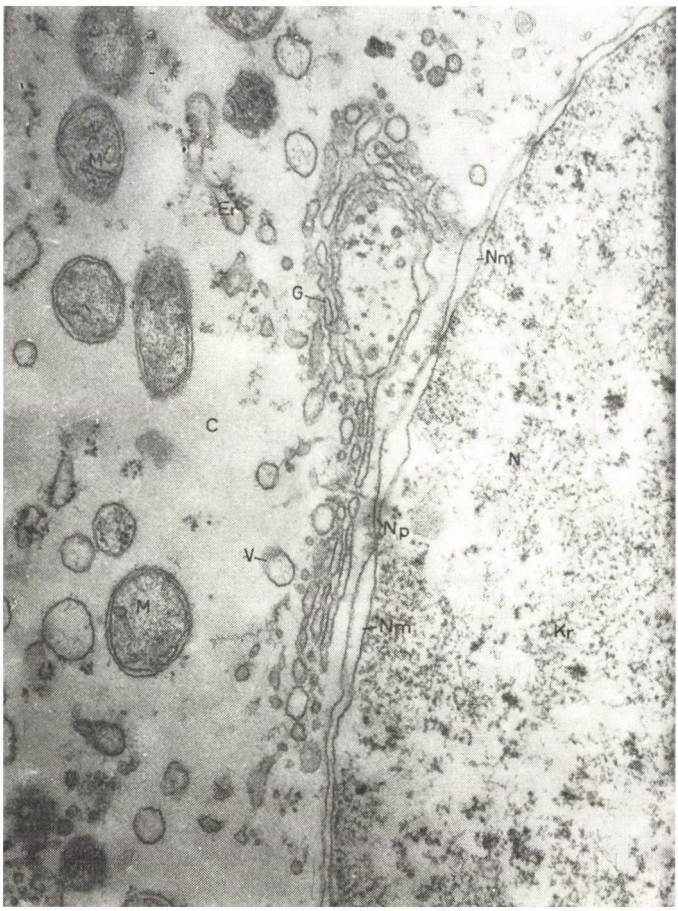
csövekből, illetőleg csatornákból áll, amelyek anasztomozálnak. Az utóbbiaknak mind a két ismert formája megtalálható. Vannak granuláris csatornák, amelyek mentén látszanak a sorba rendeződő riboszomák és vannak csatornaszakaszok, amelyek mentén nincsenek riboszomák.

2. A mitokondriumok tömegesen láthatók a citoplazmában. Általában kerekdedek, néha hosszúkásak, a cristás típusba tartoznak. A cristák iránya transzverzális, esetenként longitudinális, gyakori a befűződő forma. A két befűződő részt néha csak a vékony összekötő darab tartja össze (5. ábra).

3. A lizoszómák elég gyakran jelentkeznek. Csomócskás testek, amelyek szukróz-kakodilát formalin és ozmium fixálás után nagyobb tömegben láthatók. A csak ozmiummal fixált anyagból készült metszeteken, kevesebb a lizoszómák száma. Alakjuk és nagyságuk erősen variál. Többnyire félgolyó alakú testek. Megjelenésük és formájuk nem mondható állandónak. Szerkezetük



5. ábra. Homo: glomus caroticum. Kemoreceptor sejt. C — citoplazma; M — mitokondrium; L — lipid; O — ozmiofil granulum; Cm — sejthártya; A — axon; S — szinapszis; G — Golgi-komplexum; Ca — toksejt; N — sejtmag; Nm — maghártya. Nagyítás: 25 000 ×



6. ábra. Homo: glomus caroticum. Kemoreceptor sejt. C — citoplazma; Er — endoplazmatikus retikulum; G — Golgi-komplexum; M — mitokondrium; Nm — maghártya; Np — magpórus; N — sejtmag; Kr — kromatin; V — vezikulum. Nagyítás: 72 000 ×

amellett szól, hogy különböző eredetű anyagoknak a csoportosulásából és összetapadásából keletkeztek.

4. A Golgi-féle készülék klasszikus formájában jelentkezik és rendesen a maghártya közelében fekszik. Állományában a csatornák rendszere és vezikulumok csoportja élesen határolódik el a citoplazma felé. A csatornák párhuzamosak a maghártya felületével. Mind a csatornák, mind a hólyagoknak a fele élesen elkülönül és mindkét oldalon sima (6. ábra).

5. A kemoreceptor sejtekben gyakoriak a különböző méretű homogén testek, amelyek egészben vagy részben nagymérvű ozmiofiliát mutatnak. Hártyával határolt testek, amelyek a citoplazmában mindenütt, de főleg a sejthártya közelében szoktak tömegesen megjelenni. Az ozmiofil testeknek a

glomussejtekben való jelenlétéről először GARNER—DUNCAN (1958) emlékszik meg. Szerintük nem állandó alkotóelemei a citoplazmának, hanem csak akkor jelennek meg, ha az anyag rosszul van fixálva.

LEVER, LEWIS és BOYD (1959) az ozmiofil testeket a glomussejtek állandó alkotórészeinek tartják, és azt állítják, hogy a GARNER—DUNCAN-féle felfogás helytelen, amennyiben a legjobb és a legrosszabb rögzítésű anyagon is mindig megtalálhatók a citoplazmában. Ők az ozmiofil testeket „dense cored" granulumoknak nevezik és katekolamin hordozóknak tartják. Az ő vizsgálataik értelmében az ozmiofil testek között vannak szabad formák és vannak membránnal körülvett alakok, olyanok, amilyeneket a patkány mellékveséjében találtak (LEVER 1955).

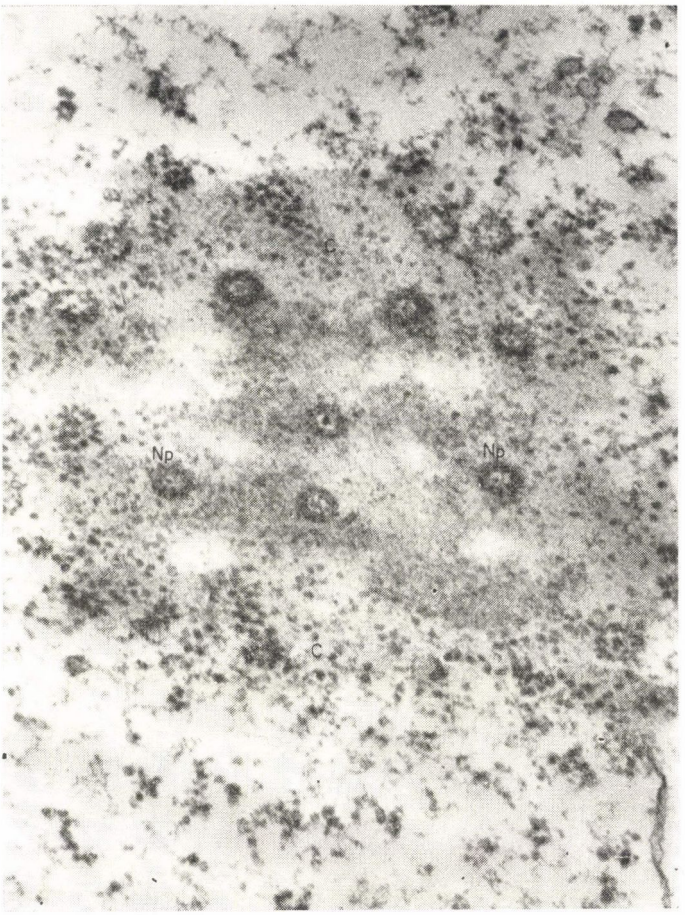
HESS (1968), DEARNELEY, FILLENZ és WOODS (1966) szintén megemlékeznek az ozmiofil testekről, amelyeket glutáraldehid ozmium fixálás után tömegesen találtak a sejtekben, néha a szélen közvetlenül a sejthártya alatt, máskor szétszórtan az egész citoplazmában.

F. de CASTRO és RUBIO (1968) ozmium fixálás után szintén láttak ozmiofil testeket. Ezek között voltak membránnal határolt alakok és olyanok, amelyek körül nem volt membrán.

GRINLEY és GLENNER (1967), akik emberi anyagon dolgoztak, glutáraldehid-ozmium fixálás után tömegesen találtak ozmiofil granulákat. Ezek között voltak homogén formák és olyanok, amelyeknek centrális részét (mátrix) világos zóna választja el a határhártyától.

Az ozmiofil testek nagy tömegben tűntek fel azon metszeteinken, amelyek szukróz-kakodillát-formalin ozmiummal fixált anyagból készültek. Sajátságos, hogy a sejtek ama részein, ahol sok volt a mitokondrium, ott kevés volt az ozmiofil test. Viszont ott, ahol sok volt az ozmiofil test, ott kevés volt a mitokondrium vagy pedig egyáltalán nem lehetett mitokondriumot látni. Ozmiofil testeket csak ozmium fixálás után is sokat találtunk. Nagyobb részük, kompakt forma volt, a kisebb tipikus dense core alakot mutatott. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy vannak sejtek, amelyek egészen tele vannak ozmiofil testekkel és vannak olyanok, amelyekben kevés az efféle test vagy egyáltalán nem fordul elő (5. ábra).

Az ozmiofil testeknek vagy ahogy ma általánosan nevezni szoktuk dense core testeknek az előfordulását újabb területre terjesztik ki azok a vizsgálatok, amelyeket a csíkbogár (*Dytiscus marginalis*) előagyán (ÁBRAHÁM 1969, 1976), a házi kacsa (*Anas boscas domestica*) ceromájában (ÁBRAHÁM 1979), az európai sün (*Erynaceus europaeus*) orrbőrén és az éticsiga (*Helix pomatia*) gasterointestinalis rendszerén végeztünk. Ezek során megállapítottuk, hogy a csíkbogár protocerebrumában, a házi kacsa csőrbőrében levő Grandy-féle testek érzéksejtjeiben, az európai sün orrbőrében a Merkell-féle sejtekben és az éticsiga gyomor-bél rendszerének a falában tömegesen fordulnak elő a dense core vezikulumok.

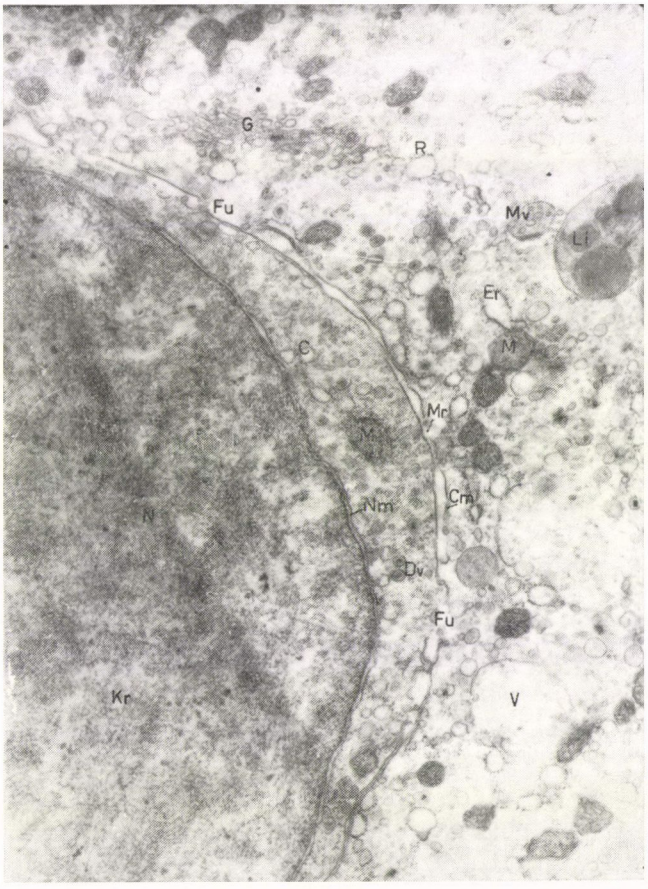


7. ábra. Homo: glomus caroticum. Kemoreceptor sejt. C — citoplazma; Np — magpórus. Nagyítás: 92 000 ×

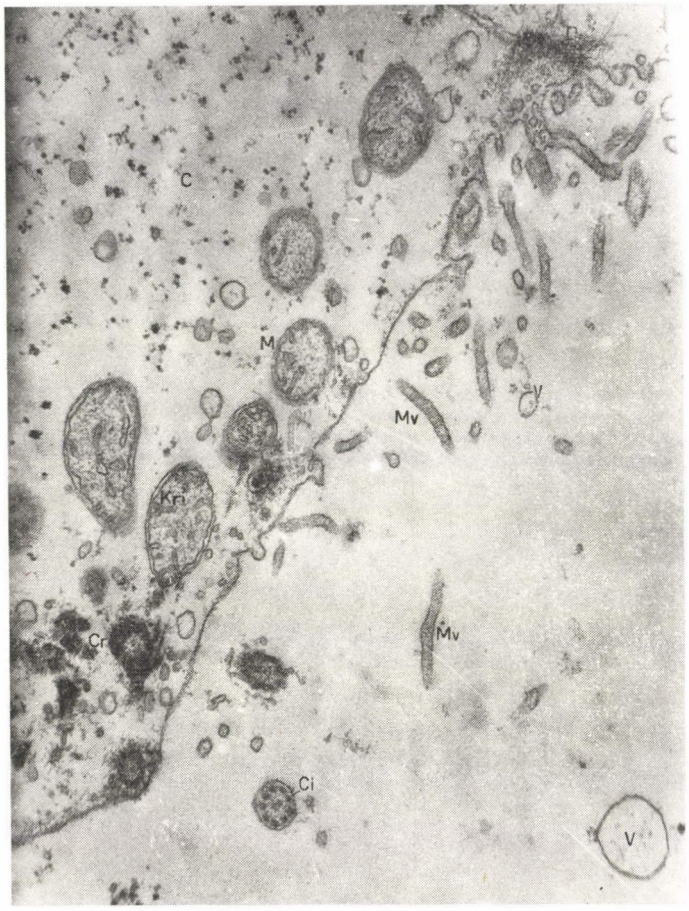
A kemoreceptor sejtek magva nagy, ovális test. A kromatin aprón szemecskézett. Állománya homogén. A belső maghártya egyenes, a külső helyenként ráncokat formál. A ráncok helyén a maghártyák közti terület kitágult. A maghártyák helyenként egészen elvékonyodnak, illetőleg eltűnnek. Ezeken a helyeken látszanak a magpórusok, amelyek keresztmetszetben jól definiáltak, de különösen tangenciális hosszmetszeten láthatók kitűnően. A magpórusok a kapott képeken sajátságos mezőt formálnak, amelyen nagyjából egyforma távolságra kis kerekded nyílások formájában jelennek meg, amelyek mindegyikét apró szemecskékből álló tok veszi körül. A tok szemlélete nyomán arra lehet gondolni, hogy ez a formáció a pórusok lumenének a szabályozásában szerepel, ami a nukleoplazma és a citoplazma közötti forgalom szabályozását jelentené. A pórusokat közvetlenül határoló szemecskés réteg emlékeztet a Ciliá-

ták nephridialis csatornáinak a záró készülékeire, a pórusmező pedig a növényi stomákat juttatja eszünkbe (7. ábra).

Különleges folyamatokra utal a sejthártya kitűrődése, illetőleg rupturája. Egyik formájának az ismertetése úgy látszik legjobban keresztül vihetőnek, ha a kapott kép pontos leírására szorítkozunk (8. ábra). A képen baloldalt látjuk a sejtmagot. Szerkezetéből, illetőleg a kromatin állomány homogenitásából arra következtetünk, hogy kemoreceptor sejtről van szó, ami különben a sejt megjelenési formájából is rögtön kiviláglik. Jól szembetűnő a két maghártya. A két maghártya közötti hézag egész lefutásában egyforma szélességű. A helyenként jelentkező és kisméretű kitágulások nem szembetűnők. A hézag egész lefutásában üres. A citoplazmát a magplazmával összekötő sztómák elmosódottak.



8. ábra. Homo: glomus caroticum. Kemoreceptor sejt. C — citoplazma; Cm — sejthártya; V — vezikulum; M — mitokondrium; Dv — Dense core vezikulum; Er — endoplazmatikus retikulum; R — riboszóma; Mr — sejthártyaruptúra; Fu — citoplazma fúzió; Li — lizoszóma; Mv — multivezikuláris test; G — Golgi-komplexum; N — sejtmag; Nm — maghártya; Kr — kromatin. Nagyítás: 36 000 ×



9. ábra. Homo: glomus caroticum. Kemoreceptor sejt. C — citoplazma; M — mitokondrium; D — dezmoszóma; Kri — kriszta; Cr — csillangó gyökér; Mv — mikrovillus; Ci — cilium; V — vezikulum. Nagyítás: 72 000 ×

A citoplazma vékony szegélyként övezi a magot. Sok benne a kisebb-nagyobb clear vezikulum, kevés a dense core vezikulum és a mitokondrium. A sejthártya vékony, egyenletes vastagságú és szorosan kapcsolódik a szomszédos sejt sejthártyájához. A kettő közötti hézag jól szembetűnő. Alul, közel a kép jobb széléhez mind a két sejtnek a membránján a degeneráció jeleit látjuk. Tovább mind a két membrán eltűnik. A kitágult membránközti hézag egyesül a szélső kemoreceptor sejt citoplazmájával. A két sejt fuzionál, ami mind a két sejtnek degenerációjához, majd a pusztulásához vezet. Erre utalnak a szélső sejtben látható tág vezikulumok, a lizoszóma, a nagyságban variáló mitokondriumok, a riboszóma koszorúval övezett tág endoplazmatikus ciszternák, a mikrovezikuláris test, a hatalmas és az endoplazmatikus retikulum ciszternáihoz kapcsolódó Golgi-komplexumok.

Degenerációs folyamatra utalnak a nagy vékony membránnal övezett hólyagok, amelyek több sima membránnal határolt vezikulum összeolvadására utalnak. Hogy mit jelentenek ezek az elváltozások, és mi az, ami ezeket létre hozta, nincs módunkban megmondani. Lehet gondolni táplálkozási és lélegzési zavarokra, de az asthma bronchialera is, amiért jó ideig az egyik oldali glomus caroticumot műtétileg eltávolították.

A magvacska kicsi, szabálytalan elektron dense csomó, amely a mag közepe táján helyezkedik el, de sok esetben szélállású helyzetet szokott felvenni. Olykor egy magban nem egy, hanem több magvacskát is lehet látni. Nem ritkák a sötét formák, amelyek azt a látszatot keltik, mintha több kerekded csomóból volnának összetéve.

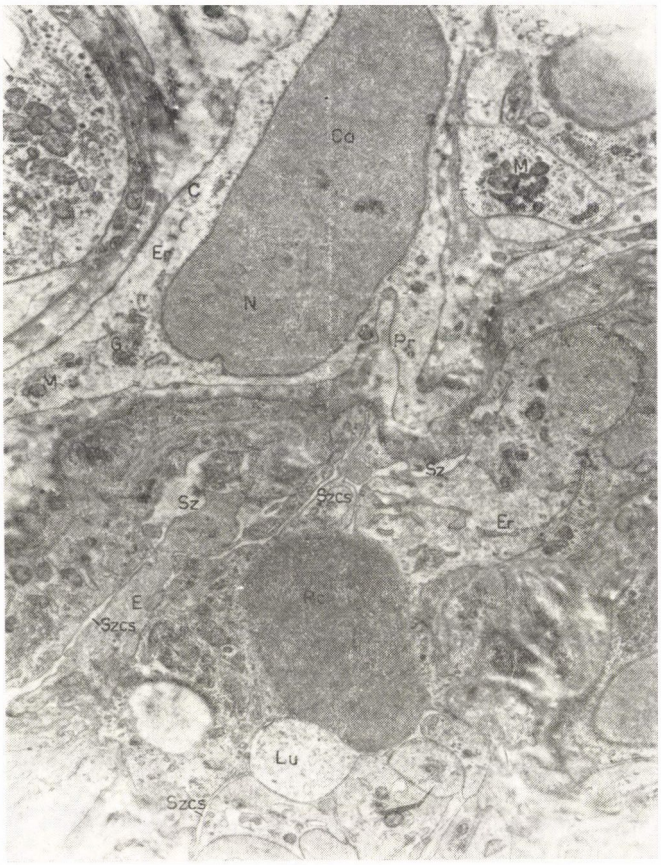
A kemoreceptor sejtek sajátságos tartozékai a dezmoszómák, a mikrovillusok és a ciliák. A dezmoszómák két szomszédos sejt érintkezésénél jelennek meg. A szinaptikus hártyákra és az interkaláris korongokra emlékeztetnek, azzal a különbséggel, hogy sötétebbek és mélyebben nyúlnak be a perikarion területére. Az egymással érintkező hártyák vastagsága általában egyforma, de vannak esetek, amikor az egyik vastagabb, mint a másik. A dezmoszómák néha a sejthártya egész hosszára kiterjednek, de az is előfordul, hogy annak csak egy kis részére szorítkoznak.

A mikrovillusok cilindrikus homogén testek. A vastagabbak tövében ellipszoid hólyagocskák vannak. Ezek csoportokat formálnak, amelyekben az egyes alakok nagyság tekintetében variálnak.

A kemoreceptor sejteknek jellemző alkatrészei a csillangók. Ezek az ismert szerkezetet mutatják. Keresztmetszetükön a membrán alatt látjuk a 9 kettős oszlopnak és centrálisan a kettős központi oszlopnak a keresztmetszetét. Helyenként tömegesen fordulnak elő. Biscoe és Stehbens (1966) a macska glomus caroticumából 9+0 típusú csillangókat írtak le, olyanokat, amelyeket az amphibiák carotislabyrinthusából, az endokrin sejtekből, különböző érzékszervek érzéksejtjeiből és az idegrendszerből közöltek, és amelyeknek érző szerepet tulajdonítottak. Azok a csillangók, amelyeket mi találtunk, a 9+2 szerkezet alapján mozgó szerveknek minősülnek (9. ábra).

Toksejtek

A toksejtek a fészkeket határoló kötőszöveti nyalábok mellett, illetőleg a glomerulusok belsejében a kemoreceptor sejtek között helyezkednek el. Megnyúlt testek, magvuk hosszúkás és homogén. A citoplazmából számos nyúlvány lép ki. A nyúlványok hosszúak, végükön lecsapottak vagy lekerekítettek, esetlegesen kihegyezettek. A kemoreceptor sejteket burkolják be vagy határolják el egymás felé. Citoplazmájuk üres vagy aprón szemecskézett. Keskeny szegély formájában övezi a magot. Gyakoriak bennük az apró hosszúkás vezikulumok



10. ábra. Homo: glomus caroticum. Ca — toksejt; C — citoplazma; Er — endoplazmatikus retikulum; G — Golgi-komplexum; Pr — sejtnyúlvány; N — sejtmag; Sz — színusz; Szcs — szinusz csatorna; E — endotél; M — mitokondrium; Lu — lumen; Rc — vörösvérsejt. Nagyítás: 25 000 ×

és párhuzamos lefutású halvány filamentumok. A Golgi-komplexum fejlett. Ritkák vagy teljesen hiányoznak az ozmiofil testek. A toksejteket, mivel egy vagy több, mezaxonikus hártyával körülvett tengelyfonalat szoktak tartalmazni, nehezen lehet elhatárolni a Schwann-féle sejtektől. Mi az egyedüli különbözőséget abban látjuk, hogy a Schwann-féle sejtek citoplazmája terjedelmesebb, belőlük sok nyúlvány ered, sok bennük a mezaxonnal körülvett tengelyfonál és az egymásba kapcsolódó bonyolult mezaxon rendszer (10. ábra).

Véredények

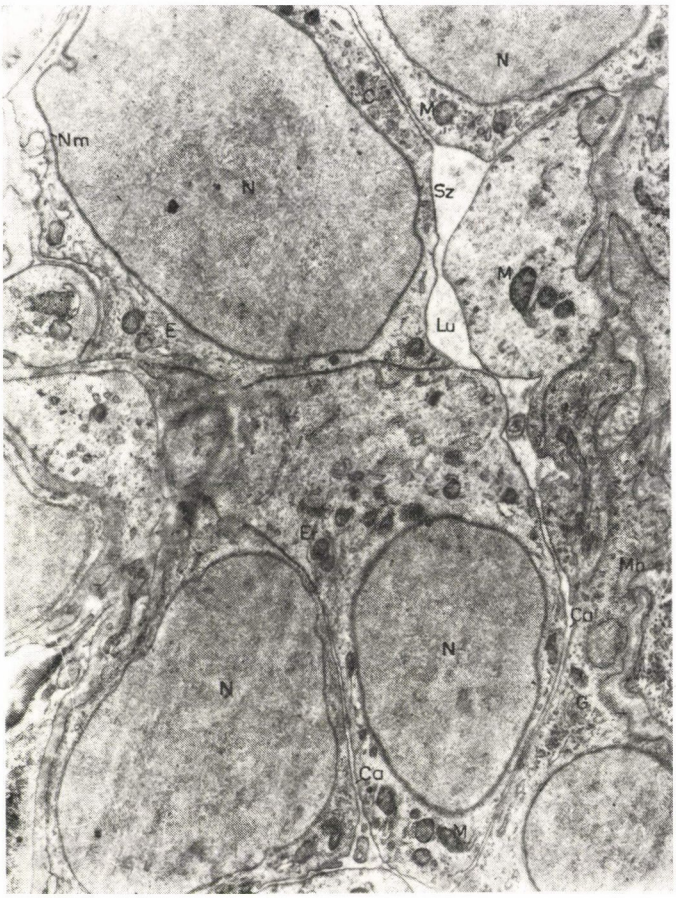
A glomerulusok véredényeinek a legnagyobb részét a prekapillárisok, a kapillárisok, illetőleg szinuszok és szinuszoidok szolgáltatják. A kapillárisok lumenét endotélsejtek határolják. Ezek megnyúlt sejtformák, amelyeknek vég-

részei dezmoszómákkal kapcsolódnak egymáshoz. Citoplazmájukban sok az apró vezikulum és az endoplazmatikus retikulum, amelyeknek egyenes csatornácskái helyenként kitágulnak. A mitokondriumok száma kevés, ozmiofil testeket csak a legritkább esetben lehet látni.

Az endotél sejtekre az amorf alaphártya és a finom kollagén fibrillák következnek, amelyek az endotél sejtek nyúlványait körülburkolják. A hajszáledények falát kifelé egy sejtes réteg határolja, amelynek sejtjei szerkezetileg megegyeznek az endotél sejtekkel azzal a különbséggel, hogy bennük több a vezikulum, kevesebb a mitokondrium és az ozmiofil test. Ezek a sejtek a pericináták, amelyek nem alkotnak összefüggő réteget.

A hajszálerek lumene tágulékony. Ez azzal válik lehetségessé, hogy a lumenből két endotél sejt között egy keskeny hasadék húzódik az endotél sejtek alapjáig, ahol erősen kiszélesedik. Ez a sajátságos szerkezet, amely más szervek

11. ábra. Homo: glomus caroticum. Hajszáledény. Lu — lumen; E — endotél sejt; C — citoplazma; N — sejtmag; Dr — divertikulum; Mb — alaphártya; Er — endoplazmatikus retikulum; Ca — csatorna. Nagyítás: 32 000 ×



12. ábra. Homo: glomus caroticum. Szinusz. Sz — szinusz; Lu — lumen; E — endotél sejt; M — mitokondrium; N — sejtmag; Nm — maghártya; G — Golgi-komplexum; Ca — csatorna; Mb — alaphártya. Nagyítás: 25 000 ×

hajszálereiben nem fordul elő, arra való, hogy a vérnyomás fokozódásakor a lumen kitágulhasson és az ér nagyobb mennyiségű vér befogadására alkalmassá váljék.

A hajszálerek kiszélesedő, illetőleg összekötő szakaszai a szinuszok, illetőleg a szinuszoidok. Ezek sajátságos fallal határolt cikk-cakkos lefutású üregrendszerek, amelyek a glomerulusok belsejét a szó igazi értelmében átszövik. Lumenük szabálytalan, helyenként szögletszerűen kiugrik és kiszélesedik (11. ábra).

A szinuszoidok lumenét határoló endotél sejtek nyúlványokkal vannak ellátva. A nyúlványok vége lekerekített, s az érintkező darabok ízületszerűleg kapcsolódnak egymáshoz. A centrális hosszúkás és homogén sejtmagot a citoplazma szegélyszerűleg veszi körül. A két maghártya egymás felé élesen elhatárolódik.

Mind a nyúlványokban, mind a centrális citoplazmában gyakoriak a mitokondriumok. A citoplazmában látszanak az endoplazmatikus retikulum ciszternái és a Golgi-komplex vezikulumai. Az endotél sejteket a homogén membrana bazalis határolja. Az árteriák és vénák az általánosan ismert falszerkezetet mutatják (12. ábra).

Szinapszisok

Mivel a kemoreceptor sejtek és az intraglomeruláris idegrostok közötti kapcsolat a működés szempontjából nagy fontossággal bír, a valóságos helyzetnek a feltárására való törekvés az elmúlt idők során sok munkára és ezzel kapcsolatosan igen sok vitára szolgáltatott okot és alkalmat. Ezek során az idegrostoknak a kemoreceptor sejtekkel való kapcsolatát illetőleg a legkülönbözőbb megállapítások kerültek az irodalomba. A szerzők általában azon a véleményen voltak, hogy a glomerulusokban idegrost végződéseket nem lehet kimutatni. Magam már első vizsgálataim során úgy láttam, hogy az intraglomeruláris fonadékokban szabad idegvégződések vannak, de mivel a vizsgálatokat hullából eredő anyagon végeztem, a végződések impregnálását ritkán lehetett sikerültnek mondani. Ennek dacára a kapott képek alapján arra az álláspontra helyezkedtem, hogy az idegrostok a kemoreceptor sejteken végfejecskékben végződnek (Ábrahám 1942, 1964). A végződés mellett foglalt állást F. de Castro (1951), aki úgy találta, hogy az idegrostok a glomerulusokban végződnek éspedig a kemoreceptor sejtek citoplazmájában. Ő a végződéseket meniscusoknak nevezte. Knoche és Schmidt (1963) a nyúl glomus pulmonaléjában azt látta, hogy a vagus eredetű afferens rostok gyűrű alakjában a kemoreceptor sejteken végződnek.

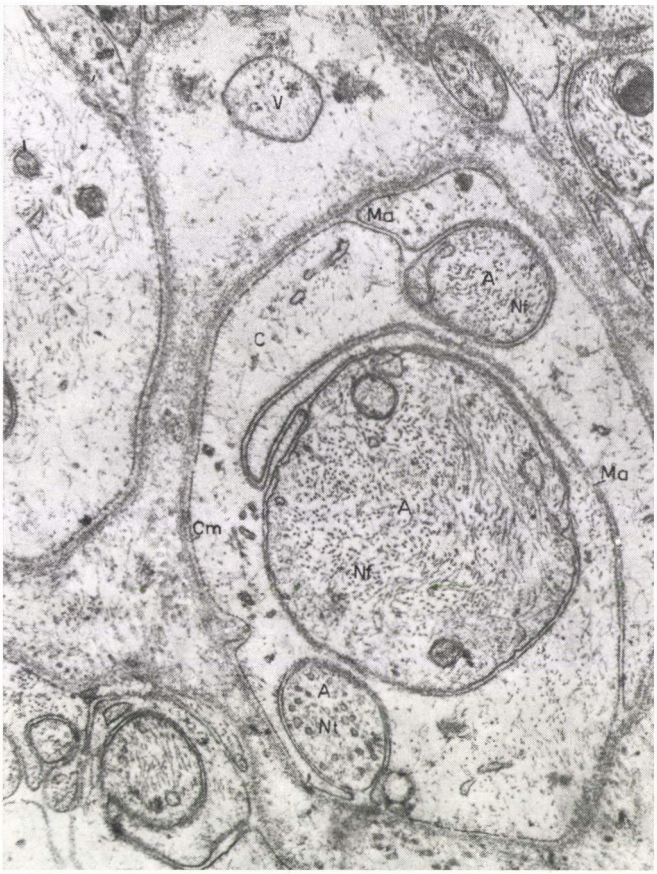
Későbbi vizsgálataim során szép idegképeket szolgáltattak azok az impregnálások, amelyeket saját impregnáló eljárásommal részben hullából eredő, részben operatív úton eltávolított glomus anyagból készült metszeteken végeztem (Ábrahám 1968). Ezeken a metszeteken apró gyűrűk alakjában nagy tömegben tűntek elő az idegvégződések. Ebből azt következtettem és azt később a mikroszkópos képek is igazolták, hogy egy kemoreceptor sejten nemcsak egy, hanem több idegrost is végződik (4. ábra).

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a glomerulusok területén található idegrostok velőtlenek, de a glomerulusok szélén alakuló és kész velőhüvelyes formák is akadnak. A velőtlen rostok Schwann-féle sejtekben húzódnak a kemoreceptor sejtekhez részben ezek felületén, részben a sejtek belsejében.

A Schwann-féle sejtekbe süllyedő mezaxon rendszerek között vannak egyszerűek. Ilyenkor a Schwann-féle sejt citoplazmájában kevés a tengelyfonalak száma. Természetesen az is előfordul, hogy egy Schwann-féle sejtben egyetlen egy axont lehet látni. Ezen ritkán ugyan, de azt is nyomon lehet követni, hogy

a sejtben levő axon körül, hogy alakulnak ki a velőhüvely párhuzamos lemezei. Mivel a citoplazmából kiinduló mezaxonnak a velőhüvellyel való kapcsolata épen maradt, plauzibilisnek látszik az a ma hangoztatott elképzelés, hogy az axon tengelykörüli forgásával rétegzi magára a velőhüvelyt alkotó lemezeket (13. ábra). Nem ritkák azok a Schwann-féle sejtek, amelyekben igen különböző helyzetű és átmérőjű axonok sorakoznak egymás mellé. Ez a helyzet a következő képen, ahol mindössze három mezaxon hártyával körülzárt tengelyfonalat látunk (14. ábra). Egyik, amely a képen felül középen látható rövid mezaxonnal kötődik a citoplazmához. A másik, amely a sejt alsó kihegyesedő részében helyezkedik el, hosszabb mezaxonnal kapcsolódik a citoplazmához. A harmadik a legvastagabb, hosszú mezaxonnal kapcsolódik a Schwann-féle sejt membránjához. A felső axonban tubulusok keresztmetszete, a másik kettőben a neuro-

13. ábra. Homo: glomus caroticum. Schwann sejt. C — citoplazma; N — sejtmag; V — vezikulum; M — mitokondrium; Er — endoplazmatikus retikulum; R — riboszóma; Ma — mezaxon; A — axon; My — velőhüvely. Nagyítás: 56 000 ×



14. ábra. Homo: glomus caroticum. Schwann sejt. C — citoplazma; Cm — citomembrán; Ma — mezaxon; A — axon; V — vezikulum; Nf — neurofilamentum; Nt — neurotubulus. Nagyítás: 96 000 ×

filamentumok hossz- és keresztmetszete látható. Ezzel szemben vannak esetek, amikor a mezaxonok száma egyetlen sejtben eléri a hatot vagy ennél jóval többet. Az egyes fonalakat, rendesen egy-egy különálló mezaxon köti hozzá a sejthártyához. Máskor a Schwann sejtben futó mezaxon elágazik és mind a két új ág egy-egy axont zár magába. Néha a mezaxon rendszerek a szó szoros értelmében keresztül-kasul járják a Schwann-féle sejt testét. Olykor annyira komplikáltak, hogy az egyes mezaxonok útját és kapcsolódási formáit alig lehet nyomon követni, annak dacára, hogy mind a mezaxonok, mind az axon-keresztmetszetek a legélesebb formában tűnnek elő. A komplikált mezaxon rendszerekben, illetőleg az ezeket tartalmazó sejtekben a mitokondriumok keskenyebbek, mint azok, amelyek a glomussejtekben találhatók (15. ábra).

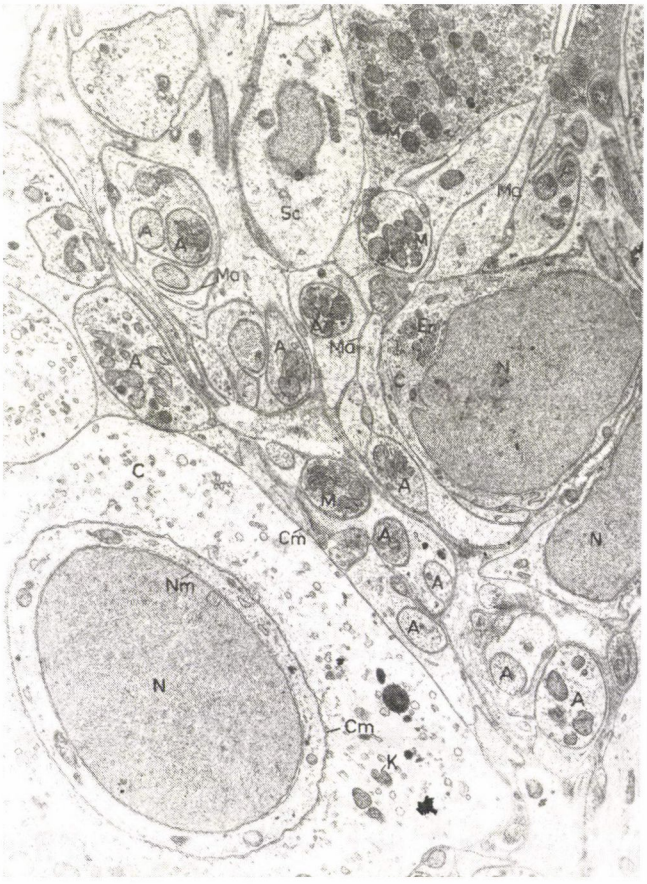
A Schwann-féle sejtekből kilépő idegrostok bensőséges kapcsolatba lépnek a kemoreceptor sejtekkel. Ez a kapcsolat az esetek legnagyobb részében az éle-

sen kirajzolódó kontaktus. Ami a kontaktusok helyét és formáját illeti, állatokon főleg a macskán, patkányon és nyúlon végzett vizsgálatok alapján különböző megállapítások kerültek az irodalomba.

Ross (1959) úgy találta, hogy a kontaktus helyén az axon és a kemoreceptor sejt között az érintkezés semmiféle elváltozást nem hoz létre. Nem halmozódnak fel sem a szinaptikus vezikulumok, sem a mitokondriumok.

Lever, Lewis és Boyd (1959) szerint az axolemma és kemoreceptor sejt sejthártyája között közvetlen az érintkezés. A kettő közötti hézag nem nagyobb mint 300 Å.

Knoche és Schmidt (1963) a glomus pulmonale-ban semmiféle olyan jellegzetességet nem talált, amelynek alapján a pre- és posztszinaptikus szakaszt egymástól élesen el lehetne különíteni.



15. ábra. Homo: glomus caroticum. Schwann sejt. C — citoplazma; Nm — maghártya; A — axon; M — mitokondrium; Ma — mezaxon; N — sejtmag; Cm — citomembrán. Nagyítás: 12 000 ×

DE KOCK és DUNN (1964) a kemoreceptor sejteken a szinaptikus kontaktusnak semmi jelét sem látta. A sejthártyán semmiféle változást nem talált.

BISCOE és STEHBENS (1965) szerint a tengelyfonal és a kemoreceptor sejt közötti viszony arra a szinaptikus kontaktusra emlékeztet, amelyet a központi idegrendszerből ismerünk, amelyről az általánosan elfogadott vélemény az, hogy a kémiai transzmisszió helye és eszköze.

HÖGLUND (1967) a ló és a kutya glomus caroticumán végzett vizsgálatai során úgy találta, hogy az idegrostok és a kemoreceptor sejtek kontaktusban vannak. A kontaktusnak két formáját látta. Az egyikben az idegvégződésekben láthatók a szinaptikus vezikulumok, a neurotubulusok és a mitokondrium csoportok, de a kontaktusban álló kemoreceptor sejtekben nincsenek efféle organellumok. Ezt a kontaktus formát HÖGLUND tipikus szinapszisnak tartja. A másik formában, az a helyzet, hogy az idegrost, amely a kemoreceptor sejt közvetlen szomszédságában halad ismételten szoros kontaktusba kerül a kemoreceptor sejttel anélkül, hogy a kontaktus valamiféle szinaptikus jelleget mutatna. Az érintkezésnek ezt a formáját HÖGLUND „en passant" szinapszisnak tartja.

HESS (1968) úgy találta, hogy az idegrost körülöleli a kemoreceptor sejtet. A szinapszisban láthatók a szinaptikus vezikulumok, a szinaptikus tér és a membrán megvastagodások.

DE KOCK és DUNN (1966, 1968) a kemoreceptor sejteken zsák alakú szinapszisokat, kicsi mezaxonikus idegvégződéseket és komplex membrán rendszerekkel összefüggő végrendszereket talált.

DEARNELEY, FILLENZ és WOODS (1968) szerint a tengelyfonalak kontaktusban állanak a kemoreceptor sejtekkel. A kontaktusokban látszanak a világos vezikulumok és a membrán megvastagodások.

F. DE CASTRO és RUBIO (1968) szintén kontaktust találtak az idegrost axolemmája és a kemoreceptor sejt sejthártyája között. A kontaktusban láttak mitokondriumokat, de valóságos szinapszisokat igen kevés helyen észleltek.

GRIMLEY—GLENNER (1967) az emberi glomus caroticumban olyan szinapszis kapcsolatokat találtak, amelyekben megvoltak a szinaptikus vezikulumok, a mitokondrium csoportok és a membrán megvastagodások. A membrán megvastagodásokból és a szinaptikus hólyagok csoportosulásából arra következtettek, hogy ezekben a szinapszis formában a periféria felé irányuló ingervezetés megy végbe.

KJAERGAARD J. (1973) emberi foetusokon végzett vizsgálatai során a kemoreceptor sejtek között sok idegrostot látott. Ezeknek az axoplazmája halvány, kevés benne a mitokondrium. Az utóbbiak kicsinyek és kerekdedek, jól látszanak a neurotubulusok. Velős rostokat nem talált. Szerinte az idegrostok a kemoreceptor sejtek között vagy a kemoreceptor sejtek és a toksejtek között helyezkednek el, vagy a toksejtekbe vannak beágyazva mezaxonnal. Ott, ahol

a kemoreceptor sejtek és a toksejtek kontaktusban vannak az idegrostokkal, sem az idegrostokon, sem a sejteken semmi jelét nem találta a szinaptikus organizációnak. Nem volt szinaptikus vezikulum akkumuláció, nem voltak specifikus granulumok, bouton alakú idegvégződések és plazmamembrán megvastagodások a kontaktusok helyén.

Donald M., Mc. Donald és Robert Mitchell (1975) átvágták a patkány glomus caroticumához vezető idegeket és a degenerációs folyamatok analízise alapján megállapították, hogy az afferens idegrostok, amelyeket reciprok szinapszisok kapcsolnak a glomussejtekhez, kemoreceptorok, a glomussejtek dopaminerg interneuronok, melyek a kemoreceptor idegvégződések érzékenységét modulálják. Hasonlók Donald M. és Mc. Donald (1977) elgondolásai, amelyek lényegében az előbbi megállapításokra épülnek.

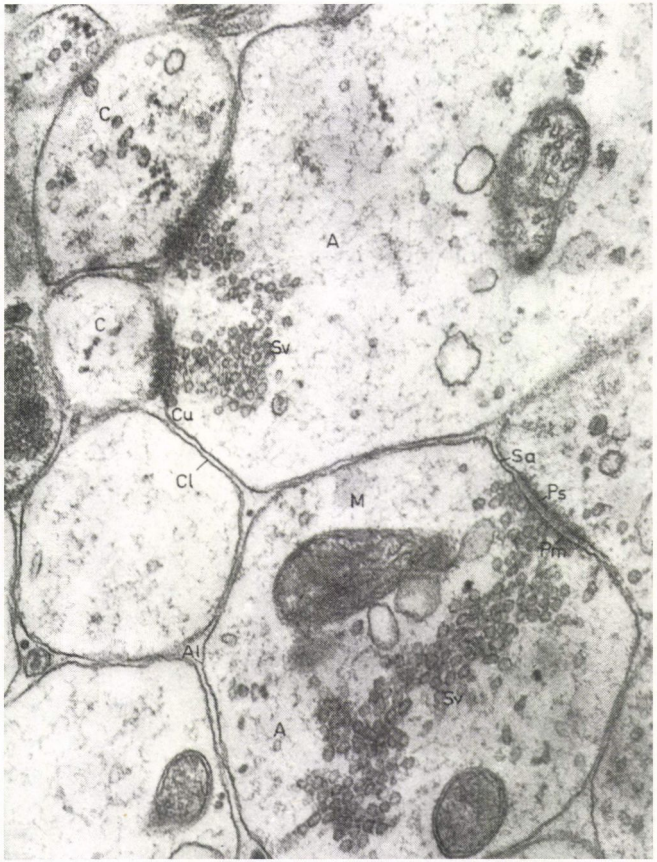
Mi az emberi glomus caroticumban a szinapszisoknak három formáját találtuk. Az egyik a konvencionális szinapszis, a másik a zsákszinapszis, a harmadik a paralel kontaktus.

Konvencionális szinapszisok

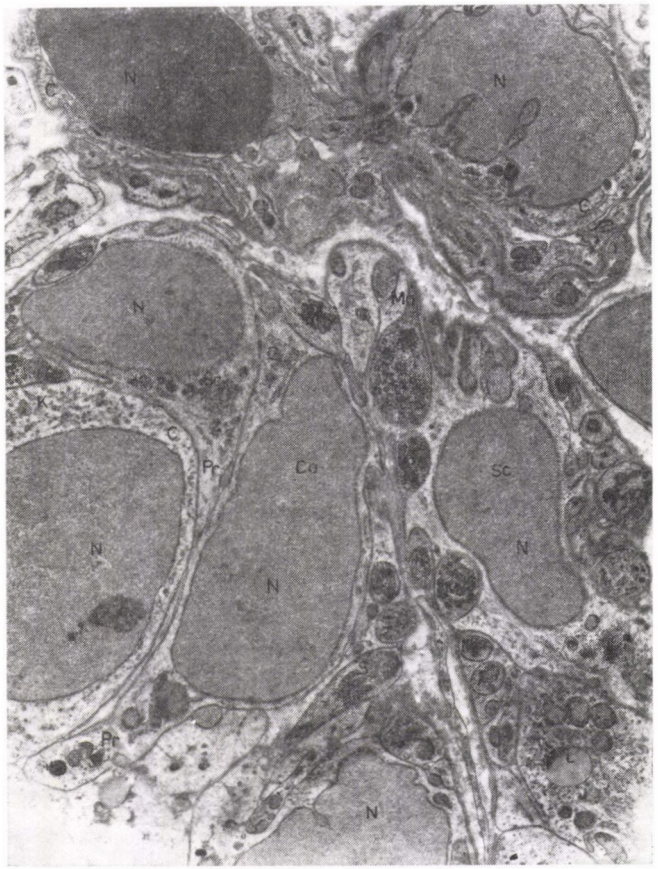
Konvencionális szinapszis névvel illetjük azokat a kontaktus formákat, amelyekben látható az axonvég, amely kontaktusban áll a kemoreceptor sejttel. Az axon terminalisban látszanak a szinaptikus vezikulumok, amelyeknek menynyisége és sűrűsége feltűnően megnő az axonnak ama szakaszán, amely közel áll a végszakaszhoz. Látszanak a szinaptikus membránok és a megvastagodás mind a preszinaptikus, mind a posztszinaptikus membránon. Látható továbbá a szinaptikus tér, amely minden esetben aránylagosan széles. A szinapszisnak ez a formája lehet egyes, amikor csak egy sejttel áll kapcsolatban az axon és kettős, amikor egy axon két sejttel áll kontaktusban (16. ábra). Az ábrán a konvencionális szinapszisnak minden bélyege tökéletesen látható. Különös figyelmet érdemel a cluster, ami amellett szól, hogy itt olyan szinapszisokról van szó, amelyek a periféria felé vezetnek.

Zsákszinapszisok

A szinapszisoknak második formája a zsákszinapszis. Ez a kontaktusforma azoknak a végformációknak felel meg, amelyeket fénymikroszkópos vizsgálataink során láttunk és boutonoknak neveztünk. Ezekben a szinapszisokban az axon terminalis zsákalakúlag kiszélesedő axolemmája kontaktusban áll a kemoreceptor sejt vagy a toksejt sejthártyájával. Ezekben a formákban a preszinaptikus szakaszban nagyon sok a mitokondrium, a szinaptikus vezikulumok aprók és kerekdedek. Jól látszanak a neurofilamentumok (17. ábra).



16. ábra. Homo: glomus caroticum. Konvencionális szinapszis. A — axon; Sv — szinaptikus vezikulum; Cu — cluster; Pm — preszinaptikus membrán; Sa — szinaptikus tér; Ps — posztszinaptikus membrán; C — citoplazma; Al — axolemma; Cl — citolemma. Nagyítás: 68 500 ×



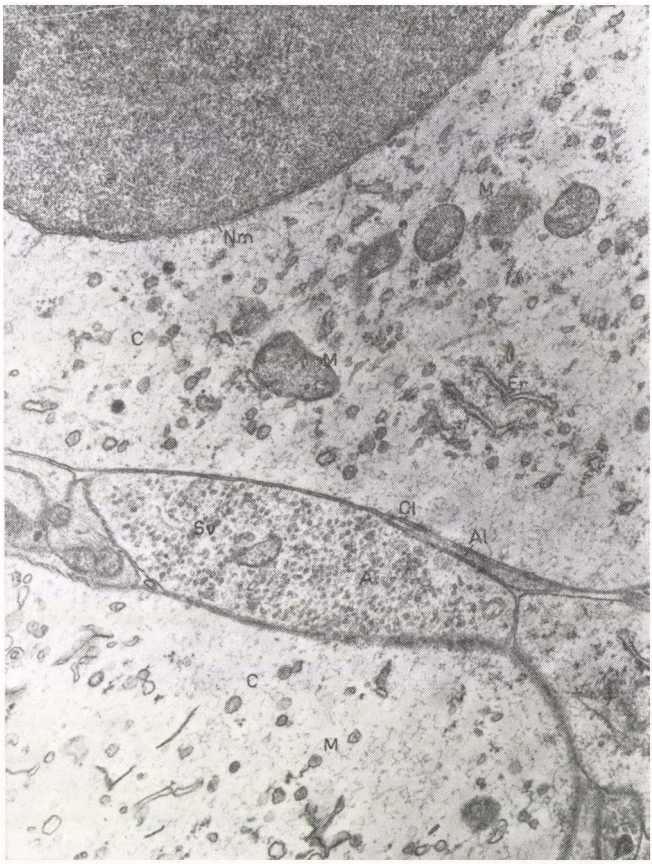
17. ábra. Homo: glomus caroticum. Zsákszinapszis. C — citoplazma; N — sejtmag; A — axon; Ma — mezaxon; M — mitokondrium; Pr — sejtnyúlvány; Ca — toksejt; K — kemoreceptor sejt; Sc — Schwann sejt; G — Golgi-komplexum; L — lipid. Nagyítás: 20 000 ×

Paralel kontaktus

A paralel kontaktus a szinapszisoknak az a formája, amelyben az axolemma és a citolemma hosszabb darabon appozícióba kerül egymással. A posztszinapszisban a mitokondriumok csoportokat alkotnak. A preszinaptikus és posztszinaptikus hártya hosszú darabon fuzionál, a membrán vastagodás kifejezett (18. ábra). Az ábrán egy kemoreceptorsejt részletét látjuk, amellyel két egymástól lényegesen elütő axon van a kontaktusban. Az egyik tele van kerek szinaptikus vezikulumokkal és csak egyetlen mitokondriumot tartalmaz. A másikban szintén sok a szinaptikus vezikulum, de tele van mitokondriumokkal, amelyek teljesen elütnek azoktól, amelyeket kemoreceptor sejtben látunk. A kép azt mutatja, hogy ugyanezt a kemoreceptorsejtet két idegrost idegzi be, de azt sem zárja ki, hogy itt szerkezetileg elütő idegrostról van szó. Érdekesek a mitokondriumok, amelyek között a legkülönbözőbb formákat lehet látni.

A paralel kontaktusoknak egy sajátságos formája az, amikor ugyanaz az axon két kemoreceptorsejttel áll szinaptikus kontaktusban. A két sejttest a köztük levő axonnal tökéletesen egyezik azzal a szerkezettel, amelyet a házikacsa ceromájában levő Grandy-féle testből közöltünk (ÁBRAHÁM 1979). Ott is két érzéksejt között húzódik az axon. Itt az axolemma és a citolemma között

18. ábra. Homo: glomus caroticum. Paralel kontaktus. C — citoplazma; M — mitokondrium; A — axon; Sc — Schwann sejt; Ma — mezaxon; Sv — szinaptikus vezikulum; Mt — membrán megvastagodás; Cl — citolemma; Al — axolemma; Nagyítás: 70 000 ×



19. ábra. Homo: glomus caroticum. Paralel kontaktus. C — citoplazma; Cl — citolemma; A — axon; Al — axolemma; Sv — szinaptikus vezikulum; M — mitokondrium; Er — endoplazmatikus retikulum; N — sejtmag; Nm — maghártya. Nagyítás: 42 000 ×

közvetlen az érintkezés, ott a két membrán között jól kivehető hézag húzódik végig. Az érzéksejtekben itt is, ott is megjelennek az ozmiofil testek. A két struktúra között az egyetlen, de jelentős különbség az, hogy a Grandy axon zsúfolásig tele van mitokondriummal és kevés a szinaptikus vezikulum. Itt nagyon sok a szinaptikus vezikulum és nincs mitokondrium (19. ábra).

Az elmondottak után felvetődik a kérdés, hogy funkcionálisan hogyan kell megítélni az ismertetett szinapszis formákat és van-e lehetőség arra, hogy ezeket a glomus caroticum kísérletileg igazolt működésével összhangba hozzuk. A kérdésekre a következőkben próbálunk választ adni.

A szinapszisoknak ama formái, amelyekben a szinaptikus vezikulumok a preszinaptikus membrán mentén csoportot (cluster) alkotnak, mivel ez az inger haladási irányát jelzi, a periféria felé vezetnek, tehát efferens szinapszisok (Ábrahám 1969, 1969/70). Azoknak a szinapszis formáknak egy része, amelyeket

BISCOE és STEHBENS (1966) a macskából, HÖGLUND (1967) a lóból és a kutyából, GRIMLEY és GLENNER (1967) az emberből közöltek, szintén ilyen irányú ingervezetésre utalnak. De ha ezek a mind állati, mind emberi anyagon megtalált szinapszis formák, efferens szinapszisok, pedig a szerkezetük alapján mások nem lehetnek, akkor arra a kérdésre kell választ adnunk, hogy a szerkezetükből ítélve, milyen funkció szolgálatában állanak. A kérdést BISCOE és STEHBENS (1966), úgyszintén GRIMLEY és GLENNER (1967) is felvetették, de az elfogadható válasszal adósok maradtak. Mi egyebeken kívül előbb is arra gondoltunk, hogy ezek a szinapszis formák a kemoreceptorsejtek működésének a moduláló készülékei (ÁBRAHÁM 1969/70). Erre gondolunk most is, mert jelenleg sem találunk más magyarázatot ennek az emberi glomus caroticumban aránylagosan ritkán található struktúrának az értelmezésére.

Azok a szinapszis formák, amelyeknél a központi idegrendszerből ismert szinapszisok általánosan ismert bélyegei hiányoznak szerkezetükből és nagy számukból ítélve afferens szinapszisok. Ezek azokra a szinapszis formákra emlékeztetnek, amelyeket az ízlelő szervekből a vesztibuláris hámból és az idegvégtestekből ismerünk. Ezekben hiányoznak a vezikuláris szerkezetek, illetőleg ha jelen vannak kérdéses, hogy lehet-e szinaptikus vezikulumoknak tartani. Ezeket a szinapszis formákat elektrotonikus szinapszisoknak (efapsis) tartják (ECCLES 1965).

Megbeszélés

Alig van az állati és az emberi szervezetnek olyan szerve, amelynek szerkezetéről és működéséről olyan kevés általánosan elfogadható megállapítás állana rendelkezésünkre, mint a glomus caroticum. A fénymikroszkóppal kapott képeket az elektronmikroszkóp megnagyította, apróra bontotta, és az alkotó elemekbe hasznosítható betekintést nyújtott. Azonban a struktúrára és a funkcióra vonatkozólag még az olyan részletes és minden fontos kérdésre kiterjedő experimentális és hisztokémiai vizsgálatok sem adnak elfogadható magyarázatot, amilyenek DONALD M., Mc. DONALD és Robert MITCHELLnek (1975) a patkány glomus caroticumán végzett vizsgálatai. Természetesen ugyanezt kell mondanom azokra a vizsgálatokra is, amelyekben az elgondolások és hipotézisek az előbbiben megbeszélt morfológiai alapokra támaszkodnak (DONALD M., Mc. DONALD 1977). Mivel ebben a két dolgozatban és KJAERGAARD J. (1973) nagy összehasonlító dolgozatában az egész mai irodalom méltatásra került, az alábbiakban csak néhány olyan megállapításra reflektálok, amelyeket készítményeim és felvételeim alapján elfogadhatatlanoknak vagy erősen vitathatóknak tartok. Amikor erre vállalkozom akkor azt is meg kell mondanom, hogy a ma erősen használatos experimentális vizsgálatokat nem tartom meggyőzőknek, mert ezek alapján nem vagy csak megközelítőleg lehet választ adni

azokra a kérdésekre, amelyeket a szerveknek és szöveteknek szoktunk feladni, azért, hogy bizonyos kérdésekre választ, illetőleg magyarázatot kapjunk. Az, amit szöveteltávolítások, idegátvágások után fellépő jelenségek és megfigyelések révén kapunk, csak védekezés a kísérleti állat részéről, kényszer szülte valami, aminek a normális viszonyokhoz vajmi kevés a köze. Az eltávolított, megcsonkított vagy megnyomorított szerkezet válasza, valami olyan féle mint a nagyot halló embernek a válasza a hozzá intézett kérdésre.

A fentiek előrebocsátása után szólani szeretnék a kemoreceptor sejtről, továbbá erről mint érzéksejtről és mint interneuronról. Ezután az efferens szinapszissal és reciprok szinapszissal kapcsolatos megjegyzéseimet szándékozom közölni.

Kemoreceptor sejt. Mivel a glomus caroticumot együtt alkotják a kemoreceptor sejtek és a toksejtek magam a glomussejt elnevezést a két sejtféleség együttes megnevezésére tartom használandónak. Ezért továbbra is a kemoreceptor sejt szó és a toksejt szó használata mellett maradok. A kemoreceptor sejtek között nem látok típusokat, annyit azonban meg kell mondanom, hogy az emberi glomus caroticumban vannak olyan kemoreceptor sejtek, amelyek tele vannak ozmiofil testekkel és viszont elég nagy számban vannak olyanok, amelyekben kevés az ozmiofil test, sőt olyanok is akadnak, amelyekben alig van vagy egyáltalán nincs ozmiofil test.

Magam a látottak alapján még arra sem mernék vállalkozni, hogy az ozmiofil testek nagyságában mutatkozó különbözőség alapján akárcsak két kemoreceptor sejttípust próbáljak elkülöníteni. Azt inkább keresztülvihetőnek tartanám, hogy a toksejteket soroljam típusokba, kettőbe, vagy akár többe is, mert ezeknél látok egy-két olyan morfológiai bélyeget, amelyek alapján a csoportosítást el tudnám végezni. De mivel az általános felfogás szerint és erre utal a szerkezet és a helyzet is, a toksejtek, a kemoreceptorsejtek támasztékai és lehet, hogy táplálói, ennélfogva az ingertermelésben, ingerfelfogásban és továbbításban nem vesznek részt. A különbözőségekkel nem foglalkozom. Annyit azonban meg kell mondanom, hogy a toksejteknek, a gliasejtekkel való összehasonlítását nem tartom szerencsésnek, mert a gliasejtek sok hosszú nyúlvánnyal bíró testek, amelyek teljesen beburkolják az idegsejteket és az idegrostokat. Különleges ismertető jelük pedig az, hogy tele vannak glikogén granulumokkal. Ezekre pedig a glomus caroticumban a kapott képek vizsgálata alapján gondolni sem lehet.

A kemoreceptor sejt érzéksejt. Nagyon régi, annak idején megalapozott és bizonyított felfogás, hogy a kemoreceptor sejtek érzéksejtek, amelyek a vér gáztartalmának a változásáról tudósítják a magasabb rendű agyközpontokat. A kemoreceptor sejteknek ebbeli tevékenységét igazolják J. F. és C. Heymans (1927) experimentális vizsgálatai és az idegátvágások, amelyeket F. de Castro (1928) végzett. Ezt igazolják elsősorban azok a bensőséges és gazdag vérellátást biztosító különleges berendezkedések, amelyek a kemoreceptor sejteknek a vér-

rel kapcsolatos szerepét különösen világossá teszik. Ugyanis az emberi kemoreceptor sejtek között olyan hajszálér és szinusz rendszer terül el, amelyhez foghatót más emberi szervben sehol sem lehet találni. Ez amellett szól, hogy a véráramlás változása, illetőleg a vérmennyiségnek a változtatása a gondolat gyorsaságával következhetik be, ha ezt a szervezet összessége megköveteli. Alig a látás határán levő vékony csövecskék szakaszonként terjedelmes hordószerű képződményekbe mennek át, amelyek a vér raktározására, esetleg adagolására szolgálhatnak (10. ábra).

A kemoreceptor sejt érzéksejt volta mellett tanúskodnak az ozmiofil testek, ahogy ugyanezek szólnak amellett is, hogy a Grandry-féle testekben az idegrost két oldalán elhelyezkedő sejteket, és a Merkell-féle sejteket érzéksejteknek kell tartanunk (ÁBRAHÁM 1974). Mindezekhez járul a rendkívüli idegrostgazdagság, amely jellemzi a glomus caroticum glomerulusait. Ezzel kapcsolatban nagyon szeretném hangsúlyozni azt, hogy sok gerinces állat glomus caroticumának és az ember hasonló szervének az impregnálása során úgy tapasztaltam, hogy egyetlen olyan emlős állat sincs, amely ideggazdagságban megközelítené az ember glomus caroticumát. Ennek mint minden morfológiai különbözőségnek meg kell, hogy legyen a fiziológiai alapja. Ezért a kemoreceptor sejteket érzéksejteknek kell tartanunk, akkor is, ha feltételezzük, hogy az érzéklésen kívül más funkciót is végezhetnek.

A kemoreceptor sejtek interneuronok. Meg kell mondanom, hogy azzal az elgondolással, illetőleg felfogással, hogy a kemoreceptor sejteket idegsejteknek kell tekinteni, nem tudok egyetérteni. A kemoreceptor sejt nem neuron, és így természetesen nem interneuron. Én egyetlen olyan morfológiai bélyeget sem látok, amelynek alapján a kemoreceptor sejtet neuronnak lehetne, illetőleg kellene nevezni. Mielőtt azonban a neuron jellemző bélyegeiről néhányat szóvá tennék, azt is meg kell mondanom, hogy az elmúlt 27 esztendő alatt igen sok glomus caroticum metszetet impregnáltam, mind az emberi, mind az állati anyagból (kecskebéka, galamb, kutya, patkány, sertés, szarvasmarha, ló), de ezeken eddig még egyet sem találtam olyat, amelynek nyúlványa lett volna (1. ábra). Nemigen tudom elképzelni, hogy a nyúlvány, illetőleg a nyúlványok ha volnának ilyenek, miért ne volnának impregnálhatók és mért ne impregnálódtak volna, ha a kemoreceptor sejtek neuronok. Nagyon különlegesnek és, hogy enyhe kifejezéssel éljek, szokatlannak tartanám azt, hogy akkor, amikor az idegrostok az esetek legnagyobb részében a legélesebb formában tűnnek elő a készítményeken, a nyúlvány, amelyet ma dendrit néven emlegetnek, impregnálás nélkül maradjon. Ezért legnagyobb határozottsággal meg kell mondanom, hogy nem láttam olyan kemoreceptor sejtet, amelynek dendritje lett volna. A dendrit magas fejlettségű sejtnyúlvány, amely a filogenezis folyamán csak később jelenik meg, és ágrendszerének a sokasodásával követi azt az utat, amelyen az állati szervezet haladt a tökéletesedés felé vezető úton. Karakterisztikumai közé tartozik az, hogy a sejtből széles alap-

pal lép ki, egy ideig oldalágak nélkül húzódik tovább, majd faalakúlag elágazik, ahogy ez görög eredetű nevében is (dendron) kifejezésre jut. Az ágakon különösen a vékonyabbakon gyakoriak a várixok és a tüskék, amely utóbbiak szinaptikusan kapcsolódnak hozzá a más neuronokhoz. Az axoplazmában vastagok és élesen szembetűnnek a neurotubulusok, a várixokban csoportokba rendeződnek a mitokondriumok. Mindezek a bélyegek hiányoznak a kemoreceptor sejteken. Valaki azt mondhatná, hogy azért nem láttam a kemoreceptor sejt dendritjét, mert nem impregnálódott. Ha az ember látja azt a rengeteg idegrostot, amely egyetlen emberi glomerulus körül és magában a glomerulusban impregnálás után előtűnik, érthetetlennek tartja az ellenvetést. Azonban mivel az idegrendszer impregnálása egyike a legnehezebb mikrotechnikai feladatoknak, mindenkinek jogában áll az efféle kérdés felvetése. Azt azonban lehetetlenségnek tartom, hogy elektronmikroszkóp alatt a sok felvételen ne találkoztunk volna egy-egy dendrit kereszt- vagy hosszmetszettel, abban a neurotubulusokkal és a várixokban csoportosuló mitokondriumokkal. Kizártnak tartom, hogy ezek vagy ezek közül legalább egy vagy kettő ne jelentkezett volna azon a rengeteg felvételen, amelyek világszerte készültek és készülnek a különböző állatfajok és az ember glomus caroticumából. De nem lehet neuronnak tartani a kemoreceptor sejtet, azért sem, mert ennek más a magva, mint a neuronoknak. A neuron magva annyira specifikus és karakterisztikus, hogy az idegsejtet a magról fel lehet ismerni és minden más szöveti sejttől biztosan meg lehet különböztetni. A neuron magva kerek, kromatinja csomócskázott és nagyobb tömegben közvetlenül a maghártya alatt helyezkedik el. A kromatinnak a jellegzetességét a tigroid szemecskék, illetőleg ezeknek a csoportosulása szolgáltatja.

Efferens szinapszisok. Arról, hogy a receptorokban az afferens szinapszisok mellett efferens szinapszisok vannak, már többen megemlékeztek. Azok közül, akik ilyen vonatkozásban úttörő munkát végeztek, SMITH (1956), FLOCK, KIMURA, LUNDQUIST és WERSÄLL (1962), SMITH és RASMUSSEN (1965) nevét kell megemlítenünk. Az Ő munkásságuk nyomán vált ismeretessé, hogy a magasabb rendű emlősök vesztibuláris hámjában két különböző típusú érzősejt helyezkedik el. Ezek közül egyiket első, a másikat második típusú szőrsejt névvel illették. Ezt a megállapítást követte annak a kiderítése, hogy az első típusú szőrsejteket szinte teljesen körülveszi a centripetális idegrost, a gyéren granulált helix, a második típusú szőrsejtek pedig két különböző szerkezetű, egymástól jól elütő idegvégződéssel vannak ellátva. Az egyik szórványosan granulált és az érzősejt plazma membránjával szinaptikus kontaktusban áll. Szerkezetéből ítélve posztszinaptikus. A másik végződés, amely kisebb számban jelentkezik, kör alakú és sűrűn granulált (ENGSTRÖM, ADES, HAWKINS 1965). A végződés kontaktusban áll az érzéksejt felületével és az érintkezési területen mind a plazma membránon, mind az axolemmán distinkt megvastagodás látható. Ezt a szinapszis formát efferensnek minősítik. Hogy az emlősök vesztibuláris hámja kettős beidegzés alatt áll, azt JURATÓ (1962) igazolta be, aki azt tapasztal-

ta, hogy az olivocochlearis nyaláb átvágása után a cochlearis receptorokban a szinaptikus elemek degenerálódnak.

Hasonló problémával foglalkozott HAMA (1969), aki az aranykárász (*Carassius auratus*) halló foltján (macula acustica) végzett vizsgálatai során a receptorsejtek közötti idegkapcsolódásnak és az idegvégződéseknek két formáját találta. Az egyikben mind az idegvégződés, mind a receptorsejt membránjának az elektron denzitása felfokozott. Főleg az axolemmán halmozódik fel nagyobb mennyiségben az elektron dense anyag. A szinaptikus vezikulumok a receptor sejtekben vannak felhalmozva.

A második kapcsolódási formában sem a receptor plazmahártyáján, sem az axolemmán nincsenek olyan specializációk, amilyenek a szinapszisokra általában jellemzők. Az idegvégződés tele van szinaptikus vezikulumokkal, amelyek közül egyesek az interszinaptikus tér felé nyitva vannak. A szinaptikus vezikulumok között kis számmal ugyan, de dense core vezikulumok is vannak.

Ami a két szinapszis formának a működését illeti, HAMAnak a következő, nézetünk szerint helyes elgondolásai vannak. Az első szinapszis forma, ahol a szinaptikus vezikulumcsoportok a receptor sejtben vannak és a vastagodás szembetűnőbb az idegvégződés oldalán mint a receptor sejt oldalán, afferens szinapszis, amelyben az inger a receptor sejtből tevődik át az idegvégződésre. A második szinapszis formában a vezikulum csoportok az idegvégződésben helyezkednek el, következésképpen az ingerátvitel útja az idegvégződésről vezet az érzéksejt plazmájába. Ezért a kontaktus efferens szinapszisnak minősül. Működés tekintetében inhibitornak tartható.

ANDERSEN és NAFSTAD (1968), NAFSTAD és ANDERSEN (1970) a Herbst-féle testben két idegrostot látott. Egyik a centrális helyzetű afferens rost, a másikat a belső bunkó lemezrendszerében találták és efferens rostnak minősítették. A Pacini-féle testben a helyzetet ugyanilyennek találta CHOUCHKOV (1971), aki szintén afferens és efferens rostokról beszél. Ő az efferens rostot a külső és belső tok között találta.

Reciprok szinapszis. Nem tudok egyetérteni a szerzőknek azon állításával, hogy a kemoreceptor sejtek egymással és az afferens szinapszisokkal reciprok szinapszisban vannak (DONALD M., Mc. DONALD és Robert MITCHELL 1973). Ha ez így volna, akkor ennek az egymással érintkező kemoreceptorok membránjain és a citoplazmában nyomának kellene lennie. Magam membrán megvastagodást egyetlen esetben láttam, és ezt az axolemma és a kemoreceptor sejt közös membránján találtam, ahol a két membrán összeolvadt, illetőleg junkcióba került, de itt megvan az idegrost, benne a vezikulumok és mitokondriumok (18. ábra). Ezzel szemben a kemoreceptor sejtek között, ahol a szerzők reciprok szinapszisról beszélnek semmiféle szinaptikus bélyeget nem találtam. Ha pedig a két citolemma puszta érintkezését szinapszisnak tartjuk, akkor az érintkező kemoreceptor sejtek között mindenütt szinapszist kell feltételeznünk.

IRODALOM

ADAMS, W. E.: The comparative morphology of the carotid body and carotid sinus. Thomas. Springfield, Illinois (1958).

ANDERSCH, C. A.: Tractatio anatomico-physiologica de nervis humani corporis aliquibus, quam edidit Ernst. Philipp. Andersch, Pars II. Dissertationis inauguralis. Regiomonti: A. Fasch p. 132 (1797).

ARNOLD, J.: Ueber die Structur des Ganglion intercaroticum. Virchows Arch. Path. Anat. **33,** 190—209 (1865).

ÁBRAHÁM, A.: Über das Nervensystem des glomus caroticum bei Menschen Acta. Zool. Univ. Szeged **1,** 1—50 (1942).

ÁBRAHÁM, A.: Beiträge zür Kenntnis der Interoreceptoren im Bereiche der cardiovaskulären Systems. Acta Universitatis Szegediensis (Acta biologica) **4,** 179—202 (1958).

ÁBRAHÁM, A.: Die mikroskopische Innervation des Herzens und der Blutgefässe von Vertebraten. Akadémiai Kiadó, Budapest (1964).

ÁBRAHÁM, A.: Electron microskopic investigation on the human carotid body (preliminary communication) Z. mikr.-anat. Forsch. **79,** 309—315 Leipzig (1968).

ÁBRAHÁM, A.: Species characteristics in the structure of the nervous system in the carotid body R. W. Torrance: Arterial chemoreceptors. Oxford et Edinburgh: Blackwell. p. 57—62 (1968).

ÁBRAHÁM, A.: Microscopic Innervation of the heart and blood vessels in Vertebrates including Man. Akadémiai Kiadó and Pergamon Press. Budapest — Oxford (1969).

ÁBRAHÁM, A.: Elektronmikroskopische Untersuchungen an menschlichen Karotis Körpern. Z. mikr.-anat. Forsch **81,** 413—452 (1969).

ÁBRAHÁM, A.: Electron microscopic observation on the medial neurosecretory cells in the brain of the water beetle (Dytiscus marginalis) Zschr. mikr.;anat. Forsch **80,** 469—484 Leipzig (1969).

ÁBRAHÁM, A.: Ultrastructural investigations on human carotid bodies Acta. Biol. Univ. Szeged **16,** 97—113 (1970).

ÁBRAHÁM, A.: Recherches ultrastructurales sur les terminaisons nerveuses du «Corpuscule carotidien» humain. 54 Congrès (Sofia, 30 mars- 3 avril 1969) Bulletin de l'Assotiation des Anatomistes Paris **146,** 393—400 (1970).

ÁBRAHÁM, A.: Structure of synapses in the Supraoesophageal Ganglion of the Water Beetle (Dytiscus marginalis) Z. mikr.-anat. Forsch. Leipzig **99,** 226—238 (1976).

ÁBRAHÁM, A.: Ultrastrukturelle Untersuchungen an der Wachshaut von Enten unter besonderer Berücksichtigung der Grandrischen und Herbstschen Körper. Z. mikr.-anat. Forsch. Leipzig **92,** 81—118 (1978).

BISCOE, T. J. et W. E. STEHBENS: Electron microscopic observations on the carotid body. Nature (Lond.) **208,** 708—709 (1965).

BISCOE, T. J. and W. E. STEHBENS: Ultrastructure of the carotid body. J. Cell. Biol. **30,** 563—578 (1966).

BISCOE, T. J. and W. E. STEHBENS: Ultrastructure of the denervated carotid body. Quart. J. exp. Physiol. **52,** 31—36 (1967).

BISCOE, T. J., A. LALL et S. R. SAMPSON: Electron microscopic and electrophysiological studies on the carotid body following intracranial section of the glossopharyngeal nerve. J. Physiol. (Lond.) **208,** 133—152 (1970).

BOYD, J. D.: Observations on the human carotid sinus and its nerve supply. Anat. Anz. **84,** 386—399 (1937).

de CASTRO, F.: Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome de nerf glossopharyngien. Trab. Inst. Cajal Invest. Biol. **24,** 365—432 (1926).

de CASTRO, F.: Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères. Nouveau faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. Études anatomiques et physiologiques. Trab. Inst. Cajal Invest. biol. **25,** 331—380 (1928).

de CASTRO, F.: Nuevas observaciones sobre la innervacion de la region carotidea. Los quimos y pressoreceptores Trab. Inst. Cajal. Invest. biol. Univ. Madrid. **32,** 297—384 (1940).

de CASTRO, F.: Sur la structure de la synapse dans le chemorecepteurs: leur mecanisme de éxcitation et role dans la circulacion sanguine locale. Acta Physiol. Scand. **22,** 14—43 (1951).

de CASTRO, F. and M. RUBIO: The anatomy and innervation of the blood vessels of the carotid body and the role of chemoreceptive reactions in the autoregulation of the blood flow. R. W. Torrance: Arterial Chemoreceptors. Oxford and Edinburgh: Blackwell 267—276 (1968).

DEARNALEY, D. P., M. FILLENZ and R. I. WOOD: The identification of dopamine in the carotid body of the rabbit; in "The Proceedings of the Wates Foundation Symposium on Arterial Chemoreceptors" ed R. W. Torrance, Oxford (Edinburgh: Blackwell Sci. Publ.) (1968).

DONALD, M., Mc. DONALD and ROBERT A. MITCHELL: The innervation glomus cells. ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative ultrastructural analysis. Journal of Neurocytology **4,** 177—230 (1975).

DONALD M., Mc. DONALD: Role of glomus cells as dopaminerg interneurons in the chemoreceptive function of the carotid body. Adv. Biochem. Psychopharmacology, 16. New York: Costa and G. L. Gessa, Raven Press (1977).

ECCLES, J. C.: Presynaptic inhibition in the central nervous system. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **26,** 163—180 (1965).

ENGSTRÖM, H., C. A. HAMBERGER, H. HOLMER and N. S. RIGNELL: The carotid body. Acta otolaryng. (Stockh.) **48,** 379—389 (1957).

ENGSTRÖM, H., and J. WERSÄLL: The ultrastructural organisation of the organ Corti and of the vestibular sensory epithelia. Exp. Cell. Res. Suppl. **5,** 460 (1958).

ENGSTRÖM, H.: On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. Acta otolaryng. **49,** 109 (1958).

ENGSTRÖM, H.: The innervation of the vestibular sensory cells. Acta oto-laryng. Suppl. **163,** 30 (1961).

ENGSTRÖM, H., H. W. J. E. ADES and J. R. HAWKINS: The vestibular sensory cells and their innervation. Modern Trends in Neuromorphology. Budapest Symposia Biologica Hungarica. **5,** 21—41 (1965).

EYZAGUIRRE, C., H. KOYANO and J. R. TAYLOR: Presence of acetylcholine and transmitter release from carotid body chemoreceptors. J. Physiol. (Lond.) **178,** 463—476 (1965).

EYZAGUIRRE, C. et P. ZAPATA: Transmission chimique de l'excitation au niveau des chemorecepteurs carotidiens. Actualités neurophysiol. **8,** 73—88 (1968).

EYZAGUIRRE, C., and P. ZAPATA: A discussion of possible transmitter or generator substances in carotid body chemoreceptors; in "The Proceedings of the Water Foundation Symposium on Arterial Chemoreceptors" ed. R. W. Torrance, Oxford (Edinburgh: Blackwell Sci. Publ.) (1968).

FLOCK, A., R. KIMURA, P. G. LUNDQUIST and J. WERSÄLL: Morphological basis of directional sensitivity of the outer hair cells in the organ of Corti. J. acoust. Soc. Amer. **34,** 1351 (1962).

FUCHS, E.: Zur chirurgischen Behandlung des Bronchial. Asthma. Med. Welt. **14,** 665—669 (1965).

GANZ, P.: Die Extirpation des Glomus caroticum zur Behandlung des Asthma bronchiale. Med. Welt. **14,** 669—675 (1965).

GARNER, C. M. and D. DUNCAN: Observations on the fine structure of the carotid body. Anat. Rec. **130,** 691—709 (1958).

GRAY, K. G. and K. G. WATKINS: Electron microscopy of taste buds of the rat. Z. Zellforsch. **66,** 593—595 (1965).

GREEN, M. A.: Observations on glomectomised asthmatic patiens. Ann. Allergy. **23,** 213—217 (1965).

GRIMLEY, P. M. and G. G. GLENNER: Histology and ultrastructure of carotid body paragangliomas. Comparison with the normal gland. Cancer (Philad.) **20,** 1473—1488 (1967).

GRIMLEY, P. M. and G. G. GLENNER: Ultrastructure of the human carotid body. A perspective on the mode of chemoreception. Circulation **37,** 648—665 (1968).

HALLER, A. von.: Cerebrum. Nervi. Musculi, Tomus quartus. Elementa physiologia corporis humani. Lausanne: Grasset. p. 256 (1762).

HAMA, K.: A study on the fine structure on teh saccular macula of the gold fish. Z. Zellforsch. **94,** 155—174 (1969).

HESS, A.: Electron microscopic observations of normal and experimental cat carotid bodies. R. W. Torrance: Arterial Chemoreceptors. Oxford and Edinburgh: Blackwell p. 51—54 (1968).

HEYMANS, C. and J. J. BOUCKAERT: Dissociation des deux sensibilitér réflexogénes de la bifurcation carotidienne: Sensibilité chimique et sensibilité à la pression. C. R. Soc. Biol. (Paris) **112,** 1240—1243 (1933).

HEYMANS, C. and E. NEIL: Reflexogenic areas of the cardiovascular system. London: Churchill. Lt. (1958).

HOLLINSHEAD, W. H.: The origin of the nerve fibers to the glomus aorticum of the cat. J. comp. Neurol. **71,** 417—426 (1939).

HOLLINSHEAD, W. H.: Chromaffin tissue and paraganglia. Quart. Rev. Biol. **15,** 156—171 (1940).
HOLLINSHEAD, W. H.: A comparative study of the glomus coccygeum and the carotid body. Anat. Rec. **84,** 1—16 (1942).
HOLLINSHEAD, W. H.: A cytological study of the carotid body of the cat. Am. J. Anat. **73,** 185—213 (1943).
HOLLINSHEAD, W. H.: Effects of anoxia upon carotid body Morphology. Anat. Rec. **92,** 255—261 (1945).
HÖGLUND, R.: An ultrastructural study of the carotid body of horse and dog. Z. Zellforsch. **76,** 568—576 (1967).
HRISTÓ NIKOLOV CHOUCHKOV: Ultrastructure of Pacinian Corpuscles in Man and Cats. Z. Mikr.-anat. Forsch. **83,** 17—32 (1971).
ITO, T.: On the origin of the carotid body in the rabbit. Okajimas Folia anat. jap. **23,** 117—130 (1950).
JOELS, N. and E. NEIL: The idea of a sensory transmitter; in "The Proceedings of the Wates Foundation Symposium on Arterial Chemoreceptors" ed. R. W. Torrance. Oxford (Edinburgh: Blackwell Sci. Publ.) (1968).
JURATO, S.: Efferent fibres to the sensory cells of Cortis organ. Exp. Cell. Res. **27,** 162—164 (1962).
KJAERGAARD JOHAN: Anatomy of the Carotid Glomus and Carotid Glomus like Bodies (Non Chromaffin Paraganglia) With elektron Microscopy and Comparison of Human Foetal Carotid Aorticopulmonary Subclavian, Tympanojugular, and Vagal Glomera F.A.D.L's Forlag 1973. Copenhagen. Arhus. Odense.
KIMURA, R. and J. WERSÄLL: Termination of the olivocochlear bundle in relation to the outer Hair cells of the organ of Corti in Guniea pig. Acta oto-laryng. **55,** 11—32 (1962).
KNOCHE, H.: Beiträge zur Kenntnis der Gefäßversorgung der aortico-pulmonalen Glomera. Z. mikr.-anat. Forsch. **74,** 283—295 (1966).
KOBAYASHI, S.: Fine structure of the carotid body of the dog. Arch. Histol. jap. **30,** 95—120 (1968).
KOBAYASHI, S. and M. UEHARA: Occurrence of afferent synaptic complexes in the carotid body of the mouse. Arch. histol. jap. **32,** 193—201 (1970).
de KOCK, LIL L.: The intra-glomerular tissues of the carotid body. Acta anat. (Basel) **21,** 101—116 (1954).
de KOCK, LIL L.: The carotid body system of the higher vertebrates. Acta anat. (Basel) **37,** 265—279 (1959).
de KOCK, LIL L. and A. E. G. DUNN: Ultrastructure of carotid body tissue as seen in serial sections. Nature (Lond.) **202,** 821—822 (1964).
de KOCK, LIL L. and A. E. G. DUNN: An electron microskopic study of the carotid body. Acta anat. (Basel) **64,** 163—178 (1966).
de KOCK, LIL L. and A. E. G. DUNN: Electron microscopic investigation of the nerve-endings in carotid body: in "The Proceedings of the Wates Foundation Symposium on Arterial Chemoreceptors" ed. R. W. Torrance. Oxford (Edinburg: Blackwell Sci. Publ.) (1968).
KOHN, A.: Über den Bau und die Entwicklung der sog. Carotis drüse. Arch. mikr.-anat. **56,** 81—148 (1900).
LEVER, J. D. et J. D. BOYD: Osmiophile granules in the glomus cells of the rabbit carotid body. Nature (Lond.) **179,** 1082—1083 (1957).
LEVER, J. D., P. R. LEWIS et J. D. BOYD: Observations on the fine structure and histochemistry of the carotid body in the cat and rabbit. J. Anat. (Lond.) **93,** 478—490 (1959).
LUSCHKA, H.: Ueber die drüsenartige Natur des sogenannten Ganglion intercaroticum. Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenshaftliche Medicin 405—414 (1862).
MARCHAND, F.: Beiträge zur Kenntnis der normalen und pathologischen Anatomie der Glandula carotica und der Nebennieren. Internatinale Beiträge zur wissenschaftlichen Medicin **1,** 536—581 (1891).
MEIJLING, H. A.: Bau und Innervation von Glomus caroticum und Sinus caroticus. Eine Untersuchung unter Benutzung spezifischer Nervenfärbungsmethoden. Acta neerl. Morph. **1,** 193—288 (1938).
MURATORI, G.: Conbributo istologico all'innervacione della zona arteriosa glomo carotidea. Arch. ital. Anat. Embriol. **33,** 421—442 (1933).
MURATORI, G.: Contributi morfologici allo studio dei recettori aortico-arteriosi dei riflessi cardipressoregolatori. Arch. ital. Anat. Embriol. **38,** 387—427 (1937).
NAFSTAD, P. H. et A. E. ANDERSON: Ultrastructural investigation of the innervation of the Herbst corpuscle. Z. Zellforsch. Mikr.-anat. **103,** 109—114 (1970).

NAKAYAMA, K.: Die Chirurgie des Glomus caroticum bei Asthma bronchiale. Münch. Med. Wschr. **103,** 181—185 (1961).
NAKAYAMA, K.: Surgical removal of the carotid body for bronchial asthma. Dis. Chest **40,** 595—604 (1961).
NEIL, E.: Chemoreceptor areas and chemoreceptor circulatory reflexes. Acta physiol. scand. **22,** 54—65 (1951).
NIEDERMÜLLER, F. und W. WILTNER: Zur Indikationsstellung der Glomektomie bei Asthma bronchiale. Autorreferate der Vorträge zum Allergiekongreß 18—20. Juni, Dresden (1965).
NIEMI, M. and K. OJALA: Cytochemical demonstration of catecholamines in the human carotid body. Nature **203,** 539—540 (1964).
PALKAMA, A.: Histochemistry and electron microscopy of the carotid body. Ann. Med. exp. Fenn. **43,** 260—266 (1965).
PEASÉ, D. C. and T. A. QUILLIAM: Electron microscopy of the Pacinian corpuscle. Biophys. Biochem. Cytol. **3,** 331—342 (1957).
PICK, J.: The discovery of the carotid body. J. Hist. Med. allied Sci. **14,** 61—73 (1959).
PRYSE-DAVIES, J., I. M. P. DAWSON and G. WESTBURY: Some morphologic, histochemical, and chemical observations on chemodectomas and the normal carotid body, including a study of the chromaffin reaction and possible ganglion cell elements. Cancer (Philad). **17,** 185—202 (1964).
RABL, H.: Die Entwicklung der Carotisdrüse beim Meerschweinchen. Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte **96,** 315—339 (1922).
REES, P. M.: The distribution of biogenic amines in the carotid bifurcation region. J. Physiol. (Lond.) **193,** 245—253 (1967).
ROGERS, D. C.: Possible baroreceptor nerve endings in the vicinity of the amphibian carotid body labyrinth. Acta Anat. **57,** 253—266 (1964).
ROGERS, D. C.: The development of the rat carotid body. J. Anat. (Lond.) **99,** 89—101 (1965).
ROSS, L. L.: An electron microscopic study of carotid body chemoreceptors. Anat. Rec. **127,** 481 (1957a).
ROSS, L. L.: A cytological and histochemical study of the carotid body of the cat. Anat. Rec. **129,** 433—455 (1957b).
ROSS, L. L.: Electron microscopic observations of the carotid body of the cat. J. Biophys. Biochem. Cytol. **6,** 253—262 (1959).
ROSS, L. L.: Electron microscopic studies of the normal and denervated mouse carotid body. Anat. Rec. **157,** 313 (1967).
SETO, H.: Über zwischen Aorta und Arteria pulmonalis gelegene Herzparaganglien. Z. Zellforsch. **22,** 213—231 (1935).
SIMÁRSZKY, J. and K. LAPIS: Ultrastructure of the carotid body in bronchial asthma. Acta morph. Acad. Sci. Hung. **18,** 167—181 (1970).
SMITH, CHRISTIANNA: The origin and development of the carotid body. Amer. J. Anat. **34,** 87—131 (1924).
SEDLUND, H. A., L. I. HENDERSON, W. S. PAYNE and W. S. FOWLER: Glomectomy for chronic asthma. Mayo Clinic Proc. **40,** 895—897 (1965).
TAMURA, O.: Die Folgen der Nervendurchschneidung am Entenschnabel. Arch. Entwicklungsmech. **51,** 552—574 (1922).
TAVBE, H. W. L.: Dessertatio inauguralis de vera origine nervi intercostalis. Göttingen: Vandenhoeck p. 20 (1743).
TORRANCE, R. W.: The nature of the transmitter, R. W. Torrance: Arterial Chemoreceptors. Oxford and Edinburg: Blackwell p. 15—20 (1968).
TRAMEZZANI, J. H., SARA CHIOCCHIO and G. F. WASSERMANN: A technique for light and electron microscopic identification of adrenalin and noradrenalin-storing cells. J. Histochem. Cytochem. **12,** 890—899 (1964).
VAJDA, A., S. DUCA and A. LÁZÁR: Zur Innervation des Glomus caroticum des Menschen. Anat. Anz. **118,** 171—177 (1966).
WATZKA, M.: Über die Entwicklung des Paraganglion caroticum der Säugetiere. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **108,** 61—73 (1938).
WERSÄLL, J.: Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the guinea pig. Acta oto-laryng. Suppl. **126,** 1—85 (1956).
WHITE, E. G.: Die Struktur des Glomus caroticum, eine Pathologie und Physiologie und seine Beziehung zum Nervensystem. Beitr. path. Anat. **96,** 177—227 (1935—36).
WILIS, A. G. Ex. J. D. TANGE: The argentophil cells of the human carotid body. Amer. J. Anat. **105,** 141—163 (1959).
WITZLEB, E.: Physiologie des Glomus caroticum. Med. Welt. (Stuttg.) **21,** 237—262 (1970).

ZAPATA, P., A. HESS, E. L. BLISS and C. EYZAGUIRRE: Chemical electron microscopic and physiological observations on the role of catecholamines in the carotid body. Brain Res. **14,** 473—496 (1969).

ZAPATA, P., A. HESS and C. EYZAGUIRRE: Reinnervation of carotid body and sinus with superior laryngeal nerve fibers. J. Neurophysiol. **32,** 215—228 (1969).

CITOLÓGIAI VÁLTOZÁSOK A P-BRÓM-METAMFETAMIN (V-111) HATÁSÁRA A TAVI KAGYLÓ (ANODONTA CYGNEA L.) KÖZPONTI IDEGRENDSZERÉBEN

BARANYI ILONA

ELTE Állatszervezettani Tanszék, Budapest

A tavi kagyló idegműködése szabályozásában a szerotonin mint transzmitter anyag nagy szerepet játszik. Ezért az *Anodonta cygnea* alkalmas objektum a szerotonin anyagcserevizsgálatára.

KNOLL és munkatársai kimutatták, hogy az általuk szintetizált p-bróm-metamfetamin szelektíven gátolja a szintetizált szerotonin felvételt, másrészt fokozza az elraktározott szerotonin kiürülését a gerinces állatok idegrendszerében. (5, 6, 9) Nem ismeretes azonban az, hogy ez a folyamat milyen neurális ultrastrukturális képletekben játszódik le.

Vizsgálataink célja az volt, hogy a tavi-kagyló központi idegrendszerében található különböző morfológiájú és különböző méretű vezikulumok funkciójának ismeretéhez adatokat szolgáltassunk azáltal, hogy azokat megfigyeljük, hogyan viselkednek a p-bróm-metamfetamin hatására (1, 7).

Vizsgálatainkhoz 3—4 éves 40 db tavi-kagylót használtunk és ezeket p-bróm-metamfetamin (V-111)-al 0.02 mgr/kg kezeltük. Az anyag beadása után 1., 2., 6., 24., 48., 96-órával az állatokból kioperáltuk a központi idegrendszert és azt elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára feldolgoztuk. (2, 3) Ismeretes, hogy a különböző fixálószerek befolyásolják az ultrastrukturális képleteket (4). Ezért az elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz az anyagot nagy körültekintéssel, azonos módszerrel dolgoztuk fel, úgy a kontrollt, mint a kísérleti anyagot.

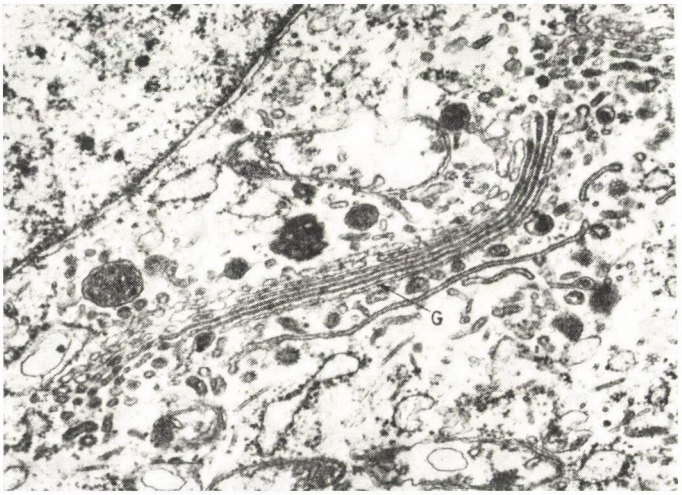
Eredmények

I. Csoport: Kontroll

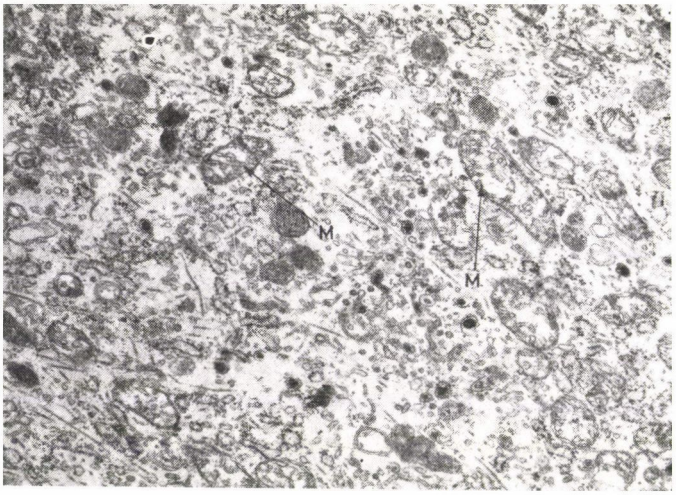
Cerebralis ganglion sejtes kéregállomány:

A maghártya szabályos lefutású, rajta befűződések nem fordulnak elő. A maghártya megkettőződése jól észrevehető, az internukleáris tér kicsi. A maghártyán belül a belső membrán felszínén dense kromatin felhalmozódás észlelhető. A magvacska denzitása egyenletes, gömb alakú és a sejtmag-centrumban helyezkedik el.

A citoplazmában a sejtmag közelében a Golgi-apparátust egymáshoz simuló, lelapult ciszternák képviselik. A Golgi ciszternák végén lefűződő vezikulumok észlelhetők, a lefűződött vezikulumok, melyek a ciszternákhoz közel helyezkednek el, centrumukban elektron dense anyagokat tartalmaznak, míg a távolabb levő vezikulumok világosak, elektron dense anyagot nem tartalmaznak. A citoplazmában az ergasztoplazmát néhány durva felszínű membrán alkotja (1. kép).



1. kép. Cerebralis ganglion. Kontroll; sejtmag és citoplazma részlet. Golgi-apparátus látható. ×33 000



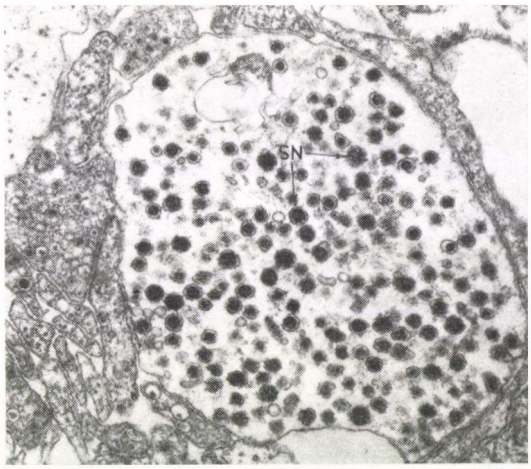
2. kép. Cerebralis ganglion. Kontroll; citoplazma részlet, számos mitokondriummal. ×33 000

A citoplazmában számos mitokondrium figyelhető meg, alakjuk ellipszis vagy hosszúra megnyúlt. A mitokondriumok mátrixa világos, bennük a kriszta jól látható (2. kép).

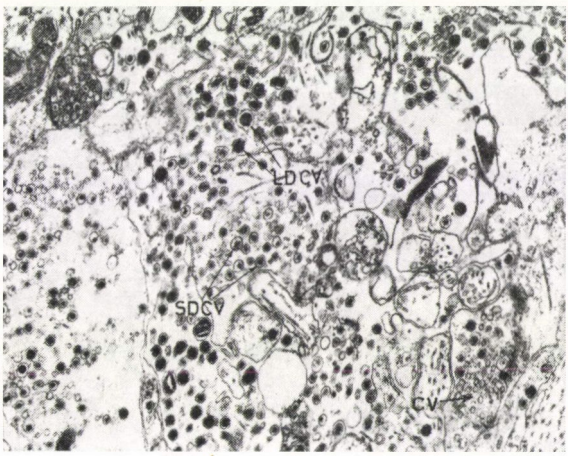
Cerebralis ganglion velőállománya (Neuropil)

A neuropilben nagyság és morfológiai változás szerint öt típusú vezikulum fordul elő, ezek a következők:

1. Neuroszekrétum granulum: 2000 Å — 3000 Å (3. kép).
2. Nagyméretű dense-core vezikulumok 1200—1800 Å átmérővel bírnak.



3. kép. Cerebralis ganglion. Kontroll; neuropilből részlet, vastagabb idegrost átmetszet, benne számos neuroszekrétum granulum (NS). ×33 000



4. kép. Cerebralis ganglion. Kontroll; neuropilből részlet, nagy méretű dense-core vezikulumok (LDCV), kis méretű dense-core vezikulumok (SDCV), világos vezikulumok (CV) láthatók. ×30 000

3. Kisméretű dense-core vezikulumok 700—1200 Å. A kis- és nagyméretű dense-core vezikulumok centrumában látható a dense-anyag, és e körül helyezkedik el a világos udvar. Ezen vezikulumok általában a vastagabb idegrostok átmetszetében, keverten fordulnak elő, de előfordulnak külön-külön idegvégződésekben, ill. vékonyabb idegrost átmetszetben is (4. kép).

4. Világos vezikulumok 600—800 Å átmérőjűek. A vékonyabb idegrostokban észlelhetők.

5. Megfigyelhetők még olyan vezikulumok, melyeknek a centrumában a dense-anyag excentrikusan helyezkedik el. Átmérőjük 1000—2000 Å között van. Ezen vezikulumokból igen kevés látható az idegvégződésekben.

Az eredmények értékelésének leírásánál az 1 órás kísérletek adataira nem tértünk ki, mivel ultrastrukturális eltérést az anyagban a kontrollhoz viszonyítva nem észleltünk.

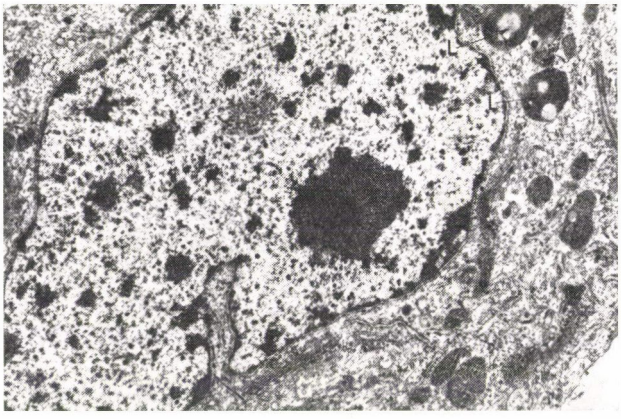
II. Csoport: V-111 kezelt állatok

A: A V-111-el kezelt állatok központi idegrendszerében a beadás után 2 órával az alábbi elváltozásokat észleltük:

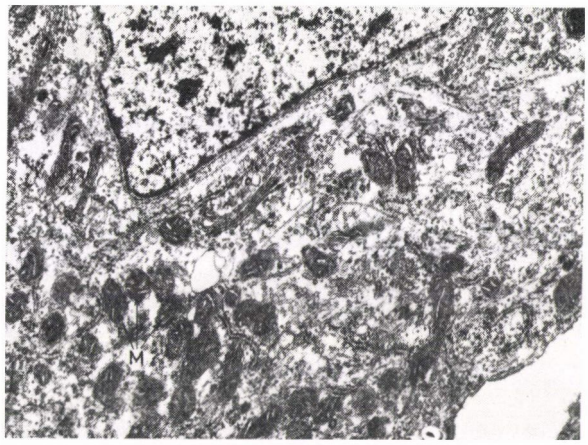
1. *Cerebralis ganglion kéregállománya*

A sejtmagban a dense-kromatin eloszlása változó, kisebb-nagyobb tömeget alkot. A maghártyán befűződések észlelhetők (5. kép).

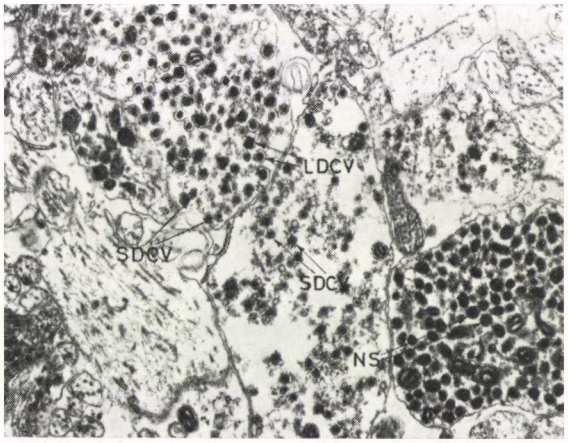
A citoplazmában számos mitokondrium észlelhető. A mitokondriumok belsejét sötét matrix tölti ki, benne a kriszták világos csík formájában észlelhetők. Az ergasztoplazma hosszanti ciszternák formájában látható, azok membránjának felszínén finom szemcsék észlelhetők. A Golgi-apparátus igen kis



5. kép. Cerebralis ganglion: 2 órával a V-111 adása után. A maghártyán befűződés látható. A citoplazmában lizoszómák (L) láthatók. ×17 000



6. kép. Cerebralis ganglion: 2 órával a V-111 adása után. Citoplazma részlet, benne számos mitokondriummal (M) ×28 000



7. kép. Cerebralis ganglion: 2 órával a V-111 adása után. Neuropilből részlet. Neuroszekrétum granulumok (NS). Nagy méretű dense-core vezikulumok (LDCV), kis méretű dense-core vezikulumok (SDCV) láthatók. ×30 000

számban van jelen. A lizoszómák száma viszonylag nagy, belsejükben világosabb foltok észlelhetők (5, 6. kép).

2. *Cerebralis ganglion velőállománya (Neuropil)*

Az idegrost átmetszetekben sok neuroszekrétum granulum észlelhető. A nagyméretű dense-core vezikulumok és a kisméretű dense-core vezikulumok keverten egyazon idegvégződés vagy idegrost átmetszetében tömegesen fordulnak elő, hasonlóan a kontrollhoz (7. kép).

B: A V-111-el kezelt állatok központi idegrendszerében 6 órával az anyag beadása után az alábbi elváltozásokat észleltük:

1. *Cerebralis ganglion kéregállománya*

A sejtmagokban a dense-kromatin egyenlőtlen eloszlású.

A citoplazmában a mitokondriumok száma nagy, belsejüket sötét matrix tölti ki, benne a kriszták világos csík formájában észlelhetők (8. kép). A Golgi-apparátus és az ergasztoplazma háttérbe szorult. A lizoszómák száma elég magas és igen nagy méretűek, a belsejüket világosabb és sötétebb homogén anyag tölti ki (8. kép).

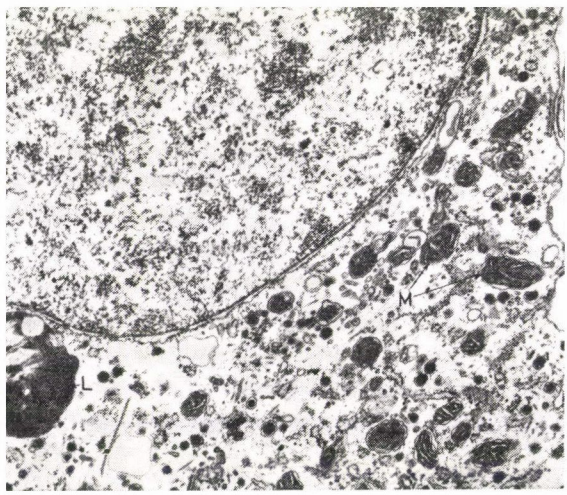
2. *Cerebralis ganglion velőállománya (Neuropil)*

A velőállományban számos olyan idegrost és idegvégződés található, amelyek tartalmaznak dense-core vezikulumokat. Különösen feltűnő volt az, hogy 6 órával az anyag beadása után a kisméretű, dense-core vezikulumok nagy többségéből az elektron-dense anyag kiürült (9. kép). A nagyméretű dense-core vezikulumok denzitásában különösebb változást a kontrollhoz viszonyítva nem észleltünk.

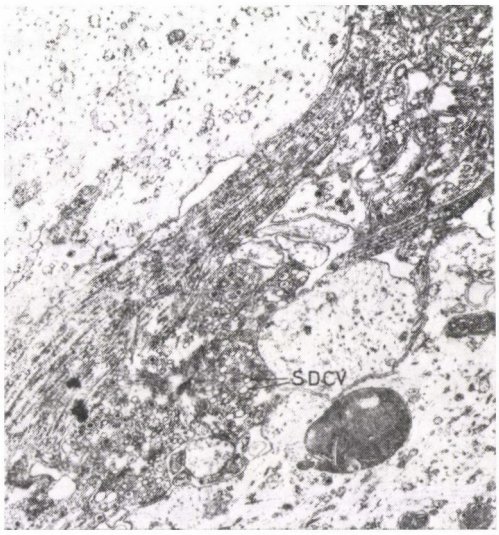
C: A V-111-el kezelt állatok központi idegrendszerében 24 óra elteltével az anyag beadása után az alábbi elváltozásokat észleltük:

1. *Cerebralis ganglion kéregállománya*

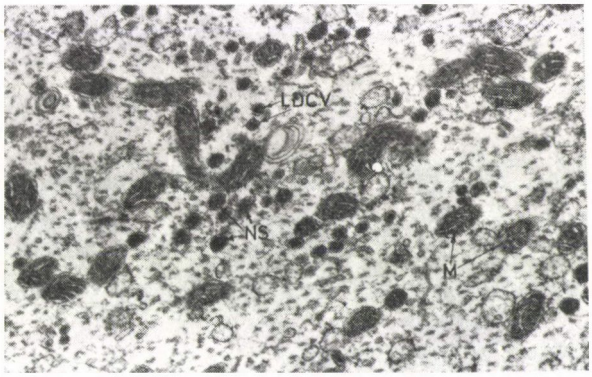
Az anyag beadása után 24 óra elteltével az idegsejtek citoplazmájában a sejtorganellumok közül a mitokondriumok vannak a legnagyobb számban.



8. kép. Cerebralis ganglion: 6 órával a V-111 adása után. Sejt részlet. Számos mitokondrium látható (M), továbbá óriás méretű lizoszómák (L). ×30 000



9. kép. Cerebralis ganglion: neuropil részlet. Kis méretű dense-core vezikulumok (SDCV) 6 órával a V-111 adása után. ×24 000

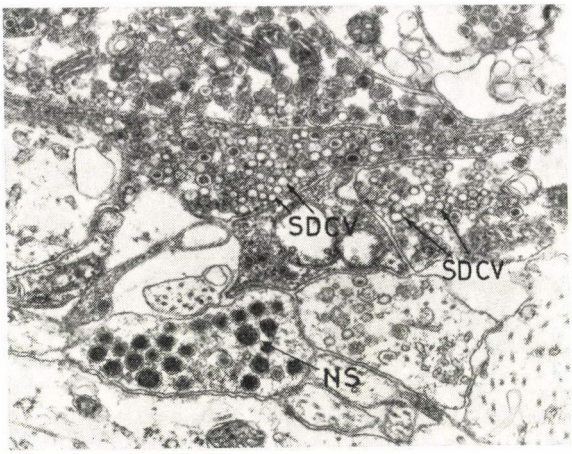


10. kép. Cerebralis ganglion: 24 órával a V-111 beadása után. Sejtrészlet. Citoplazmában számos mitokondrium (M), neuroszekrétum granulum (NS), nagy méretű dense-core vezikulum (LDCV) látható. ×28 000

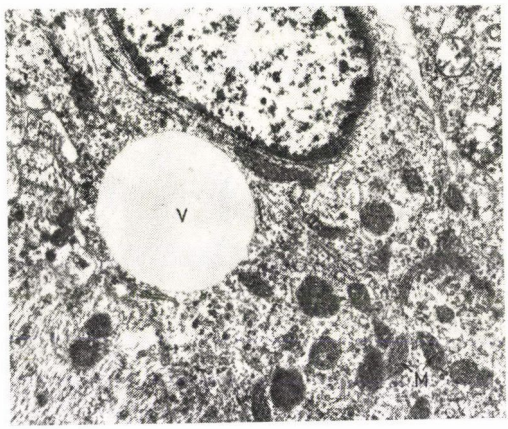
A mitokondriumok belsejében a mátrix sötét, bennük a kriszták világos csíkok formájában láthatók. Az ergasztoplazma és a Golgi-apparátus háttérbe szorult. A citoplazmában neuroszekrétum granulumok és a nagyobb átmérőjű dense-core vezikulumok láthatók (10. kép).

2. *A cerebralis ganglion velőállománya (Neuropil)*

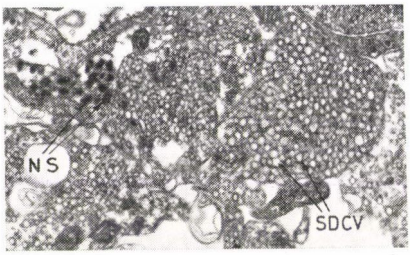
A kezelés után 24 órával az idegvégződésekben számos olyan vezikulum van, amelyik nem tartalmaz elektron-dense anyagot. Feltűnő, hogy a kisméretű dense-core vezikulumok denzitása teljesen megszűnt (11. kép).



11. kép. Cerebralis ganglion: 24 órával a V-111 adása után. Neuropilből részlet. Számos üres kis méretű dense-core vezikulum (SDCV), neuroszekrétum granulum látható (NS). ×28 000



12. kép. Cerebralis ganglion: 48 órával a V-111 adása után. Sejtrészlet. Citoplazmában nagy vakuolumok (V), mitokondrium (M) láthatók. ×28 000



13. kép. Cerebralis ganglion: 48 órával a V-111 adása után. Neuropilből részlet. Neuroszekrétum granulum (NS), üres kis méretű dense-core vezikulumok (SDCV) láthatók. ×24 000

A nagyobb méretű dense-core vezikulumok, valamint a neuroszekrétum granulumok denzitása lényeges változást nem mutatott.

D: V-111-el kezelt állatok központi idegrendszerében 48 órával a beadás után az alábbi elváltozásokat észleltük:

1. *Cerebralis ganglion kéregállománya*

A 48 órás kísérleti anyagban a cerebrális ganglion kéregállományában a sejtmagon belül a dense kromatin szétszórtan található, a maghártya közelében ez az anyag a belső membránon kisebb-nagyobb csoportokat is képezhet. Feltűnő, hogy a citoplazmában nagyobb vakuolumok keletkeztek, amelyekben világos, teljesen homogén anyag látható. A mitokondriumok sötét mátrixszal rendelkeznek, bennük a belső membrán világos csíkok formájában látható (12. kép). A Golgi-apparátus és az ergasztoplazma igen kis számban észlelhető.

2. *Cerebrális ganglion velőállománya (Neuropil)*

A 48 órás kísérleti anyagban az idegrostok és idegvégződésekben a kisebb méretű dense-core vezikulák denzitása megszűnt (13. kép). A neuroszekrétum granulumok, valamint a nagyobb méretű dense-core vezikulumok denzitásában lényeges változást nem észleltünk.

Megjegyezni kívánjuk, hogy a pedalis és visceralis ganglionokban megegyező eredményt kaptunk a cerebrális ganglionokban észleltekkel. Továbbá a 96 órás kezelések után sem kaptunk eltérő eredményt a fentiekhez viszonyítva, ezért ezek részletes leírásától eltekintünk.

Eredmények megbeszélése

Knoll és munkatársai (5, 10, 8) gerinces állatokban kimutatták, hogy a p-bróm-metamfetamin (V-111) irreverzibilisen gátolja az 5-HT intraneurális felvételét. Ez a gátlás először szerotonerg tónus emelkedéséhez, majd nagyon hosszan tartó csökkenéséhez vezet. A tónus emelkedési szakaszában a vegyület egéren, patkányon, nyúlon és macskán az LSD-hez hasonlóan hat (8, 9, 11). Továbbá az is ismeretes, hogy a p-bróm-metamfetamin kis adagban serkenti, nagyobb adagban gátolja a magasabbrendű idegműködést (6).

A p-bróm-metamfetamin hatását a tavi-kagyló központi idegrendszerében vizsgáltuk elektronmikroszkóppal, különös tekintettel a cerebralis ganglionra. Ismeretes, hogy a cerebralis ganglionnak nagy szerepet tulajdonítanak az állat magatartásában. Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a tavi kagylóban igen kis dózis, 0,02 mgr/kg is lényeges eltérést adott a kontrollhoz viszonyítva. A V-111 beadása után 2 órával a citoplazmában mitokondriumok fel-

szaporodása volt észlelhető. Továbbá a V-111 beadása után 6 óra elteltével a kisméretű dense-core vezikulum többségéből az electron-dense anyag kiürült. Ez a kiürülés 24, 48, 96 óra elteltével még fokozódott. A nagy méretű dense-core vezikulumok a fenti anyag hatására változást nem mutattak.

Több éves szezonális vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy a tavi kagyló központi idegrendszeréből a V-111 szelektíven üríti a biogén aminokat. Irodalomból ismeretes, hogy a V-111 szelektív szerotonerg amfetamin (10), ennek alapján az a következtetés tehető, hogy a tavi kagyló központi idegrendszerében a kis méretű dense-core vezikulumok a szerotoning funkcióhoz kapcsolódnak.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki Dr. Knoll József akadémikusnak, hasznos tanácsaiért és a gyógyszerért, amellyel a kísérleteket végeztem.

IRODALOM

1. Axelrod, J.: Studies on sympathomimetic amines: II. Biotransformation and physiological disposition of d-amphetamine, d-p-hydroxy-amphetamine and d-methamphetamine. — J. Pharmacol. exp. Ther. **110,** 315—326 (1954).
2. Baranyi, I.: A tavi kagyló *(Anodonta cygnea* L.) központi idegrendszerének anatómiai és hisztológiai felépítése. — Biol. Közl. XVIII. 33—39 (1970).
3. Baranyi, I.: Adatok a tavi kagyló *(Anodonta cygnea* L.) neuroszekréciós sejtjeinek finom szerkezetéhez. — Biol. Közl. XIX. 143—148 (1971).
4. Elekes, K. and Zs.-Nagy, I.: Electron microscopic investigations of the vesicle populations in the central nervous system of fresh water mussel (Anodonta cygnea L.). — Annal. Biol. Tihany **40,** 3—25 (1973).
5. Knoll, B., Gyarmati Zs., Timár J.: Agyi szerotonin és viselkedés. A parabrom-metilamfetamin hatásmódjának további elemzése. — MTA Orvostudomány **29,** 277—284 (1979).
6. Knoll, B.: Krónikus para-bróm-metamfetamin (V-111) kezelés hatása patkányok tanulási memóriatároló képességére. — MTA Orvostudomány **27,** 60—70 (1976).
7. Knoll, J., Vizi, E. S., Knoll, B., Somogyi, Gy.: A p-bróm-metamfetamin (V-111) farmakológiája. — MTA V. Oszt. Közl. 40—50 (1967).
8. Knoll, J. and Vizi, E. S.: Inhibition of the effects of LSD and p-bromo methamphetamine (V-111) by p-chlorphenylalanine. — Pharmacol. Res. Comm. **2,** 67—70 (1970).
9. Knoll, J. and Vizi, E. S.: Cross-tolerance between p-bromo-methamphetamine (V-111) and LSD-25. — Pharmacology **4,** 278—286 (1970).
10. Knoll, J., Magyar, K., Vizi, E. S., Knoll, B., Török, T., Jóna, G.: Az agyi szerotonin szerepe a para-bróm-metamfetamin (V-111) farmakológiai hatásában. — Orvostudomány **23,** 100—120 (1972).
11. Knoll, J., Vizi, E. S. and Knoll, B.: Pharmacological studies on para-bromomethamphetamine (V-111) and LSD. — Acta physiol. Acad. Sci. hung. **37,** 151 (1970).

A TÜDŐSZÖVET SEJTJEINEK IN VIVO DNS SZINTÉZISÉT SPECIFIKUSAN GÁTLÓ, FEHÉRJE TERMÉSZETŰ FAKTOR RÉSZLEGES TISZTÍTÁSA MARHATÜDŐBŐL

MENYHÁRT JÁNOS és MARCSEK ZOLTÁN

MTA-SOTE Egyesített Kutatási Szervezet Klinikai Biokémiai és Sejtbiológiai Részlege, Budapest

A sejtproliferációt serkentő és gátló, természetes (endogén) anyagok létezéséről szövetek durva kivonataival és ezek, valamint a szérum különböző fokban tisztított frakcióival szerzett tapasztalatok tanúskodnak (BISMARCK és mtsai 1975, GOSPODAROWICZ és MORAN 1976, BALÁZS 1979, RUDLAND és DE ASUA 1979). Elméleti jelentőségük és gyakorlati felhasználásuk potenciális lehetőségei (RYTÖMAA és mtsai 1976, RYTÖMAA és mtsai 1977) különös fontosságot kölcsönöznek a sejtproliferáció endogén, gátló anyagainak és ezek szövet- illetve sejtvonal-specifikus hatásúnak tartott, sok vitát kavaró, ma is ellentmondásos változatainak, az ún. kalonoknak (BULLOUGH 1962, THORNLEY és LAURENCE 1975, BULLOUGH 1975, IVERSEN 1976). A kalon elmélet általános elfogadásának máig legnagyobb akadálya a hatóanyagok szövet- illetve sejtvonal-specifikus hatásainak bizonyítására használt, túlnyomó többségükben in vitro tesztrendszerek alkalmasságával szemben hangoztatott kételyekben, valamint a biológiai hatásokat közvetítő anyagok kémiai természetére és szerkezetére vonatkozó ismeretek elégtelenségében és bizonytalanságaiban keresendő (THORNLEY és LAURENCE 1975). Napjainkig mintegy 20-féle szövetkivonatban írtak le szövetspecifikus gátló hatásokat (BALÁZS 1979, BULLOUGH 1975, IVERSEN 1976). Azonban a hatás mechanizmusának és még inkább a hatásokat hordozó anyagok kémiai természetének részletesebb elemzésére csak a granuloid (RYTÖMAA 1976, RYTÖMAA és mtsai 1976, PAUKOVITS és mtsai 1977, RYTÖMAA és mtsai 1977, MAURER és mtsai 1978, PAUKOVITS és HINTERBERGER 1978, RYTÖMAA és TOIVONEN 1979) és részben az epidermális (HONDIUS—BOLDINGH és LAURENCE 1968, ELGJO 1973, MARKS 1974), illetve a limfoid (ATTALLAH és HOUCK 1976, HIESTAND és mtsai 1977, HOUCK 1979) eredetű inhibitorok eseteiben került sor. Tüdőszövetből készített durva vizes kivonatok in vitro gátló hatását SIMNETT és mtsai (1969) „short term" tüdő explantatumokon, a tüdőszövet vizes kivonata $3—5 \times 10^4$ molsúly tartományba eső anyagokat tartalmazó ultrafiltrátumának gátló hatását pedig HOUCK (1976) bronchialis carcinoma sejttenyészetekben mutatták ki.

Ebben a közleményben egy olyan, marha tüdőszövet vizes kivonatából nyert, fehérje természetű anyag részleges tisztításáról számolunk be, amely egér tüdőszövet sejtjeinek in vivo DNS szintézisét szövet- illetve sejtvonal-specifikus módon gátolja.

Anyag és módszer

A) *Felhasznált anyagok és eszközök*

A kísérletek során felhasznált valamennyi vegyszert a Reanal Vegyszergyárból szereztük be, a.lt. minőségben. A kromatográfiás elválasztás céljára DEAE Sephadex A-50, CM Sephadex C—25, Sephadex G-75 géleket, illetve 2,6 × 100 cm és 5,0 × 85 cm méretű oszlopokat (Pharmacia Fine Chemical) használtunk. Utóbbiak egyenletes átáramoltatását az eluciók során Varioperpex (LKB) pumpákkal biztosítottuk. A sejttenyészetekhez Parker TC 199 mediumot (OKI, Budapest) használtunk. A DNS szintézis mérése ^{3}H—TdR (Amersham, 25 Ci/mmol) segítségével történt.

Vizes kivonat készítése marha tüdőszövetből

A feldolgozásra került marhatüdőket a budapesti marhavágóhídról szereztük be. Az állatorvos által egészségesnek minősített állatok tüdejét, közvetlenül a mellkas megnyitását követően eltávolítottuk, majd jéggel előrehűtött edényekben a laboratóriumba szállítottuk és mélyhűtőbe helyeztük. A tüdők feldolgozása az állatok levágását követő 40 percen belül minden esetben elkezdődött. A feldolgozás valamennyi lépése hűtött körülmények között (2—4 °C) történt.

A kivonási műveletet, hatásfokának növelése érdekében, több lépésben végeztük. Az esetenként 4—6 kg súlyú szövetet, durva felaprítás után jéghideg fiziológiás sóoldatban mostuk, majd jégszekrényben működtetett elektromos húsdarálón, egymást követő két alkalommal átdaráltuk. A megdarált szövetet tízszeres mennyiségű, hűtött desztillált vízben szuszpendáltuk, majd 1500 ml-es térfogatokban, 2 percen át 2×10^4 min^{-1} fordulatszámmal működtetett Waring blendorral aprítottuk. Ezt követően a szuszpenziót 10×2 percen át hűtőszekrénybe helyezett 70 W teljesítményű ultrahangdezintegrátorral kezeltük, majd éjszakán át, 2 °C-on állni hagytuk.

Az így előkészített anyagot 4 réteg gézen át szűrtük, a szűrlethez 0,1 M vég koncentrációban, Trisz—HCl puffert (pH 5,5) adtunk, majd egy J 21B (Beckman) centrifuga, 1,8 l űrtartalmú zonális rotorjában, 2 °C hőmérsékleten, 30 percen át, 4×10^4 g nehézségi erővel ülepítettük. Frakcionáláshoz az így nyert felülúszót használtuk föl.

A vizes kivonat frakcionálása:

a) *Ultraszűrés:* az előzőek szerint kapott felülúszót, recirkulációs rendszerben működtetett Amcon H1P100 kapilláris membránfiltrációs egységgel (nominális szűrési határ: 10^5 dalton) szűrtük, majd a filtrációs maradékot (retentátum) tízszeres térfogatú Trisz—HCl puffer (0,1 M, pH = 5,5) folyamatos utántöltésével szűrtük tovább.

A szűrletet, szakaszos rendszerben működtetett Amicon H1P10 kapilláris membránon (nominális szűrési határ: 10^4 dalton) történő szűréssel koncentráltuk és az ekkor nyert, 10^4 és 10^5 dalton molsúly határok közé eső anyagokat tartalmazó retentátum pH-ját, megfelelő összetételű Trisz—HCl pufferral (0,1 M) szemben történő dialízis segítségével pH 8,0-as értékre állítottuk be.

b.) *Oszlopkromatográfia:* a fentiek szerint előkészített szűrletet DEAE Sephadex A-50 géllel töltött, 5×85 cm oszlopon, szakaszos grádiens elucióval, 0,65 ml/perc átfolyási sebességgel kromatográfáltuk. Az eluciót 0,1 M Trisz—HCl pufferrel (pH = 5,5) kezdtük, majd az első csúcs megjelenésekor indított NaCl grádienssel folytattuk. Az egyes eluciós szakaszokat az alábbi térfogatú és összetételű eluciós folyadéksor jelentette: a) 1100 ml 0,1 M Trisz—HCl (pH = 8,0); b) 900 ml Trisz + 0,05 M NaCl (pH = 7,3); c) 1100 ml Trisz 0,1 M NaCl (pH = 7,0); d) 900 ml Trisz + 0,2 M NaCl (pH = 6,8); e) 1600 ml Trisz + 0,35 M NaCl (pH = 6,0).

A biológiai aktivitást (1. később) mutató összetevőket tartalmazó kromatográfiás frakciókat, a H1P10 kapilláris membránfiltrációs egység segítségével, 0,1 M Trisz—acetát pufferrel (pH = 5,5) szemben végzett dialízis után, ugyanezen pufferrel egyensúlyba hozott CM Sephadex G-25 géllel töltött 2,6×100 cm méretű oszlopon tisztítottuk tovább. Az oszlop szakaszos eluciója olyan puffersor alkalmazásával történt, amely az alább megadott koncentrációjú NaCl mellett, ecetsavval a kívánt pH értékre beállított, 0,1 M koncentrációjúTrisz-t tartalmazott. Az eluciós szakaszokat az alábbi térfogatú és összetételű pufferek képezték: a) 300 ml Trisz—acetát (pH = 5,5); b) 250 ml 0,025 M NaCl (pH = = 5,7); c) 250 ml 0,05 M NaCl (pH = 6,00); d) 250 ml 0,075 M NaCl (pH = = 6,115); e) 300 ml 0,1 M NaCl (pH = 6,5); f) 500 ml 0,3 M NaCl (pH = 7,5).

A biológiai aktivitást (1. később) tartalmazó kromatográfiás frakciókat, a H1P10 kapilláris membrán egység segítségével, PBS-sel szemben végzett dialízist követően, 2,6×200 cm méretű, Sephadex G-65-tel töltött oszlopon kromatografáltuk. Az eluciót 0,44 ml/perc sebességgel áramoltatott PBS-sel végeztük. Az oszlopokat előzetesen albumin V. frakcióval (ms: 65,000 D) és citokróm C-vel (ms: 12,000 D) kalibráltuk.

Az eluátumok optikai aktivitását, valamennyi kromatográfiás eljárás során 280 nm-en, Uvikord II. (LKB) fotométerrel, folyamatosan regisztráltuk.

Közelítő molsúlymeghatározások

A részlegesen tisztított, biológiailag aktív kromatográfiás frakciók anyagainak közelítő molsúlyát részben kalibrált Sephadex G-75 oszlopon (1. fentebb), részben az ülepedési sebesség módszerével, albumin standardra vonatkoztatva, ultracentrifugával határoztuk meg (Bowen 1970).

Kémiai analízis: Az eluátumok fehérje tartalmát az adszorbencia 280 nm-en történő folyamatos mérésével, esetenként pedig Lowry (Lowry és mtsai 1951)

szerint határoztuk meg. A minták DNS tartalmának meghatározása a BURTON f. eljárással (BURTON 1956) történt.

A biológiai aktivitás (^3H—TdR beépülés DNS-be) mérése

Valamennyi, biológiai tesztelésre került kromatográfiás frakciót PBS-sel szemben kimerítően dializáltunk, az eluciós folyadékok nem kívánatos, kis molsúlyú komponenseinek eltávolítása érdekében.

a) *In vivo teszt rendszerek*

1. *Szkrinelő teszt:* a csak kis fokban tisztítottnak tekintett DEAE Sephadex frakciók biológiai aktivitásának tesztelését ún. szkrinelő eljárással végeztük. Ennek során egerek azonos tüdőlebenye nedves súlyra vonatkoztatott egységnyi mennyiségében mérhető radioaktivitás értékeket hasonlítottuk össze. A szkrinelő teszt menete a következő volt. Minden frakció tesztelése 30 db 25 g súlyú, saját tenyésztésű, CLFP egérből álló csoporton történt. Az egereket a DEAE Sephadex frakciók 12,5 mg fehérje/kg dózisaival, i. p. injiciáltuk. Az adagolást 1,5 órás időközökben, 4 alkalommal megismételtük. A 6 órás idő intervallumban beadott anyag összes mennyisége tehát 50 mg fehérje/kg volt. Az első dózis beadásának időpontjától számított 5. órában, 0,5 mCi/kg, i. p. ^3H—TdR-t adagoltunk. Az izotóp beadását követő 1,5 órában az egereket dekapitáltuk, tüdejük azonos lebenyét eltávolítottuk, ezek súlyát 0,5 mg pontossággal lemértük, majd szcintillációs edénybe mért, 1 ml Soluene-100 (Packard) szolubilizáló oldatba helyeztük. A tüdőlebenyeket tartalmazó edényeket, éjszakán át, szobahőmérsékleten, 150 min^{-1} frekvenciával rázattuk, majd a szolubilizált tüdőt tartalmazó edényekbe 10 ml PP0—P0P0P tartalmú, toluolos szcintillációs folyadékot mértünk. 4 órás állás után a minták radioaktivitását folyadékszcintillációs spektrométerrel (Packard TriCarb 2110) meghatároztuk. A minták egyedi hatásfokának megítélése érdekében, a radioaktivitás mérése automatikus külső standardizálással történt. A számításokat a hatványgörbék lineáris transzformációjának regressziós analízisével, mikroszámítógépen végeztük.

2. *DNS-be épült ^3H—TdR specifikus aktivitásának mérése:* a nagyobb mértékben tisztított CM Sephadex frakciók in vivo biológiai aktivitásának és szövet-specificitásának tesztelését a különböző szövetekből (tüdő, lép, vese) izolált DNS súlyegységébe beépült jelzett timidin mennyiségének mérésével végeztük. Egy-egy frakció tesztelése 20—20 db egérből álló állatcsoportokon történt. A frakciók anyagainak adagolását az 1. pont alatt leírtak szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy ebben a kísérletsorozatban, a másfél óránként ismételt egyszeri dózis 7,5 mg fehérje/kg, a 6 óra alatt beadott összes anyagmennyiség 30 mg fehérje/kg volt. Dekapitálást követően minden állat két, azonos tüdőlebenyét eltávolítottuk és a két lebenyt, párhuzamos mérések céljára külön-külön dolgoztuk fel, az alábbiak szerint. A lebenyeket 3 ml jéghideg,

7%-os TCA-val homogenizáltuk. A keletkezett csapadékot lecentrifugáltuk, majd kétszer 7% TCA-ban, ezt követően etanol-éter 3 : 1 arányú keverékében, végül éterben reszuszpendálva mostuk. Az éteres kivonás után visszamaradó csapadékot 1,5 M $HClO_4$-ban, forró vízfürdőn, 30 percig hidrolizáltuk, szűrtük és a szűrlet 0,5 ml-ében mérhető radioaktivitást 5,0 ml Instagel (Packard) szcintillációs folyadék hozzáadása után az 1. pontban leírtak szerint meghatároztuk. Ugyanazon szűrletből DNS meghatározásokat is végeztünk. A mérések eredményeit dpm/μg DNS egységekben fejeztük ki.

b) *In vitro-teszt-rendszerek*

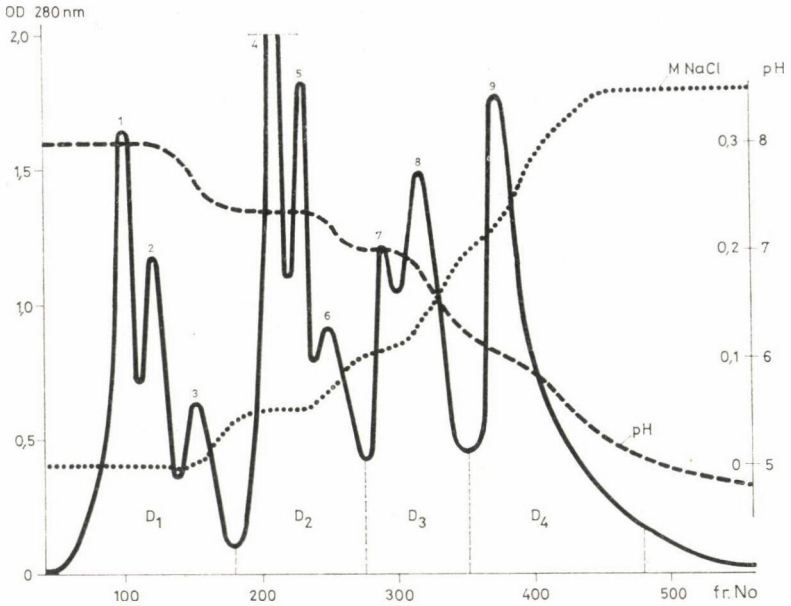
Az in vivo hatásosnak mutatkozó frakciók biológiai aktivitását, a fent ismertetett in vivo rendszerek mellett, in vitro rendszerekben is megvizsgáltuk. In vitro teszt-rendszerként Parker TC 199 mediumban Bellco csövekben 37 °C-on tenyésztett csontvelő (3×10^6 sejt/ml) és timocita (5×10^6 sejt/ml) kultúrák szolgáltak. A biológiai hatás mérése ^{3}H—TdR DNS-be történő beépülési sebességének meghatározásával történt, az inkubáció 3—4. órájában.

Autoradiográfia: annak érdekében, hogy képet kapjunk az in vivo adagolt jelzett timidinnek a tüdőt felépítő sejtek DNS-ében történt megoszlásáról — a radioaktivitás szövetbeli lokalizáltságáról —, néhány esetben elvégeztük a tüdőlebenyek autoradiográfiás vizsgálatát is. Ennek során Ilford K6 emulziót, 3—5 hét expozíciós időt és metilzöld-pyronin festést alkalmaztunk.

Eredmények

4 kg marhatüdőből, a módszertani részben ismertetett kivonási és ultraszűrési eljárások segítségével összesen 23 g 10,000—100,000 D tartományba eső molsúllyal rendelkező fehérjét állítottunk elő, amely a tüdőszövet összfehérje tartalmának mintegy 2,9%-át képviselte. E fehérje frakció DEAE Sephadex A-50 kromatográfiával, só és pH grádiens alkalmazása mellett nyert és jól reprodukálhatónak bizonyuló kromatogramját az 1. ábrán mutatjuk be. A 280 nm-en regisztrált kromatogramon 9 elúciós csúcs volt megfigyelhető. A csúcsoknak megfelelő anyagok gyűjtése, az ábrán jelzett módon, D_1, D_2, D_3 és D_4 frakciókban történt. A frakciók in vivo biológiai aktivitásait a módszertani részben leírtak szerint teszteltük. A testsúly 25%-ának megfelelő e. c. teret és azt feltételezve, hogy az i. p. adagolt anyag teljes egészében felszívódik és az e. c. térben oszlik meg, a frakciók anyagainak in vivo, e. c. koncentrációja az egyszeri dózist követően 50 μg/ml-re, az össz-dózis után 200 μg/ml-re tehető. Megjegyezzük, hogy egyszeri adagolás — még ha az egyszeri dózis többszörösét is alkalmaztuk — hatástalan volt. A biológiai teszt eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A D_1, D_2 és D_4 frakciók anyagai, a tüdőlebenyekben a szkrinelő tesztek segítségével mérhető radioaktivitás értékeit a kontroll értékeihez viszonyítva



1. ábra. Marhatüdő vizes kivonatából, kapilláris membránszűrővel előzetesen különválasztott, 10 000—100 000 dalton molsúly tartományba eső anyagok DEAE Sephadex A-50 gél oszlopon kapott kromatogramja. A pontozott vonal a sógrádienst, a szaggatott vonal a pH grádienst tünteti fel. A baloldali függőleges tengelyen, a 280 nm-en mért optikai aktivitás, a jobboldali függőleges tengely belső oldalán a sókoncentráció, a külső oldalán a pH értékei láthatók. A vízszintes tengelyen a frakciók számát tüntettük fel. A szaggatott vonalakkal határolt D_1—D_4 jelzésekhez tartozó frakciók kerültek biológiai tesztelésre

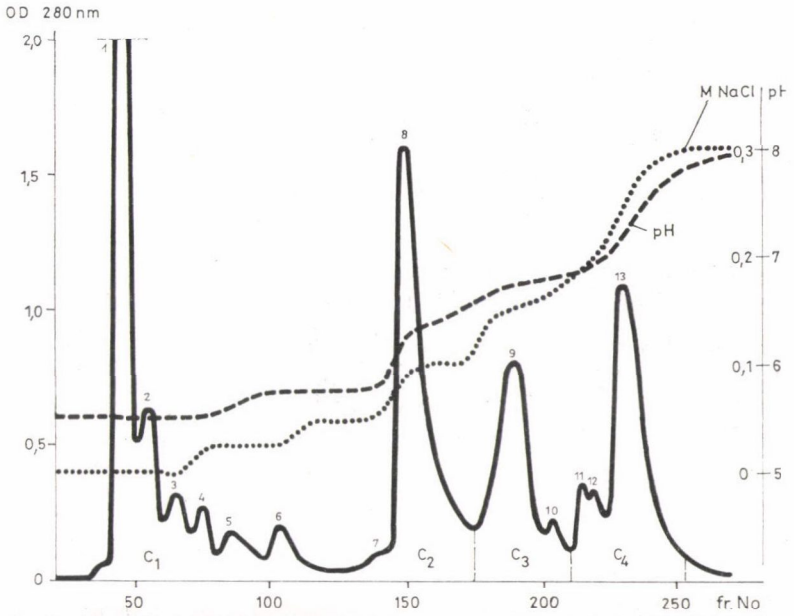
nem befolyásolták. Ezzel szemben, a kb. 0,1—0,2 M sógrádiens, illetve pH 6,5—7,0 pH grádiens alkalmazása mellett, 2 csúcsban eluálható, D_3 frakció anyagaival a jelzett timidin beépülésének 35%-os gátlása volt elérhető.

1. táblázat

Tüdőszövet vizes kivonatából DEAE Sephadex A-50 gél kromatográfiával nyert D_1—D_4 frakciók hatása egér tüdőszöveti sejtek in vivo DNS szintézisére (szkrinelő teszt). Az egyes számértékek 20 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tüntetik fel

n = 20

Frakciók	dpm/mg nedves súly	eltérés a kontrolltól %	
Kontroll	114±30,9	—	—
D_1	96±41,4	−16	$p > 0{,}20$
D_2	93±27,1	−18	$p > 0{,}20$
D_3	75±15,1	−34	$p < 0{,}05$
D_4	92±23,9	−19	$p > 0{,}20$



2. ábra. Az 1. ábrán látható, biológiai aktivitást mutató D_3 frakció CM Sephadex G-25 gél oszlopon kapott kromatogramja. A pontozott és a szaggatott vonal, valamint a függőleges és a vízszintes tengelyek jelzései azonosak az 1. ábránál leírtakkal. A szaggatott vonalakkal határolt C_1—C_4 jelzésekhez tartozó frakciók kerültek biológiai tesztelésre

A biológiai teszt eredményei alapján a D_3 frakció CM Sephadex C-25 oszlopon történő továbbtisztítására került sor. Az emelkedő só és pH grádienssel végzett elució során a D_3 frakció (l. 1. ábra) 280 nm-en elnyelést mutató, 13 szubfrakcióra volt bontható (2. ábra). A kromatográfiás csúcsoknak megfelelő anyagok gyűjtése, az ábrán jelzett módon, C_1, C_2, C_3 és C_4 frakciókban történt, melyek biológiai aktivitásának mérését a módszertani fejezetben

2. táblázat

DEAE Sephadex A-50 kromatográfiával nyert, biológiailag aktív D_3-frakció, CM Sephadex G-25 gélkromatográfiával kapott C_1—C_4 frakciónak hatása egér tüdőszöveti sejtek in vivo DNS szintézisére. Az egyes számértékek 12 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tüntetik fel

n = 12

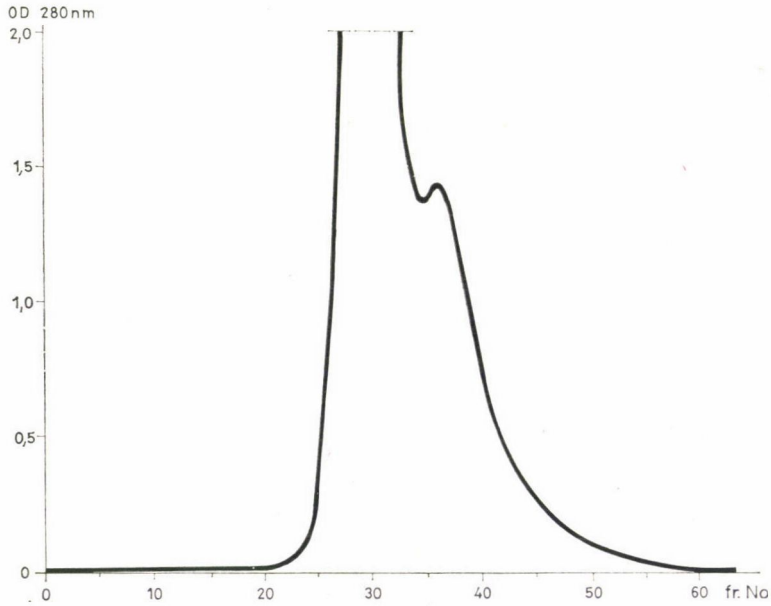
Frakciók	dpm/μg DNS	eltérés a kontrolltól %	
Kontroll	116±62,3	—	—
C_1	58±33,6	−50	$p < 0{,}05$
C_2	107±51,9	−08	$p > 0{,}50$
C_3	123±71,1	+06	$p > 0{,}50$
C_4	83±62,5	−28	$p > 0{,}05$

leírtak szerint végeztük el. A DEAE Sephadex frakciókkal kapcsolatban említett feltételek teljesülése -setén a CM-Sephadex frakciók anyagainak e. c. koncentrációját, az egyedi dózisok alkalmazása után 30 μg/ml-re, az össz-dózis után pedig 120 μg/ml-re tehetjük. A biológiai tesztelés eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Az adatok egyértelműen mutatják a C_2 és C_3 frakciók hatástalanságát. A C_4 frakció hatásaként 28%-os gátlás volt mérhető. Mivel azonban ez a gátlás statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak, a C_4 frakció hatását egyelőre bizonytalannak tekintjük. A fentiekkel ellentétben a ^{3}H—TdR DNS-be történő beépülésének erőteljes (50%) és egyértelmű gátlása volt elérhető a CM Sephadex C-25 oszlopon láthatóan nem kötődő (gyakorlatilag a V_0-val eluálódó), komponenst is tartalmazó, C_1 frakció anyagaival.

A tüdőszövet autoradiográfiás vizsgálata azt mutatta, hogy a jelzett timidin, gyakorlatilag kizárólagosan, az alveolusok felszínét borító sejtek magjaiba épült be. Ezért feltételezhető, hogy a timidin beépülés, szcintillációs módszerrel mérhető gátlását kiváltó C_1 frakció anyagainak hatása is ezekre a sejtekre irányult.

A C_1 frakcióban foglalt anyagok azonos molsúlyaira utal az a tény, hogy a frakció komponensei Sephadex G-75 oszlopon gyakorlatilag nem voltak szétválaszthatók (3. ábra). A két eluciós csúcsnak megfelelő anyagok,



3. ábra. A CM Sephadex G-25 kromatográfiával nyert, biológiailag aktív C_1 frakció Sephadex G-75 gél oszlopon nyert kromatogramja. A függőleges tengelyen a 280 nm-en mért optikai aktivitás, a vízszintes tengelyen a frakciók száma látható

3. táblázat

A C_1-frakció hatása egerek lépének és veséjének in vivo DNS szintézisére. A számértékek 12 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tünetik fel

n = 10

szerv	frakció	dpm/μg DNS	eltérés a kontrolltól %	
Lép	kontroll	137±44,2	—	—
	C_1	124±42,7	−09	$p > 0{,}20$
Vese	kontroll	26±28,8	—	—
	C_1	24±20,7	−08	$p > 0{,}20$

4. táblázat

A C_1 és C_4 frakció két—két dózisának hatása timocita és csontvelő tenyészetek DNS szintézisére. A számértékek 10 egyedi mérés átlagát és az SD értékeket tüntetik fel

n = 10

tenyészet	frakció	dózis μg. fehérje/ml	dpm/μg DNS	± eltérés a kontrolltól %	p
Timocita	kontroll	—	3471±363	—	—
	C_1	100	3799±159	+09	> 0,50
	C_1	500	3518±254	+01	> 0,50
	C_4	100	3603±342	+04	> 0,50
	C_4	500	2992±186	−14	< 0,05
Csontvelő	kontroll	—	4947±580	—	—
	C_1	100	5247±709	+06	> 0,50
	C_1	500	4983±184	+01	> 0,50
	C_4	100	5239±458	+06	> 0,50
	C_4	500	4478±566	−09	> 0,50

kalibrált Sephadex G-75 oszlopon mért, megközelítő molsúlya 30 000—50 000 D tartományba esik.

Az in vitro körülmények között aktívnak bizonyult C_1 frakció anyagai hatásának szövet- illetve sejtvonal-specifikus természetét, a tüdőben mért hatásoknak az állatok lépére és veséjére gyakorolt in vivo hatásokkal összehasonlítva vizsgáltuk (3. táblázat).

E mérések eredményei szerint a tüdőben erőteljes gátlást kiváltó C_1 frakció anyagai a lép- és a veseszövetben — még a tüdőben hatásos adagot kb. 2-szeresen meghaladó dózis alkalmazása esetén is — hatástalanoknak bizonyultak.

A C_1 frakció anyagai szövet (sejtvonal) specificitását timocita és csontvelő tenyészetekben, in vitro körülmények között is ellenőriztük. Ebbe a tesztelésbe az in vivo bizonytalan hatást mutató C_4 frakciót is bevontuk (4. táblázat).

Mindkét frakciót 100 és 500 μg fehérje/ml medium koncentrációban alkalmaztuk. A C_1 frakció mindkét koncentrációban és mindkét tenyészetben egyaránt hatástalannak bizonyult. A C_4 frakció a kisebb koncentrációban mindkét tenyészetben, a magasabb koncentrációban pedig a csontvelő tenyészetben ugyancsak hatástalan volt. E frakció nagyobb dózisának timocitákban mért 14%-os gátló hatása azonban statisztikailag enyhén szignifikánsnak mutatkozott.

Megbeszélés

A tüdőszövet funkcionálisan és morfológiailag egymástól eltérő sejtekből épül föl. Az alveolusok falát nagyobb részben borító epitél réteg fő sejttípusának, a viszonylag nagyméretű, lapos, ún. 1. típusú alveoláris sejtek tekinthetők, melyek fénymikroszkóposan az alábbi, elektronmikroszkóppal is megerősített morfológiai jegyek alapján azonosíthatók (Evans és mtsai 1973): a) az alveolusok falának felszínén helyezkednek el; b) sejtmagjuk benyomul az alveolusok űrterébe; c) magjuk méretéhez képest citoplazmájuk kevés; d) nem tartalmaznak vakuolumokat, ill. inkluziós testecskéket. E sejtek fő funkciójának a gázcserét tekintik (Evans és mtsai 1973).

Az alveolaris falfelület kisebb hányadát, az 1. típusú alveoláris sejtek között szétszórtan elhelyezkedő és az alábbi morfológiai tulajdonságokat mutató, ún. 2. típusú alveoláris sejtek borítják (Evans és mtsai 1973): a) kuboidális alakúak; b) az alveolusok felszínén helyezkednek el; c) az 1. típusú alveoláris sejtekhez képest citoplazmájuk mennyisége nagyobb; d) több vakuolumot és inkluziós testecskét tartalmaznak. Funkciójukat tekintve feltételezik, hogy a szurfaktáns termelésében (Scarpelli 1968), epitéliás repair folyamatokban (Kapanci és mtsai 1969) vesznek részt. Egyes adatok szerint az alveoláris makrofágok (Bertalanffy 1964) és az 1. típusú alveoláris sejtek (Evans és mtsai 1973) progenitor sejtjeinek tekinthetők. Az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek közös alaphártyán helyezkednek el (Karrer 1956, O'Hare és Sheridan 1970).

Az alveoláris makrofágok, az alveoláris epitéliumot borító felületaktív anyag, az ún. szurfaktáns vékony, filmszerű rétegében és így tulajdonképpen az alveolusok űrterében elhelyezkedő (Novell és Thyler 1971, Kuhn és Finke 1972), nagyméretű, mononukleáris sejtek. Mint a tüdőszövet celluláris védekezésének első vonalát képviselő sejtféleségek, melyek a terminális légutakba jutó idegen anyagok eltávolításában és méregtelenítésében (Green 1970, Harris és mtsai 1970, Sorokin 1970, Cohen és Cline 1971) vesznek részt, kulcsfontosságú szerepet töltenek be a tüdőszövet ökológiájában.

Az epitéliás sejtek, ill. ezek alaphártyája alatt találhatók a kapillárisok, ill. az azokat felépítő sejtféleségek, valamint az elszórtan elhelyezkedő intersticiális sejtek (Ryan és mtsai 1969, Weibel 1970), a fibrociták is.

A fent ismertetett sejttípusok megújulását biztosító mechanizmusokra vonatkozó ismereteink meglehetősen bizonytalanok. Egyes adatok szerint az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek osztódásra képesek. Az 1. típusú alveoláris sejtek expandáló sejtpopulációt képeznek (BERTALANFFY 1964), amelyben a sejtek proliferációját a szövet növekedése kíséri. A 2. típusú alveoláris sejteket viszont őssejt-típusú, megújuló sejtpopulációnak tekintik (EVANS és BILS 1969), melyben a sejtek száma az őssejt kompartmentben az osztódás ellenére sem változik, mivel a keletkező két leánysejt egyike, képződésének helyét elhagyva, más sejtféleséggé (LEBLOND 1964), pl. 1. típusú alveoláris sejtté (EVANS és mtsai 1973) vagy makrofággá (BERTALANFFY 1964) alakul át. Minden jel arra mutat, hogy a 2. típusú alveoláris sejt proliferációs képessége jelentősen meghaladja az 1. típusú alveoláris sejt proliferációs képességét (EVANS és mtsai 1973).

Az alveoláris makrofágok folyamatosan újulnak meg (BRUNSTETTER és mtsai 1971). Eltávolításuk lehetséges útjaiként a vér (BRAIN 1970) és a nyirokkeringésbe (MENZEL 1971) történő migrációjuk, más makrofágok által történő fagocitózisuk (HEPPLESTON 1970) és a mukociliáris transzport (GREEN 1970 b) említhetők. Eredetükre nézve is eltérőek a vélemények. Egyesek szerint csontvelő eredetű őssejtek, melyek migráció útján jutnak az intersticiumba, s innen az alveolusokba (BRUNSTETTER és mtsai 1971). Mások szerint az intersticiumban osztódó prekurzor sejtekből származnak (EVANS és BILS 1969). Olyan adatok is ismeretesek, melyek szerint az érett alveoláris makrofágok osztódásra képesek és proliferációjuk révén történik a sejtpopuláció megújulása (EVANS és mtsai 1973, GOLDE és Byers 1974). Végül, mint már említettük, a 2. típusú alveoláris sejtek makrofágokká történő átalakulása is feltételezhető (BERTALANFFY 1963).

Ugyancsak korlátozottak és bizonytalanok ismereteink a tüdőszövetet fölépítő sejtek proliferációját molekuláris szinten szabályozó mediátorokról és modulátorokról. Az emlős szervezetek különféle szöveteit fölépítő expandáló és megújuló sejtpopulációk, egymástól akár nagyságrendekkel is különböző proliferációs rátája (BERTALANFFY 1969), vagy az indukált DNS szintézisnek és az azt követő proliferációnak az a sajátossága, hogy elektíven csak a szóban forgó sejtpopulációhoz tartozó sejtekre szorítkozik (SPIELHOF 1971), arra utalnak, hogy a szöveti proliferáció szabályozása — legalábbis részben — a szöveteket fölépítő sejtekre nézve szelektív, azaz sejtvonal-specifikus természetű. Ebből következik, hogy a szöveti proliferáció szabályozásában sejtvonal-specifikusan ható mediátor vagy modulátor molekuláknak, vagy legalábbis olyanoknak kell részt venniük, melyek sejtvonal-specifikus szabályozási folyamatokat indukálnak. E regulátor molekulák sejtvonal-specifikus hatását, köztük és az elektíven reagáló sejtféleségek között föllépő speciális kémiai struktúrák (receptorok) által meghatározott kölcsönhatások biztosíthatják (VORHEES és mtsai 1973, VERLY és mtsai 1974).

Egy adott sejtpopuláció proliferációját specifikusan (szelektíven) szabályozó anyagféleség, különböző sejtpopulációkat tartalmazó szövetekből történő izolálása technikailag nehéz feladat. Elvileg két út követése között választhatunk: a) a többféle sejtpopulációt tartalmazó szövetből fizikai (ultracentrifuga, cell-sorter) vagy biológiai (sejttenyészet) módszerek segítségével állítjuk elő a kívánt sejtféleség tiszta, homogén populációját, s ezt használjuk föl a szóban forgó sejtek proliferációját specifikusan szabályozó endogén anyagok extrakciójára és izolálására; b) a heterogén sejtpopulációkból felépülő eredeti szövetet extraháljuk. A sejtes eredet szerint, valamint a kémiailag is heterogén összetételű kivonatból azután, az egyetlen sejtpopulációból származó és hatását kizárólag erre a sejtpopulációra kifejtő specifikus faktor izolálását kémiai úton végezzük el, miközben a biológiai hatást célzottan kiválasztott teszt-rendszereken ellenőrizzük.

Fönt ismertetett vizsgálatainkban az utóbb említett utat követtük. Miután a heterogén kivonat a 10^5-nél nagyobb, ill. a 10^4-nél kisebb molsúlyú anyagait ultraszűréssel eltávolítottuk, a biológiai aktivitás a DEAE Sephadex A-50 oszlopon pH 7—6 grádienssel és 0,1—0,2 M sógrádiensnél két csúcsban eluálódott D_3 frakcióban volt lokalizálható. A D_3 frakciót CM Sephadex C-25 oszlopon tovább bontottuk 13 komponensre, és ekkor a biológiai aktivitás hordozója több, köztük az oszlopon nem kötődő komponenst is tartalmazó, C_1 frakció anyagai között helyezkedett el.

Hangsúlyozzuk, hogy ezekben a vizsgálatokban minden, eddig az irodalomban közlésre került tüdőszövetre vonatkozó kísérlettel szemben, a biológiai hatás mérése in vivo körülmények között történt. Az in vivo biológiai tesztelés kétségtelen hátrányai (viszonylag nagy anyagszükséglet, az értékek nagyobb szórása stb.) mellett az alábbi előnyökkel rendelkezik: a) módot ad az anyag in vivo hatékonyságának közvetlen megítélésére; b) az anyag ugyanazon állat több szövetére gyakorolt in vivo hatásának szimultán mérése által lehetővé válik a hatás szövetspecificitásának egyidejű megítélése; c) elkerülhető a mindig mesterséges környezetet jelentő in vitro rendszerek — a biológiai hatást esetleg meghamisító vagy semlegesítő — inherens bizonytalansági tényezőinek érvényesülése; d) megbízhatóbb lehetőséget biztosít a valódi inhibitor és a toxikus hatások — in vitro rendszerekben, olykor megoldhatatlan nehézségekbe ütköző — elkülönítésére.

Kísérleteinkben az aktív anyag hatásának sejtvonal-specifikus természetét több oldalról is valószínűsítettük. Autoradiográfiás méréseink szerint DNS szintézis — jelentéktelen kivételektől eltekintve — számottevő mértékben, csak az alveolusok felszínén elhelyezkedő sejtekben volt észlelhető. Mivel a különböző sejtek biztonságos megkülönböztetését lehetővé tevő hisztológiai eljárásokat kísérleteink során nem alkalmaztuk, az alveolusok felszínén DNS szintézist folytató sejtekként az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek, valamint a makrofágok jöhetnek számításba. A makrofágokra irányuló hatást azzal zárhat-

juk ki, hogy a hatékony frakció makrofágokat ugyancsak bőségesen tartalmazó lépszövetben in vivo, csontvelő tenyészetben pedig in vitro körülmények között hatástalannak bizonyult. Ezek után az aktív anyag hatásának lehetséges célsejtjeiként csak az 1. és 2. típusú alveoláris sejtek maradnak. Irodalmi adatok szerint az 1. típusú alveoláris sejtek osztódási és ennek alapján DNS szintézisének rátája a 2. típusú alveoláris sejtekétől jelentősen elmarad (EVANS és mtsai 1973). Ezért nagy valószínűséggel állítható, hogy az észlelt hatás elsősorban a DNS-t magasabb rátával szintetizáló 2. típusú alveoláris sejtekre irányul. Az anyag hatásának sejtvonal-specifikus természetét az ismertetett in vitro mérések is megerősítették. Mindezek alapján jogosnak tűnik az a feltételezés, hogy a tüdőszövet 10^4—10^5 molsúly tartományba eső anyagokat tartalmazó vizes kivonatából részlegesen tisztított fehérje frakció egy (vagy több) olyan faktort tartalmaz, melynek in vivo DNS szintézist gátló hatása a tüdőre nézve szövetspecifikus, a 2. típusú alveoláris sejtekre nézve pedig sejtvonal-specifikus természetű. A gátlás aspecifikus, toxikus eredete, egyrészt az in vivo hatás szövetspecificitása, másrészt az anyag nagy dózisának in vitro körülmények között kimutatott hatástalansága alapján kizárható.

A C_1 frakció biológiailag hatékony komponensének fehérje természetét az alábbi megfigyelések támasztják alá: a) a frakció $3—5 \times 10^4$ D molsúlyú, tehát a fehérjék nagyságrendjébe tartozó komponenseket tartalmaz; b) a frakció túlnyomó részben Folin pozitív anyagokból épül fel; c) ha a frakciót 24 órán át szobahőmérsékleten tartjuk, a biológiai hatás megsemmisíthető.

Az ismertetett kísérleti eredmények és a részlegesen tisztított biológiailag aktív anyag tulajdonságaira vonatkozó megfigyelések alapján feltételezzük, hogy a C_1 frakció hatásos anyagát $3—5 \times 10^4$ tartományba eső molsúllyal rendelkező, fehérje természetű, fiziológiás szabályozási funkciót ellátó, természetes (endogén) gátló faktor képezi. Az aktív anyag több jellemzője (molsúly-tartomány, szövetspecifikus hatás stb.) arra utal, hogy kísérleteinkben ugyanannak az anyagnak a részleges tisztítására került sor, amely HOUCK (1976) által tüdőszövetből preparált acetonszáraz por vizes kivonata ultraszűrletében is jelen volt, és amely bronchus carcinoma-sejtek in vitro tenyészetének DNS szintézisét és proliferációját sejtvonal-specifikus módon gátolta. A biológiailag aktív frakció anyagainak további tisztítására, anyagi természetének közelebbi jellemzésére, biológiai hatásának részletesebb elemzésére irányuló vizsgálatok laboratóriumunkban folyamatban vannak.

Köszönetnyilvánítás: Balázs professzornak a timocita és csontvelő sejttenyészeteken végzett tesztelésekért, Kopetty Diánának kifogástalan asszisztensi munkájáért hálás köszönetünket fejezzük ki.

IRODALOM

ATTALLAH, A. M., HOUCK, J. C.: Lymphocyte chalone. Chalones (ed. by J. C. Houck) pp. 355 North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).

BALÁZS, A.: Control of cell proliferation by endogenous inhibitors p. 179. Elsevier/North Holland Publishing Co., Amsterdam, New York. Oxford (1979).

BERTALANFFY, F. D.: Respiratory tissue: structure, histophysiology, cytodynamics. II. New approach and interpretation. Int. Rev. Cytol. **17,** 213—297 (1964).

BERTALANFFY, F. D.: Normal and malignant growth (ed. by R. J. Frey, M. L. Griem, W. M. Kirsten) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1969).

BISMARCK, B., LOZZIO, C. B., BAMBERY, E. G., LAIR, S. V.: Regulators of cell division: Endogenous inhibitors of mammalian cells. Rev. Cytol. **42,** 1—47 (1975).

BOWEN, T. J.: An introduction to ultracentrifugation. pp. 72—81 Wiley-Interscience Publishing Co., London (1970).

BRAIN, J. D.: Free cells in the lungs. Archs. intern. Med. **126,** 477—487 (1970).

BRUNSTETTER, M., HARDIE, J. A., SCHIFF, R., LEWIS, J. P., CROSS, C. E.: The origin of pulmonary alveolar macrophages. Archs. intern. Med. **127,** 1064—1068 (1971).

BULLOUGH, W. S.: The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. Biol. Rev. **37,** 307—342 (1962).

BULLOUGH, W. S.: Mitotic control in adult mammalian tissues. Biol. Rev. **50,** 99—130 (1975).

BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. Biochem. J. **62,** 315—323 (1956).

COHEN, A. B., CLINE, M. J.: The human alveolar macrophage isolation, cultivation in vitro, and studies of morphologic and functional characteristics. J. Clin. Invest. **50,** 1390—1398 (1971).

ELGJO, K.: Epidermal chalone. Cell cycle specificity of two epidermal growth inhibitors. Nat. Cancer Inst. Monogr. **38,** 71—76 (1973).

EVANS, M. J., BILS, R. F.: Identification of cells labeled with tritiated thymidine in the pulmonary alveolar walls of the mouse. Am. Rev. Resp. Dis. **100,** 372—378 (1969).

EVANS, M. J., CABRAL, L. J., STEPHANS, R. J., FREEMAN, G.: Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO_2. Amm. J. Pathol. **70,** 175—198 (1973).

GOLDE, D. W., BYERA, L. A.: Proliferative capacity of human alveolar macrophage. Nature, **247,** 373—375 (1974).

GOSPODAROWICZ, D., MORAN, J. S.: Growth factors in mammalian cell culture. Ann. Rev. Biochem. **45,** 531—558 (1976).

GREEN, G. M.: The J. Burus Amberson lecture — in defense of the lung. Am. Rev. Resp. Dis. **102,** 691—703 (1970a).

GREEN, G. M.: Alveolar macrophage transport in the early postexposure period — a new pathway? Clin. Res. **18,** 484—492 (1970b).

HARRIS, J. O., SWENSON, E. W., JOHNSON, J. E.: Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization and ultrastructure in smokers and nonsmokers. J. Clin. Invest. **49,** 2086—2096 (1970).

HEPPLESTON, A. G.: The disposal if inhaled particulate matter: a unifying hypothesis. Am. J. Path. **42,** 119—135 (1970).

HIESTAND, P. C., BOREL, J. F., BAUER, W., KIS, Z. L., MAGNÉE, C., STÄHELIN, H.: The effects of fractions (chalones) obtained from lymphoid organs on lymphocyte proliferation in vitro. Agents and Actions **7,** 327—335 (1977).

HONDIUS-BOLDINGH, W., LAURENCE, E. B.: Extraction, purification and preliminary characterization of the epidermal chalone: a tissue specific mitotic inhibitor obtained from vertebrate skin. Europ. J. Biochem. **5,** 191—198 (1968).

HOUCK, J. C.: Putative bronchial chalone. pp. 395. Chalones (ed. by J. C. Houck) North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).

HOUCK, J. C.: Lymphocyte chalone. J. Reticuloendothel. Soc. **24,** 571—581 (1979).

IVERSEN, O. H.: The history of chalones. Chalones, p. 37 (ed. by J. C. Houck) North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).

KAPANCI, Y., WEIBEL, E. R., KAPLAN, H. P., ROBINSON, F. R.: Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. Lab. Invest. **20,** 101—118 (1969).

KARRER, H. E.: The ultrastructure of the mouse lung: general architecture of capillary and alveolar walls. J. Biophys. Biochem. Cytol. **2,** 241—252 (1956).

KUHN, C., FINKE, E. H.: The topography of the pulmonary alveolus: Scanning electron microscopy using different fixations. J. Ultrastruct. Res. **58,** 161—173 (1972).

LEBLOND, C. P.: Classification of cell population on the basis of their proliferative behavior.

International symposium on the control 1 of cell division and the induction of cancer. Natl. Cancer Inst. Monogr. **14,** 119—150 (1964).

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. **193,** 265—275 (1951).

MARKS, F.: Attempts to purify and characterize a factor inhibiting epidermal DNA synthesis (G_1 chalone) Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem. **355,** 1228—1233 (1974).

MAURER, H. R., HENRY, R., MASCHLER, R.: Chalone inhibition of granulocyte colony growth in agar: kinetic quantitation by capillary tube scanning. Cell Tissue Kinet. **11,** 129—138 (1978).

MENZEL, D. B.: Alveolar macrophage. Archs. intern. Med. **127,** 1044—1045 (1971).

NOWELL, J. H., TYLER, W. S.: Scanning electron microscopy of the surface morphology of mammalian lungs. Am. Rev. Resp. Dis. **103,** 313—328 (1971).

O'HARE, K. H., SHERIDAN, M. N.: Electron microscopic observation of the morphogenesis in the albino rat lung, with special reference to pulmonary epithelial cells. Am. J. Anat. **127,** 181—205 (1975).

PAUKOVITS, W. R., HINTERBERGER, W.: Molecular weight and some chemical properties of granulocytic chalone. Blut **37,** 7—18 (1978).

PAUKOVITS, W. R., HINTERBERGER, W., PAUKOVITS, J. B.: The granulocytic chalone — a specific inhibitor of granulopoiesis: molecular weight and chemical nature. Oncology **34,** 187—189 (1977).

RUDLAND, P. S., DE ASUA, L. J.: Action of growth factors in the cell cycle. Biochim. Biophys. Acta **560,** 91—133 (1979).

RYAN, S. F., CIANELLA, A., DUNAIS, C.: The structure of the interalveolar septum of the mammalian lung. Anat. Rec. **165,** 467—484 (1969).

RYTÖMAA, T.: Biology of the granulocyte chalone. Chalones (ed. by J. C. Houck) pp. 289. North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976).

RYTÖMAA, T., TOIVONEN, H.: Chalones: concepts and results. Mech. Ageing. Dev. **9,** 471—480 (1979).

RYTÖMAA, T., VILPO, J. A., LEVANTO, A., JONES, W. A.: Effect of granulocytic chalone on acute and chronic granulocytic leukaemia in man. Report of seven cases. Scand. J. Haematol. Suppl. N° **27,** 5—28 (1976).

RYTÖMAA, T., VILPO, J. A., LEVANTO, A., JONES, W. A.: Effect of granulocytic chalone on acute myeloid leukaemia in man. A follow-up study. The Lancet 771—774 (1977).

SCARPELLI, E. M.: The surfactant system of the lung. Philadelphia, Lea and Febeger (1968).

SIMNETT, J., FISHER, J., HEPPLESTON, A.: Tissue-specific inhibition of lung alveolar cell mitosis in organ culture. Nature, **223,** 944—946 (1969).

SOROKIN, S. P.: Properties of alveolar cells and tissues that strengthen alveolar defenses. Archs. intern. Med. **126,** 450—463 (1970).

SPIELHOF, R.: The specificity of the regulation of organ growth: the effect of tissue extracts on the incorporation of tritiated thymidine in liver and kidney. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **138,** 43—48 (1971).

THORNLEY, A. L., LAURENCE, E. B.: The present state of biochemical research on chalones. Int. J. Biochem. **6,** 313—320 (1975).

VERLY, W. G., DESCHAMPS, Y., PUSHPATHADAM, J., DESROSIERS, M.: The hepatic chalone I. Assay method for the hormone and purification of the rabbit liver chalone. Can. J. Biochem. **49,** 1376—1383 (1974).

VORHEES, J. J., DUELL, E. A., BASS, L. J., HARRELL, E. R.: Role of cyclic AMP in the control of epidermal cell growth and differentiation. Nat. Cancer Inst. Monogr. **38,** 47—59 (1973).

WEIBEL, E. R.: Airways and respiratory surface of the lung. Internat. Acad. Pathol. Monogr. 8 (ed. by A. A. Liebow, D. E. Smith). pp. 1—18. The Williams and Wilkins Publishing Co., Baltimore (1970).

SEJTPOPULÁCIÓK AUTOMATIZÁLT ANALÍZISE ÉS SZEPARÁLÁSA

Ifj. GÁSPÁR REZSŐ, DAMJANOVICH SÁNDOR és SOMOGYI BÉLA

DOTE Biofizikai Intézet, Debrecen

A nagysebességű sejtanalizáló és -válogató berendezések új lehetőségeket biztosítanak a sejtbiológiai kutatások területén. A heterogén sejtpopulációk vizsgálata úgy történik, hogy folyadék-közegben felszuszpendált, egyedi sejtek analízisét optikai és elektronikus érzékelő rendszer biztosítja, kb. 10^4 sejt/sec teljesítményig. Az érzékelők által előállított, az egyedi sejteket jellemző jelek feldolgozására és megjelenítésére számos módozat áll a kísérletező rendelkezésére.

A nagysebességű sejtanalízis és -válogatás különleges előnye a korábbi sejtvizsgáló módszerekhez képest abban rejlik, hogy ez a módszer a heterogén populációt képviselő minden egyes sejtet egyedi vizsgálatnak vet alá.

A fejlett sejtanalizáló és -válogató berendezések egyszerre több analizáló módszert egyesítenek magukban, és így egyidejűleg több mérést képesek elvégezni ugyanazon a sejten. Jelenleg a legtöbb nagy teljesítményű flow-sejtanalizáló mérőberendezés a sejttérfogat, sejtektől eredő fényszórás, valamint a sejtekhez kötődő különböző fluoreszcens tulajdonságú anyagok által emittált fény sokoldalú vizsgálatára alkalmas. A technika fejlődését és sokoldaló elterjedését döntően befolyásolta annak fluoreszcens mérési módszerekkel való egyesítése. Így természetesen érdemes összehasonlítanunk a nagysebességű flow-sejtanalízist a steady-state fluorimetriával, valamint a mikroszkóp fluorimetriával.

A steady-state fluorimetriás sejtvizsgálatokkal szemben ennek a módszernek igen nagy előnye, hogy nemcsak átlag fluoreszcens jellemzők megállapítására szorítkozik, hanem azokon túlmenően betekintést nyújt egyedi sejteken végzett nagyszámú mérés alapján az azok mögött rejlő eloszlásokra is. Nagy teljesítményű megvilágító berendezése és érzékeny detektorrendszere útján érzékenységében is felülmúlja a steady-state fluoriméterek teljesítményét.

A módszer mikroszkóp fluorimetriával való összevetése már nem ilyen egyértelmű. A nagy teljesítményű flow-sejtanalizáló berendezések által egyedi sejtekről szolgáltatott információ a dolog morfológiai oldalát tekintve alatta marad a mikroszkóp fluoriméteren nyerhető információnak. A mikroszkóp fluoriméteren megvizsgálható egyedi sejtek száma azonban még automatizált

üzemmódban is csak nehezen engedi meg a vizsgált sejtpopulációra vonatkozó egyértelmű, statisztikai erejű következtetések levonását.

Új festési technikák lehetővé teszik olyan tulajdonságok érzékeny és nagy felbontású meghatározását, mint pl. a sejtek DNS-tartalma, az osztódás különböző fázisában levő sejtek aránya, stb. A sejtanalízist válogatással egybekötve új távlatok nyílnak meg a sejtbiológia előtt, mivel ezzel a módszerrel a kutató a vizsgált sejttulajdonságok előre meghatározott értéktartományába eső, különlegesnek nevezhető tulajdonságú sejtekhez juthat nagy mennyiségben és igen nagy tisztasággal.

A módszer kialakulásának rövid áttekintése

Sejtek automatizált analízisére az első kísérletek az 1930-as évek táján történtek (Moldovan 1934). Egészen az 1950-es évek közepéig a hagyományos mikroszkópia és a kapillárison történő sejtátáramoltatás kombinálásával kísérleteztek a kutatók. A modern átfolyó rendszerű sejtanalizáló berendezések fejlődése a Coulter-féle sejtszámláló és méretmeghatározó berendezés megjelenésével vette kezdetét. A Coulter kamra egy kisméretű nyílás segítségével elkülöníti egymástól a szuszpenzióban levő sejteket, és a kamrán keresztülhaladó egyes sejtek térfogatmeghatározását képes elvégezni vezetőképesség mérése alapján. A mérés eredményeként megállapítható a mérés tárgyát képező sejthalmaz térfogateloszlását jellemző hisztogram (Coulter 1956). A további fejlődést a fluoreszcens festékkel jelzett sejtek gyors átfolyó analízisének megvalósítása jelentette (Van Dilla, Fulwyler és Boone 1967). A sejteket nagy sebességgel áramoltatva egy lineárisan áramló, ún. köpenyfolyadékkal vették körül. A megvilágítás eredményeként fellépő fluoreszcens fényt a megvilágító fénysugár irányához képest 90°-os szögben észlelték. A mérések eredményeként a sejtektől észlelt fluoreszcencia intenzitás eloszlását jellemző hisztogramot nyertek. A technikai fejlődés eredményeként a gerjesztésre használt hagyományos fényforrásokat nagy teljesítményű lézer fényforrások váltották fel (Van Dilla, Trujillo, Mullaney és Coulter 1969). A sejtek fluoreszcens tulajdonságok alapján történő jellemzése mellett mind a festett, mind pedig a festetlen sejtektől származó fényszórás is módot nyújt a sejtek alak és méret szerinti megkülönböztetésére. A kis szögben szórt fény intenzitása a szóró részecskék térfogatával arányos, így kényelmesen felhasználható paraméter a sejtek azonosítására, jellemzésére (Mullaney és Dean 1969).

Az első multiparaméteres átfolyó rendszerű sejtanalizáló berendezést Kamentsky és mtsai írták le 1965-ben. Berendezésük már lehetővé tette az átáramoltatott sejtektől eredő kisszögű fényszórás és a sejtek UV abszorpciójának egyidejű észlelését (Kamentsky, Melamed és Derman 1965). A multiparaméteres berendezések további fejlődése egyrészt a sejtektől származó

fluoreszcencia, fényszórás és a Coulter kamrás sejttérfogat-mérés egyidejű, nagysebességű kivitelezésére épült, másrészt egyes paraméterek, mint pl. a sejtektől eredő különböző szögek alatti fényszórás, két festéktől eredő fluoreszcencia észlelését célozta. A módszer legmodernebb eredményei közé tartozik a fluoreszcencia anizotrópia alapján történő sejtanalízis, valamint az energiatranszfer folyamatok nyomonkövetése egyedi sejteken sejtpopulációkban (CHAN, ARNDT—JOVIN és JOVIN 1979). A sejtek nagysebességű átáramoltatásos analízisén túlmenően azok automatikus szétválogatására alkalmas elvet először FULWYLER (1965) közölt. A sejteket a Coulter kamrás térfogatmérés után az áramló folyadéksugárból kialakított cseppekbe foglalta, és a folyadékcseppeket a mérés eredményének megfelelően elektromos töltéssel látta el. Az analízis eredményének megfelelően különböző előjelű elektromos töltéssel rendelkező, illetőleg töltés nélküli cseppek megfelelő elektrosztatikus tér segítségével eltéríthetők és különböző gyűjtőedényekbe felfoghatók. A módszer továbbfejlesztéseként született meg a fluoreszcencia aktivált sejtszeparálás elve. A fluoreszcens festékkel jelzett sejteket egy fúvókából kiáramló folyadéksugár közepébe irányítják és teszik ki a gerjesztő fénysugár hatásának. Az emittált fluoreszcens fényt egy mikroszkóp-fotodetektor elrendezés segítségével analizálva, a FULWYLER által kidolgozott elv szerint végzik el a sejtek szeparálását (HULETT, BONNER, BARRETT és HERZENBERG 1969). A módszert azóta két különböző szintű fluoreszcens fény egyidejű detektálására, valamint az ezekkel egyidejű sejttérfogat és szórt fény detektálására is továbbfejlesztették. A fenti elrendezés egyben módot nyújt megfelelő polárszűrők segítségével egyedi sejtektől származó fluoreszcencia anizotrópia mérésekre sejtpopulációkon, illetőleg megfelelő szűrőkombinációk alkalmazásával a sejten belüli energiatranszfer folyamatok mérésére.

Kettős fluoreszcens jelzést alkalmazva a vizsgált sejttulajdonságok nyomonkövetésére előfordulhat a festékek emissziós spektrumának olyan kedvezőtlen átfedése, ami meggátolhatja az egyes festékektől származó fluoreszcencia intenzitások egymástól elkülönülő észlelését. Az ilyen jellegű nehézségek áthidalására és egyben a vizsgált sejtparaméterek számának kiterjesztésére valósították meg a kettős lézer gerjesztésű flow-sejtanalizáló és -szeparáló készüléket (STEINKAMP, ORLICKY és CRISSMAN 1979). Ez a készülék két különböző hullámhosszon működő lézer fényforrás fókuszált fényével gyors egymásutánban megvilágítva veti alá analízisnek a folyadékáramban mozgó sejteket, észleli a sejtek által tartalmazott festékektől eredő fluoreszcenciát.

A flow sejtvizsgáló eljárások fejlődésének egyik jelentős eredményeként könyvelhető el a STOVEL és SWEET által a közelmúltban kifejlesztett elv, amely szerint egyedi sejteket lehet szeparálni (STOVEL és SWEET 1979). Az általánosan alkalmazott sejtválogatási módszerek egyik hiányossága, hogy a mérések alapján kijelölt osztályba sorolt sejteket mint a kiinduló, heterogén sejtpopuláció alpopulációit szeparálja és bocsátja a kísérletező rendelkezésére. Így a vizsgálat

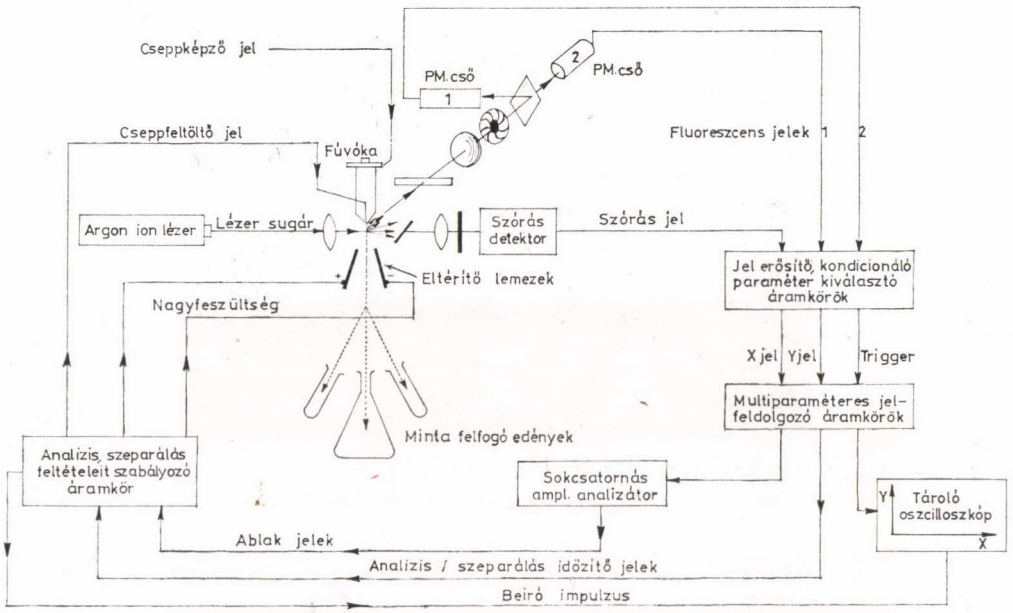
során az egyedi sejtekről megszerzett információ nagy része elvész. Az egyedi sejtek szeparálására alkalmas módszer ezt a kérdést úgy oldja meg, hogy a szeparálásra kiválasztott sejteket egy mikroszkóp tárgylemezre, annak kitüntetett és utólag azonosítható helyeire helyezi el egyenként. A sejtanalízis eredményét a fenti folyamattal paralel egy számítógépes adattároló rendszer segítségével egyedi sejtenként elraktározza. Ilyen módon az analízis során adott tulajdonságúnak mutatkozó egyedi sejtek utólag könnyűszerrel vizsgálatnak vethetők alá.

A fluoreszcencia aktivált sejtanalizátor és -szeparátor

Az alábbiakban egy tipikusnak nevezhető multiparaméteres sejtanalizálásra és -szeparálásra alkalmas berendezés elvét foglaljuk össze. Az egyszerűbb tárgyalhatóság kedvéért az egyedi sejtekre vonatkozó, egyidejűleg észlelhető paraméterek számát háromra korlátozzuk, nevezetesen a sejtektől eredő szórt fény, valamint két különböző hullámhosszal jellemezhető fluoreszcens fény intenzitására. A szórt fény intenzitása, valamint a fluoreszcens fényintenzitások megfelelő jelzési technikák esetén a sejt biológiai állapotát tükröző adatokká válhatnak. A sejtszeparálás megengedi, hogy az analízis során alkalmazott paraméterek meghatározott értéktartományába eső tulajdonságokkal bíró sejteket fizikailag elkülönítsük a kiinduló heterogén sejtpopulációból. Így lehetővé válik a kiválasztott tulajdonságú sejtek további vizsgálata, illetőleg a kiválasztott tulajdonságú sejtekben feldúsított minta előállítása.

Az analízis és szeparálás elvét az 1. ábra szemlélteti. A fluoreszcens festékkel jelölt sejtszuszpenzióból a sejteket a fúvókába juttatjuk a mintára gyakorolt külső nyomás segítségével. A fúvókában a sejteket egy laminárisan áramló köpenyfolyadékkal vesszük körül. A fúvókából kilövellő folyadéksugár merőlegesen metszi a megvilágításra használt lézer fókuszált nyalábját. Ez egyben azt jelenti, hogy a folyadéksugárban áramló sejtek egyenként elhaladnak a lézersugár előtt, amely fluoreszcenciára készteti a sejtek által tartalmazott festékmolekulákat. A fókuszált fénysugár egyben szóródik is az előtte elhaladó sejteken. A legújabb vizsgálatok szerint a kis részecskék (átmérő kisebb, mint 1 μm) morfológiája kihat a rugalmas fényszórási jelekre, ha a lézersugár irányával ellentétes irányban történik a detektálás. Hasonlóan, a vizsgált részecskén belüli festékeloszlás erősen befolyásolhatja a fluoreszcencia útján nyert információt.

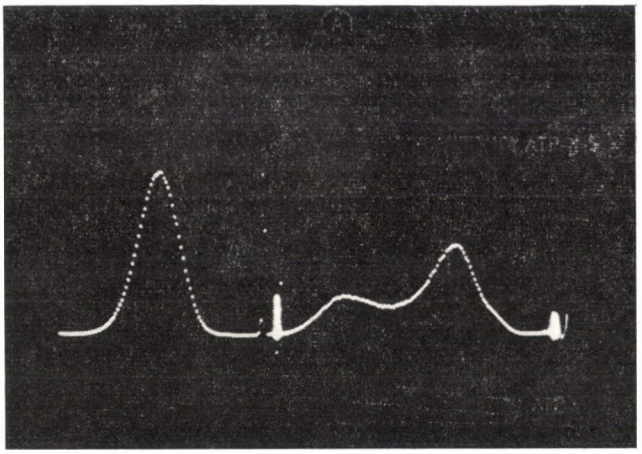
A fluoreszcencia észlelésére épülő, a folyadéksugárba foglalt sejteket a sugárra merőleges lézernyalábbal megvilágító, flow-rendszerek felbontását nagymértékben befolyásolja a mintából (sejtek) nyerhető jel intenzitása. A legintenzívebb sejtfluoreszcenciák (DNS festékek) esetén a fluoreszcencia intenzitás segítségével detektált tulajdonság 3%-os ingadozása az elérhető alsó



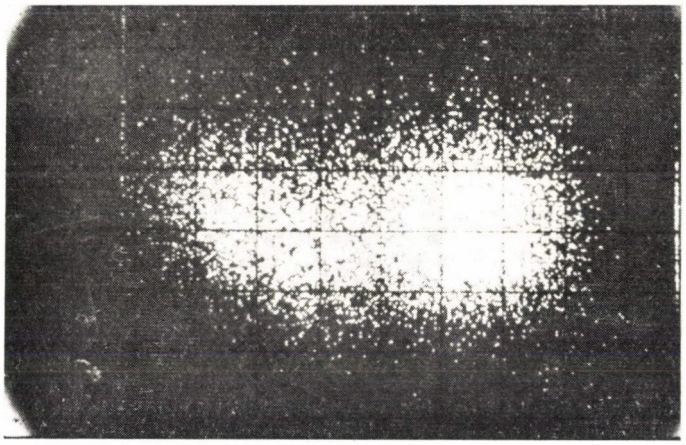
1. ábra. A multiparaméteres sejtanalizálás és -szeparálás elve

határ, és ezt a folyadéksugár hidrodinamikája, a megvilágítás intenzitásának ingadozása, valamint a nem egyenletes festés okozzák. A leggyengébb fluoreszcenciák észlelésénél (sejtfelületi jelölések) az észlelt fluoreszcencia-intenzitás ingadozását főként az optikai szűrők fluoreszcenciája, valamint a folyadékáramban levő fluoreszkáló részecskék okozzák. A két extrém közötti fluoreszcencia-intenzitások esetén a felbontást főleg a jelet képviselő fotoelektronok statisztikus ingadozása szabja meg.

Az optikai érzékelőtől (PM cső 1—2, szórás detektor) származó alacsony szintű elektromos jeleken előzetes átalakításokat (erősítés, sorrendbe állítás stb.) kell végrehajtani, mielőtt a jeleket a multiparaméteres jelfeldolgozó áramkörbe juttatjuk. A multiparaméteres feldolgozás a különböző fluoreszcens-, illetőleg szórás-jelek igen sokféle analízisét teszi lehetővé. Lehetőség nyílik az egyes paraméterek önálló vizsgálatára, valamint azok különféle módon egymáshoz rendelt analízisére is. A sokcsatornás amplitúdó analizátor a feldolgozott jelek tárolását és megjelenítését szolgálja jelamplitúdó-relatív gyakoriság-hisztogramok formájában. A 2. ábrán humán diszkocitákból és szferocitákból álló, glutáraldehid fixált sejtpreparátumtól származó fényszórás és fluoreszcencia-intenzitás eloszlásokat jellemző hisztogramokat mutatunk be. A legtöbb modern berendezés lehetővé teszi kiválasztott két paraméter egyidejű és egymáshoz tartozó analízisét is. Az 1. ábrán vázolt berendezés az ilyen típusú analízist tároló oszcilloszkóp segítségével valósítja meg. A tároló oszcilloszkóp



2. ábra. Humán diszkocitákból és szferocitákból álló glutáraldehid fixált sejtpreparátum fényszórás- (bal) és fluoreszcencia-intenzitás eloszlása (jobb)



3. ábra. A 2. ábrán feltüntetett fényszórás- és fluoreszcencia-intenzitás eloszlások együttes ábrázolása a kettős paraméter-analízis eredményeként. A függőleges tengely mentén a fluoreszcencia-intenzitás értékét, a vízszintes tengely mentén a fényszórás-intenzitást tüntettük fel. Az egyes paraméterérték-kombinációkhoz tartozó fénypontok intenzitása az adott paraméter-kombináció mintán belüli előfordulási gyakoriságával arányos

pontíró (dot plot) üzemmódjában a kiválasztott két paraméter háromdimenziós amplitúdó-eloszlását képes megjeleníteni. Ilyenkor az egyes egymáshoz tartozó, különböző paraméterérték-kombinációk egy-egy pontnak felelnek meg a képernyőn és az illető pont intenzitása arányos az adott paraméter-kombináció előfordulási valószínűségével. A 3. ábra a fentebb ismertetett preparátum egymáshoz tartozó fényszórási és fluoreszcens tulajdonságait mutatja be.

Az analízist követően a sejteket hordozó összefüggő folyadéksugár cseppekre bomlik fel. A cseppképződés egységességét a fúvóka nagyfrekvenciás

(40 kHz) rázásával segítjük elő. A köpenyfolyadék és a minta keverési arányának szabályozásával elérhető, hogy a kialakuló cseppeknek csak mintegy 2%-a tartalmaz sejtet. Ez a hatásos analízis és szeparálás egyik előfeltétele (FULWYLER 1965). A feldolgozott fluoreszcens és fényszórás-jelek aktiválják a sejtszeparáló elektronikát. A sejtpopuláció egy részének megvizsgálását követően az amplitúdó-analizátoron megjelenített hisztogramok segítségével az analizált paraméterekre vonatkozóan kitüntetett amplitúdótartományok („ablakok") jelölhetők ki. Amennyiben a továbbiakban egy sejttől észlelt jelek az előre kitüntetett amplitúdótartományba esnek, a szeparáló áramkör működésbe lép. Megfelelő késleltetéssel a vizsgálat tárgyát képező sejtet tartalmazó folyadékcseppet a folytonos folyadéksugárról való leválás előtti pillanatban töltéssel látja el. A folyamat eredménye tehát néhány feltöltött folyadékcsepp lesz, melyek közül egyikben található az előbb analizált és elválasztásra kijelölt sejt. Az eltérítő lemezek közötti áthaladás során a cseppek a kialakított sztatikus elektromos tér hatására eltérülnek és a kijelölt mintafelfogó edénybe jutnak. Azok a sejtek, amelyek jellemzőikkel nem esnek bele az előre kiválasztott értéktartományba, nem váltják ki a cseppfeltöltő impulzus képződését. Így az ilyen sejteket tartalmazó, valamint az üres cseppek eltérítés nélkül hullanak le a középső mintafelfogó edénybe. Amennyiben egymást követő két vagy több csepp is tartalmaz sejtet, és a sejtek szétválasztása a fentebb vázolt okok miatt bizonytalanná válna, a cseppfeltöltő elektronika nem lép működésbe, és ezek a cseppek is eltérítés nélkül hullnak alá. Ilyen módon a minták nagyfokú tisztasága biztosítható.

Az elválasztott minták a fenti eljárás után további citológiai vizsgálatnak vethetők alá, illetve további kísérletek végezhetők velük.

A multiparaméteres sejtanalízis és -szeparálás alkalmazásai

Az automatizált sejtanalízis és -szeparálás a sejtpopulációkon végezhető vizsgálatok igen változatos módját teszi lehetővé. Az utóbbi években ezen a téren végzett kutatómunkát jellemzi, hogy az egyidejűleg, egyedi sejtektől összegyűjthető információ, az egyidejűleg mérhető paraméterek száma a technikai fejlődés eredményeként jelentősen megnövekedett. Ez egyrészt következménye, másrészt előmozdítója egyre újabb, a sejtpopulációk jelzésére alkalmas technikák kidolgozásának.

A multiparaméteres sejtanalizáló berendezések segítségével végezhető fényszórás, fluoreszcencia intenzitás és anizotrópia mérések során vizsgálható sejttulajdonságokat részletezi az 1. táblázat. Az automatizált sejtanalízis és -szeparálás alkalmazásait illetően a közelmúltban a következő kutatási területeken születtek jelentős eredmények:

— Sejtek életciklusának követése sejtpopulációkban. Az osztódás különböző fázisaiban levő sejtek elkülönítése.

1. táblázat

A multiparaméteres sejtanalízis segítségével vizsgálható sejtparaméterek

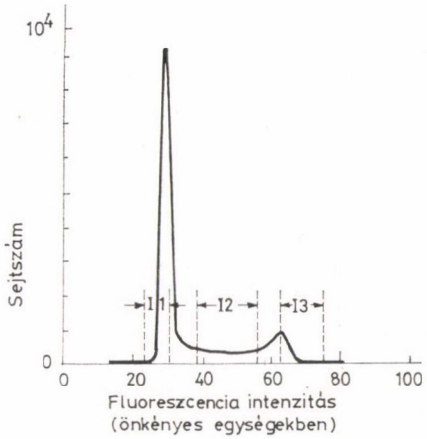
Fényszórás	Fluoreszcencia intenzitás	Fluoreszcencia anizotrópia
Sejtméret (citoplazma/mag)	DNS-tartalom	Sejtmembrán mikroviszkozitása
Sejtek életképessége	RNS-tartalom	Citoplazma mikroviszkozitása
Morfológiai paraméterek	Lektinkötő képesség	DNS-hez kötődő fluorokrómok rotációja
Abszorbeáló festékek jelenléte	Sejten belüli enzimaktivitás	Sejtalkotórészek térközelsége
Sejttörmelékek jelenléte	Antitest/antigén kötődés	
	Sejtek életképessége	
	Sejtmembrán/citoplazma fluiditás	
	Sejtalkotórészek térközelsége	

— Tumorsejtek analízise és szeparálása.
— Gyógyszerek hatásának vizsgálata sejtkultúrákon.
— Receptorok mobilitásának, felületi sűrűségének vizsgálata.
— Kromoszóma-populációk vizsgálata és szeparálása.

A továbbiakban konkrét példákon keresztül mutatjuk be a fenti kutatási területeken végzett munka jellegét, a multiparaméteres sejtanalízis és -szeparálás technikájának alkalmazási módját és az elért eredményeket. A különböző sejttulajdonságok, valamint sejtalkotórészek jelölésére alkalmazható fluoreszcens festékek és festési technikák részletes ismertetésétől eltekintünk az ebben a témakörben megjelent kitűnő összefoglalókra utalva (Stryer 1968, Chance, Lee és Blaric 1971, Brand és Gohlek 1972, Thaer és Sernetz 1973, Azzi 1975, Chen és Edelhoch 1975, Marsh 1975, Apple, Merscher, Hirschfelder és Keefe 1976).

Sejtek analízise és elválasztása DNS-tartalom alapján

Kínai hörcsög ovárium sejtekkel (CHO sejtek) végzett kísérletekről számol be Crissman és Steinkamp (1973). A vizsgált sejtpopuláció DNS-tartalmának meghatározására propidium-jodidot használtak. Ugyanakkor, ^{3}H-timidin beépülését vizsgálva, a sejtek osztódási fázisára nézve kívántak következtetéseket levonni. A heterogén sejtpopuláció fluoreszcencia-intenzitás eloszlásában két jól elkülönülő csúcsot észleltek (4. ábra). Nagyság szerint növekvő sorrendben a G_1 fázisban levő sejtekhez rendelhető az első csúcs, míg a második csúcs a kétszeres DNS-tartalommal rendelkező G_2 + M fázisban levő sejtek jelenlétét jelzi. A DNS-t szintetizáló S fázisban levő sejtek a két csúcs közötti



4. ábra. Propidium jodiddal jelzett CHO sejtek DNS-eloszlását jellemző hisztogram. Az ábrán feltüntettük a kísérletek során sejtválogatás szempontjából kitüntetett fluoreszcencia-intenzitás tartományokat (I1—I3, CRISSMAN és STEINKAMP nyomán)

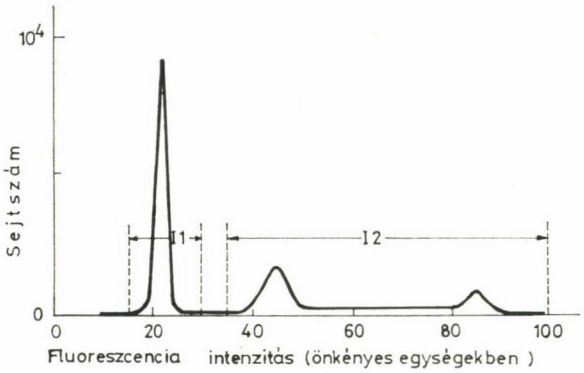
tartományban jelentkeznek köztes fluoreszcencia-intenzitás értékekkel. A fluoreszcencia-intenzitások alapján definiált, egyes fenti tartományokhoz rendelhető sejteket szeparálták, és az így nyert mintákat autoradiográfiás technikával megvizsgálták. A G_1 frakcióba tartozó sejtek 4%-a bizonyult ^{3}H-jelzettnek, ezt a hatást a korai S fázisban levő sejteknek tulajdonították. A G_2 + M frakcióban levő sejtek radioaktivitást mutató 19%-a pedig a kései S fázisban levő, illetőleg a jelölés alatt S fázisból G_2-be került sejteknek tulajdonítható. Az S fázisban levő elkülönített sejtek 93%-a bizonyult jelöltnek.

A DNS-tartalom mérése emlős sejtekben, valamint a DNS-tartalom alapján történő sejtszeparálás általában feltételezi a sejtek rögzítését, valamint egyéb olyan kezelési eljárások alkalmazását, amelyek a sejtek életképességét jelentősen befolyásolják. Biszbenzimidazol típusú festékeket (Hoechst 33258 és 33342) alkalmazva ARNDT-JOVIN és JOVIN (1977) multiparaméteres számítógép-vezérelt sejtszeparátoruk segítségével élő sejteket jellemeztek a sejtciklus különböző fázisaiban, valamint egymástól szétválasztották a G_1, S, G_2 + M fázisokat is az élő heterogén sejtpopulációból. Az így szeparált sejteket szövetkultúrában továbbtenyésztve, azok életképesnek bizonyultak (90%).

Tumor sejtek analízise és szeparálása DNS és sejttérfogat mérések alapján

Metilkolantren-indukált egérhámsejt karcinóma (MCA-1) sejtek DNS-tartalmának eloszlását vizsgálták akriflavin-Feulgen festést alkalmazva CRISSMAN és STEINKAMP (1975). Három elkülönülő alpopulációt észleltek a fluoreszcencia-intenzitás eloszlás mérések során, melyek a normál 2 egységnyi diploid DNS-tartalommal rendelkező, valamint a 4 és 8 egységnyi DNS-tartalommal

rendelkező sejteknek feleltek meg (5. ábra). A heterogén sejtkeveréket az analízis után a sejtek DNS-tartalma alapján két részre szeparálták. Az első csoportba a normál DNS-tartalmú sejteket különítették el, amelyek leukocitáknak bizonyultak. A másik csoportba a megnövekedett DNS-tartalmú sejteket válogatták ki. Ezen utóbbi populációról a további in vitro kísérletek során be-



5. ábra. Egér karcinoma sejtek DNS-tartalmának eloszlása akriflavin-Feulgen festést alkalmazva. A kísérletek során alkalmazott válogatási régiók (I1—I2) feltüntetésével (CRISSMAN nyomán)

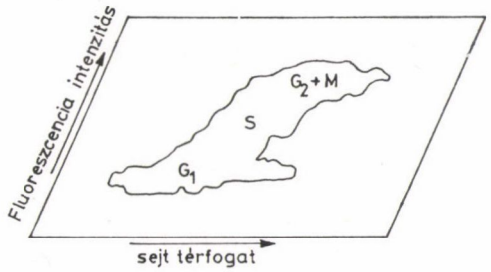
bizonyosodott, hogy G_1 és G_2 + M fázisban levő tumorsejteket és a két csúcs között S fázist képviselő sejteket tartalmazott.

Más típusú tumorsejtek, melyekre a DNS-tartalom emelkedése nem jellemző, csakis ilyen alapon nem azonosíthatók. További paraméterek alkalmazása is szükséges lehet azonosításukhoz, illetőleg több paraméter együttes mérése nyújthat felvilágosítást ilyen esetekben. Így pl. a DNS- és fehérjetartalom, sejttérfogat-mérések, a mag és citoplazma méretek viszonya, széles szögtartományban végzett fényszórás-analízis, egyéb enzimatikus és antigén jelleget hordozó tulajdonságok vizsgálata vezethet ilyen értelemben célhoz.

RAJU és munkatársai (1974) egér tumorsejteken (KHT szarkoma) vizsgálták a DNS-tartalom és a sejttérfogat közötti összefüggést. Az akriflavin—Feulgen DNS-tartalom megoszlást hasonlónak észlelték, mint azt a fentiekben vázoltuk az általuk vizsgált tumorsejtekre vonatkozólag is. A sejtek térfogateloszlása azonban a három csúccsal rendelkező fluoreszcencia-eloszlással szemben csak két csúcsot tartalmazott. A jellegzetes fluoreszcencia intenzitástartományokat alapul véve, az analízist csak az ezen az intenzitás-tartományon belüli tulajdonsággal rendelkező sejtekre korlátozva meghatározták a kétszeres, valamint a négy- és nyolcszoros DNS-tartalmú régiókhoz tartozó térfogattartományokat. A kísérletek eredményeként bebizonyosodott, hogy a teljes tumorsejt populációt jellemző két csúccsal bíró sejttérfogat-eloszláson belül a kisebb mérethez tartozó csúcs a leukocitákhoz, a nagyobb mérethez rendelhető csúcs pedig a tumorsejtekhez tartozik.

Gyógyszerrel kezelt sejtkultúrák analízise DNS és sejttérfogat mérések alapján

A DNS-tartalom nagyszámú sejten egyenként történő meghatározása lehetővé teszi a sejtciklusra ható kemoterápiás ágensek hatékony vizsgálatát. A sejtszeparátorral a G_1, S, G_2 + M fázisban levő sejtek aránya gyorsan és



6. ábra. Akriflavin-Feulgen festéssel jelzett CHO sejtek DNS-tartalmának kettős-paraméter analízise (TOBEY és mtsai nyomán)

pontosan meghatározható az alkalmazott gyógyszer dózisa, valamint az idő függvényében (TOBEY és CRISSMAN 1972). A sejt térfogata vagy összfehérje-tartalma jól tükrözi a sejt bioszintetikus képességét, így ezen paraméterek a DNS-tartalom meghatározással együtt jól szolgálhatják a gyógyszerek hatásának tanulmányozását. 1=(2=kloretil)=3(=)4-metilcyklohexil) = 1 =nitrozoureával kezelt CHO sejtek DNS-tartalmát és térfogatát vizsgálták mint szimultán paramétereket. A sejteket akriflavin-Feulgen eljárással kezelték. A kezdetben aszinkron növekvő sejtek a tipikus G_1, S, G_2 + M fázisok jelenlétére utaló fluoreszcencia-intenzitás eloszlást mutatták (6. ábra). Szinkronizált CHO sejtekkel kimutatták, hogy a fluoreszcencia és a sejttérfogat közül bármelyik paraméter önmagában is egyértelműen jellemzi a szinkron populáció állapotát a sejtciklus folyamán. A kísérletek ugyanakkor arra utaltak, hogy az említett vegyülettel kezelt sejtek a késői interfázisban (G_2) állapodtak meg a sejtek térfogatának egyidejű jelentős növekedésével. A gyógyszeres kezelés hatására tehát a sejtek a késői interfázisban megrekedtek, elvesztették osztódó képességüket, ezzel egyidőben azonban nem szűntek meg egyes makromolekulákat szintetizálni.

Sejtek felületi lektinkötő képességének analízise sejtkultúrákon

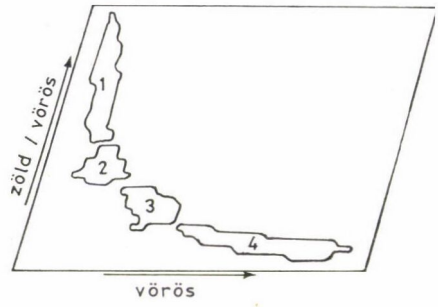
Flow mikrofluorimetriás méréseket először KRAEMER és mtsai (1973) végeztek fluoreszcein-jelzett növényi lektinek telítési kötődésének tanulmányozására állati sejteken. Vizsgálataikban az egyedi sejtek teljes felületi kötő-

képességét jellemző hisztogramokat állítottak elő számos sejtkultúrára vonatkozólag. Mivel a lektinkötő képesség leginkább a sejtmérettől függ, az egységnyi felületre vonatkoztatott kötőképesség mérése is szükségessé vált. Négy különböző sejtvonalat összehasonlítva azt tapasztalták, hogy a kötőképességben észlelt egyes különbségek a sejtméretbeli különbségekre vezethetők vissza, míg az egyes sejtvonalak közötti lektin kötőhelybeli differenciák is jelentősek lehetnek. Például a He-La törzs sejtfelülete nagyobbnak bizonyult, mint a Tl törzsé, ugyanakkor a kötőhely-sűrűségre vonatkozóan fordított arány áll fenn.

Emlős leukociták differenciál analízise és szeparálása

Acridine orange jelzett humán leukociták kettős fluoreszcens jelzés alapján történő differenciál analíziséről számol be ADAMS és KAMENTSKY (1971). A vizsgált sejteken belül három alpopulációt sikerült megkülönböztetni (limfociták, monociták és granulociták), és a szeparálás után azonosítani (7. ábra). A kettős fluoreszcens jelzést úgy alkalmazták, hogy a két hullámhosszon észlelt fluoreszcens fényintenzitás arányát használták fel a sejtek jellemzésére. Hasonló módszert alkalmazott STEINKAMP és ROMERO (1974) további két limfocita csoport azonosítására, amelyeket kis és nagy típusokként tartanak számon.

Hasonló klasszifikálások történtek a kettős fluoreszcens jelzési módszerrel állati eredetű leukocitákra vonatkozólag is. Acridine orange esetében a zöld fluoreszcens fény a magtól, míg a vörös a citoplazmatikus granulumoktól ered. Humán leukociták fluoreszcens alapon történő osztályozása mellett a festetlen leukociták is különböző morfológiai típusokba sorolhatók a szimultán két különböző szög alatt észlelt fényszórási intenzitások alapján (SALTZMANN, CROWELL, MARTIN, TRUJILLO, ROMERO és MULLANEY 1975). A leukocitákon szóródó fényt a megvilágító lézersugár irányával egyirányban 1°-on belül és az erre az irányra merőlegesen 90° alatt egyszerre észlelték a fluoreszcencia csatornában levő takarás, tükrök és különböző szűrők kiiktatása után. A két különböző szög



7. ábra. Humán leukociták klasszifikálása acridine-orange vörös és zöld fluoreszcencia alapján. *1.* kis limfociták; *2.* nagy limfociták; *3.* monociták; *4.* granulociták (STEINKAMP és mtsa nyomán)

alatt koincidenciában észlelt szórt fény intenzitások logaritmusait ábrázolva egy derékszögű koordináta-rendszer merőleges tengelyeire, az egyes intenzitás-kombinációk relatív előfordulási számait feltüntetve az előző két tengelyre merőleges harmadikra, az így nyert háromdimenziós előfordulási gyakoriság-hisztogram módot nyújt a leukociták osztályozására. Ezzel a módszerrel a leukociták három csoportját tudták megkülönböztetni (neutrofilek, monociták és limfociták). További tervek léteznek több mint két szög alatti szimultán fényszórás detektálására és az így kapott adatok számítógépes feldolgozására különböző minta-, illetve alakfelismerő algoritmusok segítségével.

Mag- és citoplazma méretek vizsgálata sejtpopulációkban

A flow rendszerek felhasználhatók sejtek analízisére és szeparálására azok mag- és citoplazma méretviszonyai alapján. A magméret jelzésére fluoreszcens festési technika alkalmazható, míg a citoplazma méretének meghatározása a fényszórási paraméterek alapján történhet. STEINKAMP és CRISSMAN (1974) L929 sejtkultúrán végzett propidium jodid — fluorescein izotiocianát kettős fluoreszcens jelzést alkalmazva vizsgálatokat. A sejtek magátmérője és DNS-tartalma közötti arányosságot már korábban kimutatták (BAETCKE, SPARROW, NAUMAN és SCHWEMMER 1967). A flow módszer esetében a magátmérő mérésére a fluoreszcens jel időtartamának vizsgálata nyújt módot. A kapott DNS-tartalom eloszlásra, ill. magátmérő eloszlásra vonatkozó görbék összehasonlítása a módszer ilyen jellegű vizsgálatokra való alkalmazhatóságát bizonyítja. A citoplazma átmérőjének vizsgálatára mind a fluoreszcens technika, mind pedig a fényszórás vizsgálatok megfelelőnek bizonyultak. A citoplazma átmérőjének meghatározása a jelzett sejtektől eredő zöld fluoreszcens fény időtartamának mérésén alapul. A fényszórási jel a sejttérfogattal arányos, és MULLANEY és DEAN (1969) vizsgálata alapján a sejtek fehérjetartalmának eloszlásához hasonló. A citoplazma átmérője ismét a fényszórási jel időtartamának mérésével jellemezhető egyértelműen. A magméret és citoplazma-méret eloszlások alapján sikeresen diagnosztizáltak nőgyógyászati mintákat (STEINKAMP és CRISSMAN 1974).

Sejtek analízise és szeparálása fluoreszcencia anizotrópia alapján

A fluoreszcencia anizotrópia mérések a fluoreszcencia intenzitás méréseken túlmenően is információt nyújthatnak a sejtek és sejtalkotórészek különböző állapotairól. A sejteket megfelelő fluoreszcens jelzéssel ellátva, az emittált fluoreszcens fény anizotrópiáját mérve tanulmányozhatóvá válnak egyes dinamikus membránstruktúrára, illetőleg -funkcióra jellemző sajátságok, mint pél-

dául a membrán lipidek viszkozitása, valamint a membrán felületéhez kötődő lektinek mozgékonysága. Az első ilyen irányú kísérleteket sejtpopulációkon flow mikrofluorimetriás módszerrel ARNDT-JOVIN és JOVIN végezték (1976). Az általuk használt berendezés az egyszerű analízisen túlmenően alkalmas a sejtek nagy teljesítményű szétválogatására is az észlelt polarizációs sajátságok alapján. Az így szeparált sejtek sterilek, életképesek és további biokémiai vizsgálatnak vethetők alá. A flow rendszereken végzett fluoreszcencia anizotrópia mérések citológiai alkalmazásait foglalja össze a 2. táblázat.

2. táblázat

A flow anizotrópia mérések citológiai alkalmazásai

1. Membrán mikroviszkozitás meghatározása difenil hexatriennel. A sejt differenciálódására ható kémiai ágensek vizsgálata Friend-vírussal transzformált sejteken.
2. Normális és leukémiás sejtek membránfluiditásának vizsgálata.
3. Kovalens és nemkovalens jelző vegyületek alkalmazása felületi és intracelluláris sajátságok kimutatására.
4. Intracelluláris mikroviszkozitás mérése emlős sejtekben fluoreszcein diacetát segítségével. Sejtciklus, ozmolaritás és kolóniaképző hajlamot befolyásoló vegyületek hatásának vizsgálata.

LINDMO és STEEN (1977) fluoreszcein diacetát jelzett sejtek polarizációs méréseiből azt a következtetést vonta le, hogy a sejteken belüli mikroviszkozitás állandónak tekinthető a teljes sejtciklus alatt, míg a sejteket körülvevő közeg ozmolaritása igen jelentősen befolyásolja a mikroviszkozitás alakulását.

Receptorok mobilitásának és térbeli távolságának mérése energiatranszfer segítségével

A sejtfelülethez kötődő anyagok helyi sűrűsége, valamint újraeloszlása a sejt felszínén a metabolikus állapotot és a sejtfunkciót jól jellemző paraméterek. A receptorok mozgása a sejtmembránokban, valamint a ligandok megkötése utáni újrarendeződésük feltételezhetően a sejt-sejt felismerés, valamint a proliferáció szabályozásának fontos tényezője. A receptor-sűrűség és -mozgékonyság vizsgálata a membrán fluiditás, ill. a sejtcikluson belüli állapot függvényében jól követhető a flow rendszerek segítségével.

A két fluoreszcens kromofor közötti rezonancia-transzfer módot nyújt a membránalkotórészek közötti térbeli viszonyok tanulmányozására. Az ilyen típusú mérések különös előnye, hogy spektroszkópiai eszközökkel érzékeny távolságmérést tesznek lehetővé tipikusan 10—100 Å távolságtartományban elhelyezkedő kromoforok között. Ugyanakkor a flow rendszerek érzékenysége maximálisan kihasználható, mivel a mérések fluoreszcencia-intenzitás mérésekre vezethetők vissza. Nem utolsósorban az is előnye a módszernek, hogy a jelenséget leíró elmélet jól megalapozott.

Az energiatranszfer mérések esetén azonban néhány körülményre tekintettel kell lenni:

a) A donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumainak kellő átfedést kell mutatniuk.

b) A két molekula relatív orientációja és annak változása kihat a transzfer hatásfokára.

c) Megfelelően magas donor kvantumhatásfok és akceptor extinkciós koefficiens szükséges a kísérlethez.

d) A donor és az akceptor molekulák között 10—100 Å közötti távolságban teszi lehetővé a módszer a mérést, továbbá a távolság változására igen érzékeny, ui. a kromoforok távolságának hatodik hatványával változik a hatásfok.

CHAN és a JOVIN házaspár (1979) számolnak be először az energiatranszfer mérések alapján történő multiparaméteres sejtanalízisről és -szeparálásról. Méréseik során több szimultán paramétert alkalmaztak a sejtek jellemzésére, mint például a donor fluoreszcenciájának kioltását az akceptor által; az akceptor emissziós anizotrópiájának csökkenését az indirekt, transzferen keresztüli gerjesztés belépésével. Fluoreszcein és rodamin donor-akceptor párt használva, mindkét kromoforral jelölt lektint (konkanavalin A) állítottak elő. Vírustranszformált eritroleukémiás sejteket kezeltek különböző koncentrációjú jelzett lektinekkel. A két festék ideális donor-akceptor párt képez fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer létrejöttéhez, így lehetővé válik a kötött ligand molekulák közötti távolság meghatározása, ami egyben megfelel a felületi receptorok távolságának is. A transzferhatásfokot multiparaméteres flow-rendszerben mérték 488 nm lézer gerjesztés mellett, a fuoreszcein és a rodamin emisszióját, valamint a rodamin emissziós anizotrópiáját detektálva minden egyes sejten. Az energiatranszfer hatásfokát a donor emissziójának kioltása, az akceptor emissziójának megnövekedése, valamint az akceptor fluoreszcenciájának depolarizációja alapján közelítették.

A kísérletek a vizsgált sejtek indukció utáni differenciálódása során jelentős változásokat mutattak ki olyan tulajdonságokban, mint például kis molekulák transzportja, membránfluiditás, receptorok újrarendeződő képessége, stb. Nyilvánvaló, hogy a rezonancia energiatranszfer mérések a fentieken kívül intracelluláris struktúrák és komplexek egymáshoz viszonyított elhelyezkedését, illetőleg térközelségét célzó vizsgálatok során is hatásosan alkalmazhatók.

Kromoszóma analízis és válogatás

DNS-specifikus festékekkel jelölt izolált kromoszómák fluoreszcenciáját hatásosan lehet vizsgálni flow citofluorimetriával. 10^5 nagyságrendű kromoszómát megvizsgálva a fluoreszcencia-intenzitás eloszlás számos csúcsra különül

el. Minden csúcs egy adott kromoszóma típust, illetve csoportot jellemez. A csúcsok által képviselt intenzitások jellemzőek az illető kromoszóma típusra, a csúcsok alatti területek aránya pedig megadja az egyes típusok előfordulási arányát. Az egyes csúcsokhoz tartozó kromoszóma típusok fizikailag elválaszthatók a keverék többi részétől további biológiai, illetve biokémiai kísérletek céljára.

VAN DILLA és munkatársai (1978) kínai hörcsög sejtek (M3-1) etidium bromiddal festett kromoszómáit kilenc csoportra tudták szétválasztani. Egyes csoportok természetesen több kromoszóma típust is tartalmaztak. Humán diploid fibroblasztok kromoszómáit hasonló módon kezelve hét csoportot tudtak megkülönböztetni. Újabb festési technikák alkalmazásával (Hoechst 33258) a humán kromoszómákat 15 csoportra választották szét. A módszer segítségével mikrogramm mennyiségű azonos típust képviselő kromoszómák nyerhetők ki a heterogén mintából néhány órás szeparálással.

A kromoszóma-állomány nagyobb felbontású karakterizálása érhető el, ha a kromoszóma-állományt két fluoreszcens festékkel jelöljük. A szimultán festés hatékonysága várhatóan nagyobb, ha a két festék között rezonancia energiatranszfer jöhet létre. Erre a lehetőségre JENSEN és munkatársai (1977) DNS-specifikus festékeket (Hoechst 33258, cromomicin A_3, etidium bromid) ajánlottak, melyekből — spektrális tulajdonságaiknak megfelelően — alkalmas donor-akceptor párok alakíthatók ki. Vizsgálataik alapján a kromoszóma- és sejtanalízis és -szeparálás céljára a cromomicin A_3 és etidium bromid festékpár látszik leginkább alkalmasnak. Hasonlóan DNS-hez kötődő festékpárt alkalmaztak (mitromicin és propidium) STÖHR és munkatársai (1977), különálló sejteket „flow" mikrofluoriméterrel vizsgálva a két festék között energiatranszfert mutattak ki.

Más típusú információ nyerhető olyan donor-akceptor festékpár alkalmazásával, ahol nem mindkét festék a DNS-hez kötődik, hanem egyikük a kromatin fehérjéit jelöli. Ilyen, in situ vizsgálatokra alkalmas festékpár lehet a fluoreszkamin — propidium jodid (SZÖLLŐSI, SZABÓ, SOMOGYI és DAMJANOVICH 1978), valamint a fluoreszkamin—etidium bromid (SOMOGYI, KERTAI és DAMJANOVICH 1979).

Tekintve, hogy a különböző festékeknek a kromatinon belüli affinitáseloszlása — egyedi jellegzetességeikből következően — egymástól eltérő, a különböző festékpárok alkalmazása során a kromoszóma- vagy sejtanalízis a kromoszóma különböző strukturális és funkcionális részeinek analízisét nyújthatja.

IRODALOM

ADAMS, L. R., KAMENTSKY, L. A.: Acta Cytol. **15**, 289 (1971).
APPLE, M. A., MERSCHER, M., HIRSCHFELDER, T., KEEFE, T.: Immune RNA in Neoplasia, Academic Press, N. Y. (1976).
ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M.: Membranes and Neoplasia: New Approaches and Strategies, Alan R. Liss, Inc., N. Y., pp. 123—236 (1976).

ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M.: J. Histochem. Cytochem. **25,** 585 (1977).
AZZI, A.: Quart. Rev. Biophys. **8,** 237 (1975).
BAETCKE, K. P., SPARROW, A. H., NAUMAN, C. H., SCHWEMMER, S. S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **58,** 533 (1967).
BRAND, L., GOHLKE, J. R.: Ann. Rev. Biochem. **41,** 843 (1972).
CHAN, S. S., ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M.: J. Histochem. Vytochem. **27,** 56 (1979).
CHANCE, B., LEE, C.P., BLARIC, J. K.: Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes. Vol. 1—2. Academic Press, N. Y. (1971).
CHEN, R. F., EDELHOCH, M.: Biochemical Fluorescence Concepts, Vol. 1—2. Marcel Dekker, Inc., N. Y. (1975).
COULTER, W. H.: Nat. Electron. Conf. Proc. **12,** 1034 (1956).
CRISSMAN, H. A., STEINKAMP, J. A.: J. Cell. Biol. **59,** 766 (1973).
CRISSMAN, H. A., STEINKAMP, J. A.: First Internat. Symp. on Pulse Cytometry (C. A. M. Itaanen, H. F. P. Hillen, J. M. C. Wessels, eds). pp. 22—35, European Press Medikon, Ghent, Belgium (1975).
FULWYLER, M. J.: Science **150,** 910 (1965).
HULETT, H. R., BONNER, W. A., BARRETT, J., HERZENBERG, L. A.: Science **166,** 747 (1969).
JENSEN, R. H., LANGLOIS, R. G., MAYALL, B. H.: J. Histochem. Cytochem. **25,** 954 (1977).
KAMENTSKY, L. A., MELAMED, M. R., DERMAN, H.: Science **150,** 630 (1965).
KRAEMER, P. M., TOBEY, R. A., VAN DILLA, M. A.: J. Cell. Physiol. **81,** 305 (1973).
LINDMO, T., STEEN, H. B.: Biophys. J. **18,** 173 (1977).
MARSH, D.: Spectroscopic Studies on Membrane Structure. in: Essays in Biochemistry. Vol. 11. (Campbell, P. M., Aldridge, W. N., eds). Academic Press, N. Y. (1975).
MOLDAVAN, A.: Science **80,** 188 (1934).
MULLANEY, P. F., DEAN, P. N.: Appl. Opt. **8,** 2361 (1969).
RAJU, M. R., TRUJILLO, T. T., MULLANEY, P. F., ROMERO, A., STEINKAMP, J. A., WALTERS, R. A.: Brit. J. Radiol. **47,** 405 (1974).
SALTZMAN, G. C., CROWELL, J. M., MARTIN, J. C., TRUJILLO, T. T., ROMERO, A., MULLANEY, P. F.: Acty Cytol. **19,** 374 (1975).
SOMOGYI, B., KERTAI, P., DAMJANOVICH, S.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., megjelenés alatt (1979).
STEINKAMP, J. A., CRISSMAN, H. A.: J. Histochem. Cytochem. **22,** 616 (1974).
STEINKAMP, J. A., ORLICKY, D. A., CRISSMAN, H. A.: J. Histochem. Cytochem. **27,** 273 (1979).
STEINKAMP, J. A., ROMERO, A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **146,** 1061 (1974).
STOVEL, R. T., SWEET, R. G.: J. Histochem. Cytochem. **27,** 284 (1979).
STÖHR, M., EIPEL, H., GOERTTLER, K., VOGT-SCHADEN, M.: Histochemistry **51,** 305 (1977).
STRYER, L.: Science **162,** 526 (1968).
SZÖLLŐSI, J., SZABÓ, G., SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **13,** 63 (1978).
THAER, A. A., SERNETZ, M.: Fluorescence Techniques in Cell Biology, Springer-Verlag, Berlin (1973).
TOBEY, R. A., CRISSMAN, H. A.: Cancer Res. **32,** 2726 (1972).
VAN DILLA, M. A., FULWYLER, M. J., BOONE, I. U.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **125,** 367 (1967).
VAN DILLA, M. A., GRAY, J. W., CARRANO, A. V., LANGLOIS, R.: Abstracts of VIth Engineering Foundation Conference on Automated Cytology, April 27—29, 1978, Schloss Elmau, W. G., 6. (1978).
VAN DILLA, M. A., TRUJILLO, T. T., MULLANEY, P. F., COULTER, J. R.: Science **163,** 1213 (1969).

FEHÉRJÉK FOSZFORILÁCIÓS ÉS DEFOSZFORILÁCIÓS ÁTALAKULÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSA

GERGELY PÁL és BOT GYÖRGY

Debreceni Orvostudományi Egyetem Orvosi Vegytani Intézete

Bevezetés

A sejt anyagcsere folyamataiban lejátszódó foszforilációs-defoszforilációs folyamatokra a glikolízis és glikogenolízis intermedierjeinek megismerése hívta fel a figyelmet. A glikogén, ill. a glukóz lebontása és szintézise kovalens foszfátot tartalmazó vegyületeken keresztül valósul meg. A fehérjék foszforilációja alatt a tartósan, hosszabb ideig megmaradó foszfát beépülését értjük. A foszfáttal alkotott kovalens kötés kialakulása és felbomlása az enzimfehérjékben rendszerint konformációs változásokat okoz, amelyek katalitikus képességüket (v_{max}, K_m) vagy regulálhatóságukat nagymértékben befolyásolják.

A foszforilációs-defoszforilációs átalakításoknak kitett enzimek prototípusa a glikogén foszforiláz (EC 2.4.1.1). CORI és mtsai már 1938-ban leírták a foszforiláz két formáját, amikről később bebizonyosodott, hogy a foszforilált és a foszforilálatlan formákkal azonosak (KREBS és FISCHER 1956). Napjainkban már húsznál több olyan enzimet ismerünk, amelyeknek foszfo és defoszfo alakja van. Ezekről kitűnő áttekintést ad KREBS és BEAVO (1979) összefoglalója. Nem-enzimatikus fehérjék is szerepelhetnek a foszforilációs-defoszforilációs folyamatok szubsztrátjaként. Ide sorolhatók a hisztonok, a protaminok, a nemhiszton jellegű magfehérjék, a riboszóma különböző fehérjéi, membránokhoz szorosan kötött fehérjék, továbbá a kontraktilis rendszer fehérjéi (troponin I és T, miozin könnyű lánca); csak néhány példát ragadva ki a nem-enzim jellegű fehérjék közül. Úgy tűnik, hogy a sejtnek nincs olyan része, amelyben a foszforiláción és defoszforiláción alapuló szabályozás ne játszódnék le.

A fehérjék foszforilált és defoszforilált alakja szükségszerűvé teszi a foszforilálást katalizáló kinázok és a defoszforilálást végző foszfatázok, azaz az átalakító enzimek létezését is:

$$\text{Protein} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{protein kináz}} \text{Protein}-\text{P} + \text{ADP}$$

$$\text{Protein}-\text{P} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{foszfatáz}]{\text{foszfoprotein}} \text{Protein} + \text{P}_i$$

A foszforiláció rendszerint a fehérje meghatározott aminosav részletén (szerin—OH, ritkán treonin—OH csoporton) következik be. Általában az ATP

terminális foszfátja szerepel donorként, kivételes esetben GTP is megfelelő. Az átalakító enzimek tisztítása, specifitásuknak és kinetikájuknak a megismerése jelentős, mivel sok esetben ezen átalakító enzimek a reguláció kulcspontjai.

Ebben az összefoglalóban kizárólag az enzimek foszforilációs-defoszforilációs átalakulásait tekintjük át. Nem kívánunk teljességre törekedni, hiszen az utóbbi években több összefoglaló is jelent meg erről a területről (Rubin és Rosen 1975, Nimmo és Cohen 1977, Cohen 1978). Elsősorban a foszforilációs és defoszforilációs folyamatok szabályozási mechanizmusát ismertetjük. A DOTE Orvosi Vegytani Intézetben folyó kutatások erre a területre összpontosultak, így az összefoglaló saját eredményeinket és a szakirodalom ezzel kapcsolatos legújabb adatait tekinti át.

Protein kinázok és szabályozásuk

A sejtekben levő protein kinázok különböző regulátor molekulák jeleit alakítják át biológiai hatássá, foszfátot építve be a fehérjékbe. A ciklikus AMP (cAMP) volt az elsőként felismert regulátor molekula, amely specifikusan aktivált bizonyos kinázokat. Mai ismereteink szerint a cAMP, cGMP, Ca^{++}-ion és a kettőssszálú RNS szabályozhatja a protein kinázok katalitikus aktivitását. A kettőssszálú RNS aktiváló hatását a protein kinázra a transzláció szabályozásában ismerték fel (Ochoa és de Haro 1979). Ezen kívül számos olyan kinázt írtak le, amelyeknek aktivitása nem függ — mai ismereteink szerint — regulátor molekuláktól.

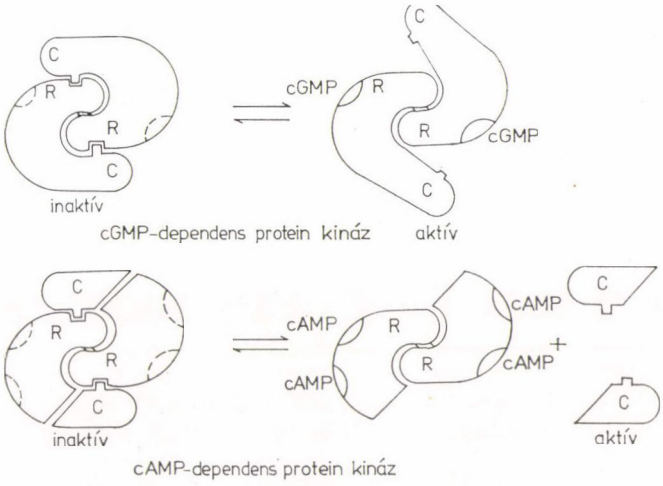
Ciklikus nukleotid dependens protein kinázok. A cAMP-dependens protein kinázok az alábbi módon aktiválódnak:

$$\underset{\text{inaktív}}{R_2C_2} + 4\ cAMP \rightleftharpoons \underset{\text{aktív}}{R_2(cAMP)_4} + 2\ C$$

A különböző szövetekből előállított cAMP-dependens kinázok közös jellemzője, hogy két katalitikus (C) és két regulátor (R) alegységből állnak. Az aktiválás mechanizmusa valószínűleg az, hogy létrejön a holoenzim és cAMP komplexe, amelyről aztán ledisszociál a szabad katalitikus alegység (Chau és mtsai 1978). Lehetséges, hogy már a C, R és cAMP terner komplexe is enzimatikusan aktív. Kétféle típusát írták le a cAMP-dependens protein kinázoknak, amelyeknek szubsztrátspecifitása ugyanaz, de intracelluláris lokalizációja és cAMP iránti affinitása eltérő (Hoffmann és mtsai 1975, Corbin és mtsai 1978). Az egyik típus R alegysége autofoszforiláció révén foszforilálódhat is, ezzel megnő cAMP iránti affinitása (Ehrlichman és mtsai 1974).

A cGMP dependens protein kináz két azonos alegységből (E) álló inaktív dimer, amely cGMP hatására átalakul aktív dimerré:

$$\underset{\text{inaktív}}{E_2} + 2\ cGMP \rightleftharpoons \underset{\text{aktív}}{E_2 - cGMP_2}$$

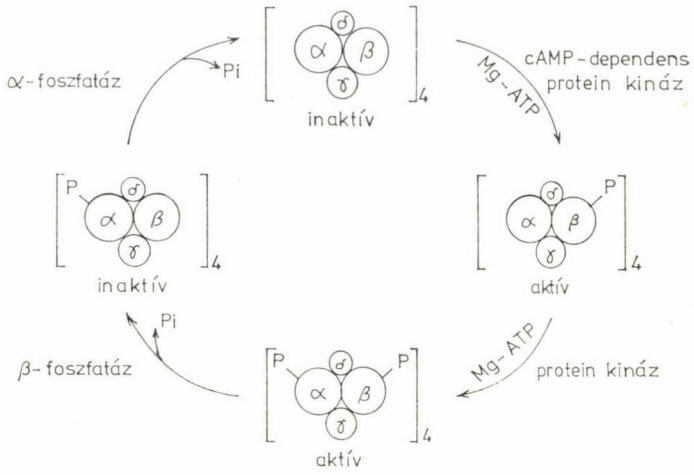


1. ábra. cAMP- ill. cGMP-dependens protein kinázok aktiválási mechanizmusa (GILL 1977 alapján)

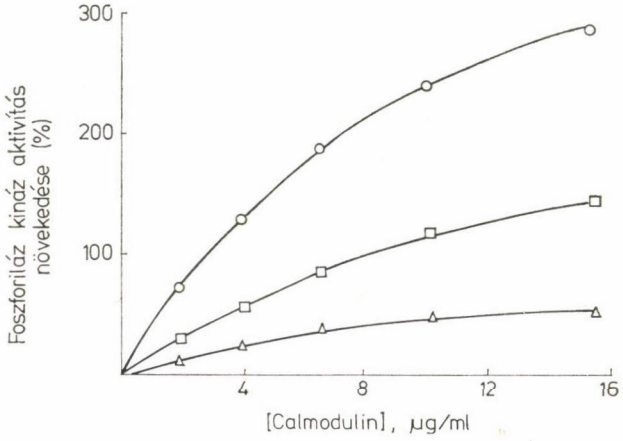
Kimutatták, hogy egyetlen alegység tartalmazza a cGMP kötőhelyet és az aktív centrumot, továbbá autofoszforiláció is szerepet játszhat az aktiválás szabályozásában (LINCOLN és mtsai 1978). A cAMP- és cGMP-dependens protein kinázok aktiválási mechanizmusát foglalja össze az 1. ábra.

Ca^{++} dependens protein kinázok. Ebbe a csoportba tartozik a foszforiláz kináz és a miozin könnyű láncának kinázа. Közös vonásuk, hogy tartalmaznak egy specifikus Ca^{++}-kötő fehérjét: a *calmodulint.* Napjainkban a calmodulin (Ca-dependens regulátor, foszfodieszteráz aktivátor) a kutatás előterébe került, jelentős szerepet játszik a Ca^{++}-ion fiziológiai hatásának közvetítésében (GEISOW 1978, WAISMAN és mtsai 1978). Mindkét enzimfehérje csak Ca^{++} jelenlétében aktív és meghatározott szubsztrátjaik vannak (foszforiláz-*b*, ill. a miozin 20 000 dalton tömegű könnyű lánca). Újabb adatok szerint más foszfoproteinek foszforilációját is katalizálhatják (KREBS és BEAVO 1979), bár ezek nem feltétlenül jelentenek fiziológiás szubsztrátot.

A foszforiláz kináz aktivitása foszforiláció-defoszforiláció útján szabályozódik (2. ábra). COHEN (1973, 1978), HAYAKAWA és mtsai (1973) kimutatták, hogy a foszforiláz kináz négy különböző alegysége közül az α és β alegység foszforilálódik. A foszforiláció először a β alegységen következik be a cAMP-dependens protein kináz hatására. A β alegységén foszforilált kináz már „aktivált" kináz, enzimaktivitása maximális. A β alegységbe épült foszfát lehasítása foszforprotein foszfatáz hatására csak akkor következhet be, ha a β alegységet követően az α is foszforilálódik. A foszforilációnak ez a második helye az enzim aktivitását már nem befolyásolja, de lehetővé teszi a foszfatázok működését. Ezek hatásaként előbb a β, majd az α alegységből hasad le a foszfátcsoport (COHEN és mtsai 1974, YEAMAN és COHEN 1975, COHEN 1978). A foszforiláz



2. ábra. A foszforiláz kináz szabályozása cAMP-dependens protein kinázzal, α- és β-foszfoprotein foszfatázzal (COHEN 1978 alapján)



3. ábra. Calmodulin hatása a foszforiláz kináz aktivitására. Calmodulin aktivitás növelő hatása 1 μM (○), 5 μM (□) és 20 μM (△) Ca^{++} jelenlétében (GERGELY és mtsai 1980)

kináz γ alegysége a katalitikus alegységgel (SKUSTER és GRAVES 1977), δ alegysége a calmodulinnal azonos (COHEN és mtsai 1978).

A foszforiláz kináz ugyan tartalmaz calmodulint, aktivitása mégis fokozható calmodulin hozzáadására (3. ábra). Az aktivitás növekedése kis Ca^{++} koncentrációkban a legnagyobb. Kinetikai és kötődési vizsgálatokból kiderült, hogy a calmodulin növeli a foszforiláz kináz affinitását a Ca^{++}-ionhoz, továbbá a fehérje nem tartalmaz ekvimoláris mennyiségű calmodulint (GERGELY és mtsai 1980). Ezt erősíti meg egy másik laboratóriumi kísérlete is (COHEN és mtsai 1979). Így a foszforiláz kinázban a calmodulin nem tekinthető feltétlenül

alegységnek, hanem a kinázzal asszociálódó és a tisztítás során többé-kevésbé együttmaradó, szabályozó molekulának.

A miozin könnyű láncát foszforiláló kinázban a calmodulint, mint Ca^{++}-iont megkötő alegységet azonosították (BARYLKO és mtsai 1978). Ennél az enzimnél is felvetették a foszforiláció szabályozó lehetőségét (ADELSTEIN és mtsai 1978). Úgy tűnik, hogy mindkét ebbe a csoportba tartozó protein kináz aktivitását reverzibilis kovalens módosítás és Ca^{++}-ion szabályozhatja.

Foszfoprotein foszfatázok és szabályozásuk

A foszfatázok szerepe a fehérjékbe épült foszfátcsoport kihasítása, ezzel a kovalens módosítás reverzibilissé tétele. Az utóbbi években az érdeklődés jelentősen megnőtt a foszfatázok iránt. Ezek a kutatások két területen hoztak lényegesen újat: (1) foszfatázok szerkezete és specifitása, (2) a defoszforilációs reakciók szabályozása.

(1) Többféle módszerrel sikerült előállítani egy 33—35 000 dalton tömegű foszfatázt, amely a legkülönbözőbb foszfoproteinek defoszforilációját katalizálja (BRANDT és mtsai 1975, GRATECOS és mtsai 1977). Ezzel egyidejűleg más kutatócsoportok a legkülönbözőbb molekulasúlyú foszfatázokról adtak hírt. A preparátumokat különféle szövetekből állították elő, csak részben tisztított foszfatázokhoz jutva. Úgy tűnik, hogy a 33—35 000 dalton tömegű rész a katalitikus alegységgel lehet azonos, amely *in vivo* nem szabadon, hanem kötött állapotban fordul elő, más fehérjékkel nagyobb molekulasúlyú asszociátumokat alkotva. MELLGREN és mtsai (1979) beszámolnak egy 260 000 dalton tömegű „natív" foszfatázról, amely tartalmazza a már korábban leírt katalitikus alegységet is. Endogén Ca^{++}-dependens proteázok kisebb molekulasúlyú formákká alakíthatják át. Ez utóbbi magyarázatot adhat az irodalomban közölt változatos molekulasúlyú formákra is.

(2) A defoszforilációs reakciók az enzim (foszfatáz) és a szubsztrát (foszfoprotein) szintjén szabályozhatók. A későbbiekben részletesen foglalkozunk a különböző szabályozási lehetőségekkel, itt csak a foszfatázra ható szabályozást ismertetjük.

A foszfoprotein foszfatázok közül legrészletesebben a foszforiláz-*a*-t defoszforiláló ún. *foszforiláz foszfatázt* tanulmányozták. Ennek katalitikus alegysége ($M_r = 35\,000$) erősen kötött kétértékű fémiont (feltehetően Mn^{++}-t) tartalmaz. Eltávolítása kelátképzőkkel (EDTA, ATP, ADP, PP_i. . . .) a foszfatáz aktivitás gátlódásához vezet (HSIAO és mtsai 1978). Hasonló mechanizmussal magyarázható a fluoridion gátló hatása is. A gátlás fémionok hozzáadásával (Mn^{++}, Zn^{++}, Mg^{++}) megszüntethető (KHATRA és SODERLING 1978).

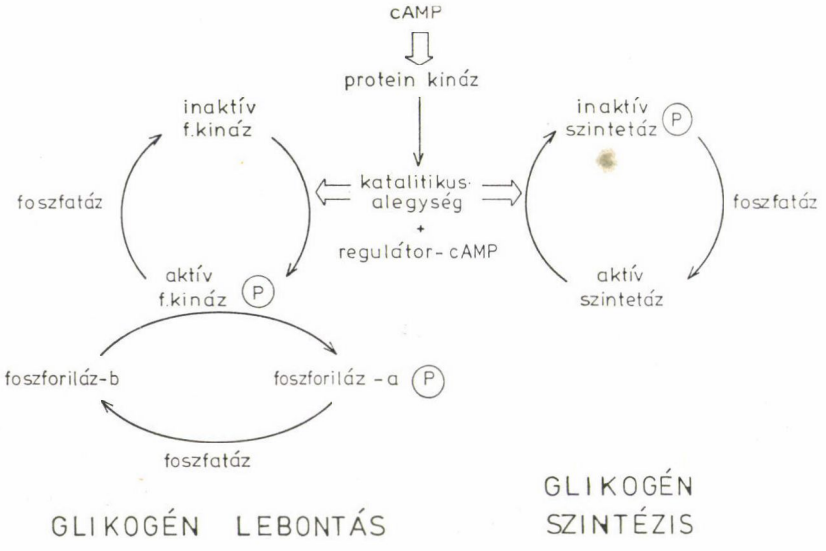
A foszfatázra hatva fejti ki reguláló hatását az *inhibitor-1* is. Ezt a 20 000 dalton tömegű, hőstabil fehérjét a cAMP-függő protein kináz reverzibilisen

foszforilálhatja egy treonin—OH csoporton. Csak foszforilált állapotban gátolja a foszfatázt. Vázizomban az inhibitor-1 koncentrációja elegendő ahhoz, hogy afoszfatáz szabályozásában (időleges gátlásában) szerepet játszhasson (NIMMO és COHEN 1978). Az inhibitor-1 foszforilációját és ezzel gátlóképességének fokozódását *in vivo* is kimutatták (TÓTH és mtsai 1977). Ezeket az adatokat vázizom foszforiláz-foszfatázra közölték, de hasonló regulációval lehet számolni más szövetekben is.

Megoldásra váró kérdés maradt a foszfoprotein foszfatázok szubsztrátspecifitása. Míg a 35 000 dalton tömegű katalitikus alegység sokféle foszfoprotein defoszforilációját katalizálja, addig a „natív" foszfatázok már specifikusabbak. Lehetséges, hogy az asszociálódó fehérjék biztosítják a szubsztrátspecifitást, fiziológiailag hatékonyabbá változtatva a katalitikus alegységet az egyes szubsztrátok iránt.

A glikogénanyagcsere szabályozása enzimfehérjék foszforilálásával és defoszforilálásával

A glikogénanyagcsere szabályozása kinázok és foszfatázok útján valósul meg. A glikogén metabolizmusát katalizáló enzimrendszert mutatja be a 4. ábra. Látható, hogy a lebontást katalizáló *foszforiláz* két formában fordul elő: foszforilált aktív (*a*) és defoszforilált inaktív (*b*). A szintézist elősegítő *glikogén szintetáz* foszfo formája az inaktív és defoszfo alakja a katalitikusan aktív.



4. ábra. A glikogén anyagcsere enzimrendszere

Így a glikogénanyagcsere a cAMP-dependens protein kináz által biztosított foszforilációs szabályozás alatt áll. Az ATP-ből hormonális hatásra (adrenalin, glukagon) képződő cAMP, aktiválva a protein kinázt, foszforilációs reakciósorozatot indít be. A cAMP-dependens protein kináz fontos szerepet játszik a glikogén szintézis és lebontás koordinálásában, mivel a glikogén szintetáz foszforilációjával a szintézis megállítását, a foszforiláz kináz foszforilációjával a foszforiláz-*b* → *a* átalakulást és ezzel a lebontást segíti elő. Ezen folyamatok során felerősödik a cAMP koncentráció emelésével kapott jel (*kaszkád hatás*).

A glikogénanyagcsere enzimei, amelyek a sejt szolubilis frakciójához tartoznak, *in vivo* valószínűleg szoros egységben fordulnak elő (Dombrádi és mtsai 1980). A fehérjemolekulák közötti asszociációt igazolták a frontál analízises gélszűréssel végzett kísérletek eredményei. Kimutattuk, hogy a *foszforiláz és átalakító enzimei* (foszforiláz kináz és foszfatáz) *komplexet alkotnak* az intracellulárisan előforduló fehérjekoncentrációkban. A komplex képződését befolyásolja a Ca^{++}-ion (Gergely és mtsai 1975) és kimutathatók nyúl vázizom tömény kivonatában is (Gergely és mtsai 1974).

A glikogénlebontás (és -szintézis) sebességét nemcsak a foszforilációs reakciók határozzák meg, hanem a defoszforilációs folyamatok is. Így a szabályozásban szerepet játszanak a foszfoprotein foszfatázok is. A glikogén mobilizálása szempontjából különösen jelentős a foszforiláz-*a* defoszforilációja (inaktiválása), mivel ez biztosíthatja a szövetekben képződött foszforiláz-*a* „élettartamát" és ezzel a glikogénlebontás mértékét.

A foszforiláz-a defoszforilálásának szabályozása

A foszforiláz-a dimer ⇌ tetramer egyensúlyának szerepe

A foszforiláz foszfatáz (továbbiakban foszfatáz) szubsztrátja a foszforiláz-*a* azonos alegységekből álló, katalitikusan aktív dimer, ill. kevésbé aktív tetramerként fordulhat elő. A dimer és tetramer alak egyensúlya a hőmérséklettől, a fehérjekoncentrációtól és a pH-tól függ (Graves és Wang 1972). A foszforiláz-*a* defoszforilációja alacsony hőmérsékleten (15—23 °C) nem játszódik le, mivel a *tetramer foszforiláz-a-ra a foszfatáz* nem hat, csak a dimer *a*-t képes defoszforilálni (Bot és Dósa 1971, Bot és Gergely 1972). Egyes ligandok (koffein, glukóz) jelenlétében azonban alacsony hőmérsékleten (15—23 °C) is defoszforilálódik a foszforiláz-*a*. Szedimentációs vizsgálatokkal igazolták, hogy pl. a koffein a tetramer foszforiláz-*a*-t dimerekre disszociálja és ezzel lehetővé teszi a defoszforilálást (Bot és mtsai 1977). Hasonló mechanizmussal magyarázható a glukóz és glikogén alacsony hőmérsékleten tapasztalt defoszforilációt gyorsító hatása. Magasabb hőmérsékleten ezek a ligandok nem fokozzák a defoszforiláció sebességét, mivel az egyensúly nagymértékben a dimer

foszforiláz-*a* irányába tolódik el. Ezek alapján a foszfatáz funkciója a következőképpen értelmezhető:

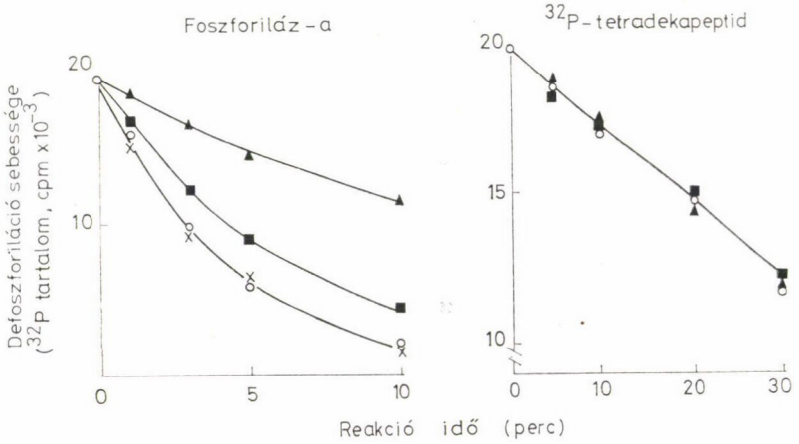
$$\underset{\text{foszforiláz-}a}{\text{Tetramer}} \underset{\text{glukóz, koffein}}{\rightleftharpoons} \underset{\text{foszforiláz-}a}{\text{2 Dimer}} \xrightarrow{\text{foszfatáz}} \underset{\text{foszforiláz-}b}{\text{2 Dimer}} + 4P_i$$

A foszforiláz-*a* asszociációs-disszociációs egyensúlya a poikilotherm állatokban szabályozó szerepet játszhat. Bot és Gergely (1972) eredményei szerint a foszforiláz-*a* alacsony testhőmérsékleten *in vivo* is kerülhet tetramer állapotba.

Ligandok hatása

A foszforiláz-*a* defoszforilálását különböző ligandok gátolhatják. Azokat tekintjük át, amelyek a szubsztrátra (foszforiláz-*a*-ra) hatva fejtik ki hatásukat és reguláló szerepük *in vivo* is lehetséges. A ligand ható helyének kutatásában nagy segítséget jelent a foszforiláz-*a*-ból előállítható foszfo-tetradekapeptid. Ez a foszforiláz N-terminális darabja (14 aminosav), amely tartalmazza a foszforilálható szerin-OH-ba épült foszfátot. A foszfatáz defoszforilálja a tetradekapeptidet is, bár közel százszor lassúbb sebességgel (a K_m viszont hasonló). Mivel a peptid konformációja ligand hatására már nem változik (Martensen és mtsai 1973), így alkalmazásával kimutatható, hogy a ligand a foszforiláz-*a*-ra vagy a foszfatázra hat.

Az 5. ábra AMP és glukóz-6-foszfát hatását mutatja a foszforiláz-*a* és a ^{32}P-tetradekapeptid defoszforilálására. Látható, hogy 5.10^{-6}M AMP jelentősen gátolja a foszforiláz-*a* defoszforilációját. A ^{32}P kihasításának sebességét a tetra-



5. ábra. AMP és glukóz-6-foszfát hatása a foszfatáz reakcióra. Foszforiláz-*a* ill. ^{32}P-tetradekapeptid defoszforilációja effektorok nélkül (○), $5 \cdot 10^{-6}$ M AMP (▲), $2 \cdot 10^{-3}$ M glukóz-6-foszfát (×) és $5 \cdot 10^{-6}$ M AMP + $2 \cdot 10^{-3}$ M glukóz-6-foszfát (■) jelenlétében

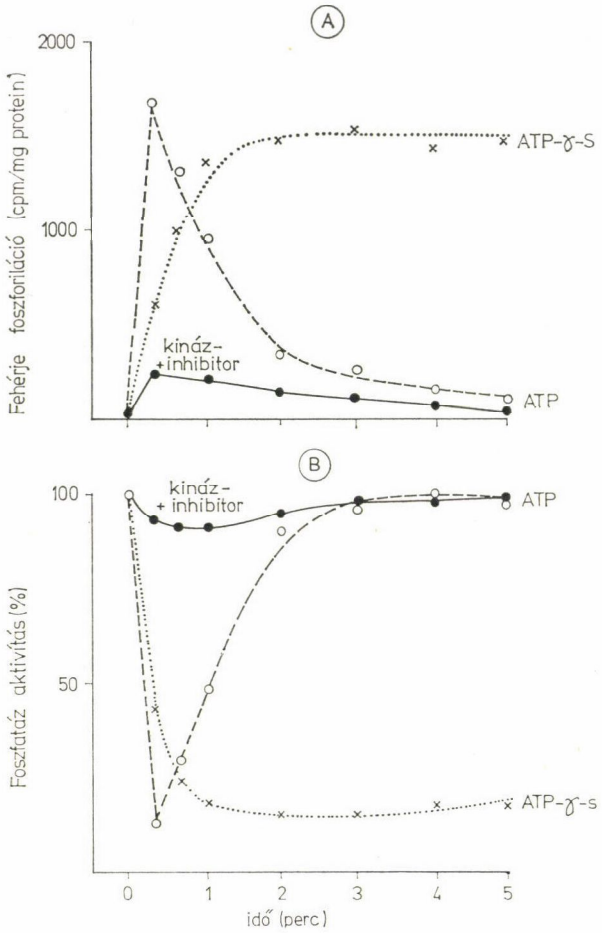
dekapeptidből még 10^{-4} M AMP sem befolyásolja. Az AMP gátló hatását tehát a foszforilázhoz kapcsolódva fejti ki. Az IMP is hasonló mechanizmussal, a szubsztráton hatva, gátolja a defoszforilációt.

1977-től kezdődően mind többet tudunk a foszforiláz szerkezetéről. Ezek eredményeképpen jobban ismerjük a fehérje kötőhelyeit, szerkezetüket és topográfiájukat. A ligandok hatásmechanizmusának tisztázása megindulhatott molekuláris szinten is. Az AMP gátlás mechanizmusát a következőkben foglalhatjuk össze. A foszforiláz-*a*-ban a foszfátot tartalmazó szerin maradék és az ekörüli szekvenciarész — az N-terminálistól kb. 20 aminosav — befordul a molekulába, s a foszfát sókötést létesít két arginin oldallánccal (FLETTERICK és mtsai 1979). Ebben a helyzetben a foszfát kihasítása foszfatázzal megfelelő sebességgel folyik. Ha ez a rész nincs ilyen kifeszített helyzetben, akkor a defoszforiláció sebessége nagyon lelassul. Ez történik a foszfo-tetradekapeptidben is. Amikor a foszforiláz-*a*-hoz AMP kapcsolódik, újabb konformáció-változás játszódik le: a szerin foszfát „eltemetődik" a molekulában és hozzáférhetetlenné válik a foszfatáz számára.

A glukóz-6-foszfát nem befolyásolja a foszforiláz-*a* defoszforilációját (ld. 5. ábra), de jelentősen mérsékli a nukleotid-monofoszfátokkal okozott gátlást (BOT és DÓSA 1971, VARSÁNYI és BOT 1972, MARTENSEN és mtsai 1973). A mechanizmus érthetővé válik azzal, hogy az AMP, IMP és glukóz-6-foszfát a foszforiláz-*a* azonos kötőhelyéhez kapcsolódik (JOHNSON és mtsai 1978), tehát ezen ligandok közötti kompetícióról van szó. Bár a glukóz-6-foszfát kb. 50-szer gyengébben kötődik a foszforilázhoz, mint az AMP, nagy koncentráció feleslegben mégis leszoríthatja az AMP-t. A glukóz-6-foszfáton kívül a glukóz, koffein és inozin is mérsékli a nukleotidok okozta gátlást (VARSÁNYI és BOT 1972, BOT és mtsai 1978). A mechanizmus még nem minden esetben tisztázott. A koffein esetében kettős hatásról van szó (BOT és mtsai 1977). A koffein — mint láttuk — dimerré alakítja át a foszforiláz-*a*-t és ezzel megfelelőbb szubsztrátjává válik a foszfatáznak. Az AMP gátlás megszüntetésében nem erről van szó, mivel az AMP alig befolyásolja a foszforiláz-*a* dimer $\rightleftharpoons$ tetramer egyensúlyát. A koffein hatása a glukóz-6-foszfáttal sem hozható analógiába, mert a koffein nem az AMP kötőhelyhez kapcsolódik (DOMBRÁDI és mtsai 1979), hanem egy attól 40 Å-re levő jól definiált felszínhez. Feltehetően a koffein az AMP leszorítása nélkül indukál olyan konformáció-változást, amely a defoszforiláció sebességét növeli.

Fehérjék szerepe

A glikogénanyagcsere szabályozásában szerepet játszó fehérjék foszforilációja és defoszforilációja az izomkivonatban is megfigyelhető. Kimutattuk, hogy a foszforilációs enzim-kaszkád a kivonatban is működőképes: cAMP és Mg-ATP-vel aktív foszforiláz kináz, foszforiláz-*a* és inaktív glikogén szintetáz képződik (GERGELY és mtsai 1978). A 6. ábra radioaktív ATP-vel végzett



6. ábra. Fehérjék foszforilációja *(A)* és a foszfatáz aktivitás *(B)* közötti kapcsolat. Fehérjékbe épült ^{32}P, ill. foszfatáz aktivitás változása [γ-^{32}P] ATP (o– – –o), ATP-γ-S (×···×), [γ-^{32}P] ATP + 2 μM protein kináz inhibitor (●——●) hatására. A kísérletekben az ATP koncentrációja $9 \cdot 10^{-4}$ volt. Az inkubációs elegy tartalmazott még 10^{-6} M cAMP és $3 \cdot 10^{-3}$ M Mg^{++}-t is (GERGELY és mtsai 1978)

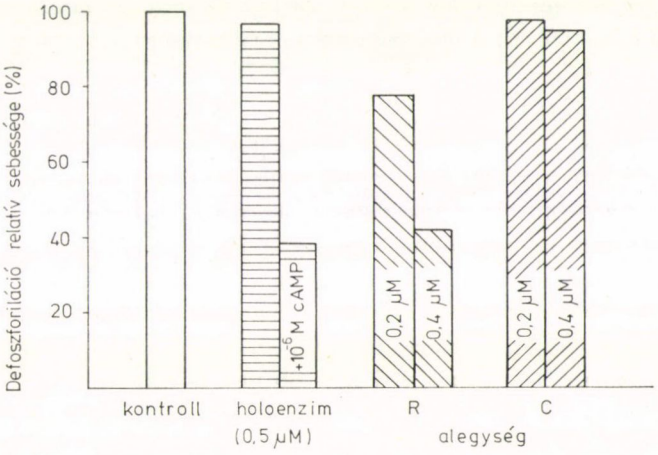
kísérleteinket tünteti fel. Az ábra *A* része a fehérjébe épült ^{32}P-t, *B* része a kivonat foszfatáz aktivitását mutatja. Ciklikus AMP, Mg^{++} és [γ-^{32}P] ATP hatására gyors foszforilációs folyamat játszódik le. A fehérjébe épülő ^{32}P másodpercek alatt maximumot ér el, majd fokozatosan csökken. A foszfatáz aktivitása a ^{32}-P beépülésével párhuzamosan csökken, majd visszatér eredeti értékére. Az izomkivonatban levő foszfatáz *átmenetileg* gátlódik.

Ha a kísérletet az ATP tiofoszfát analógjával, az ATP-γ-S-sel ismételjük meg, a fehérjék szerin-OH csoportjába tiofoszfát épül be. A tiofoszforilált fehérjék értékes tulajdonsága, hogy a tiofoszfát csoportot a foszfatáz nem képes kihasítani, így a fehérjék tartósan foszforilált formában maradnak (GRA-

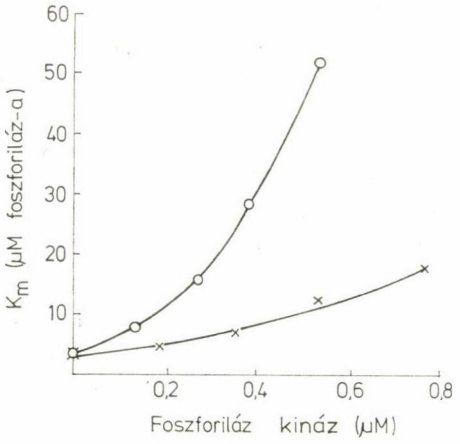
TECOS és FISCHER 1974, GERGELY és mtsai 1976). ATP-γ-S alkalmazásával tehát a defoszforilációs folyamatok kiküszöbölhetők. A 6. ábrából látható, hogy a fehérjék tiofoszforilációja után a ^{32}P beépülve marad a fehérjékben. A tiofoszforilációval párhuzamosan a foszfatáz aktivitása csökken és *tartósan* gátolt állapotba kerül. Feltételezhető, hogy a foszfatáz gátlódását valamilyen fehérje (vagy fehérjék) okozza. A foszfatáz gátlása *átmeneti*, ha a fehérje foszforilációja időleges és *tartós*, ha a fehérje rögzítődik foszforilált állapotában. Feltevésünket olyan kísérlettel támasztottuk alá, amelyben a protein kináz foszforiláló hatását ennek inhibitorával felfüggesztettük. A cAMP-dependens protein kinázról ismert, hogy katalitikus aktivitása specifikusan gátolható egy inhibitor fehérjével (ASHBY és WALSH 1974). A 6. ábrán feltüntettük az inhibitor jelenlétében végzett kísérleteket is. Látható, hogy alkalmazásával nagymértékben csökken a foszforiláció és a foszfatáz aktivitása nem gátlódik, *eredeti szintjén marad.*

A foszfatáz reverzibilis gátlása tehát szoros összefüggést mutat egyes fehérjék foszforilációjával, amelyet a cAMP-dependens protein kináz katalizál. Ezt igazolni tudtuk izomban (GERGELY és mtsai 1978) és májban is (DOMBRÁDI és mtsai 1978). A gátlást számos fehérje foszforilálódása okozhatja, még akkor is, ha figyelembe vesszük, hogy a foszfatáz gátlódása a cAMP-dependens protein kináz hatásával van kapcsolatban.

Megvizsgáltuk a *cAMP-dependens protein kináz* gátló hatását (GERGELY és BOT 1977, 1978). Eredményeinket oszlopdiagram formájában mutatjuk be (7. ábra). A baloldali oszlop a foszforiláz-*a* defoszforilációjának sebességét tünteti fel effektorok nélkül. A cAMP-dependens protein kináz holoenzim, a defoszforiláció sebességét nem befolyásolja. 10^{-6} M cAMP jelenlétében azon-



7. ábra. cAMP-dependens protein kináz hatása a foszforiláz-*a* defoszforilációjára. A defoszforiláció sebessége a kontroll (protein kináz nélküli) százalékában van feltüntetve (GERGELY és BOT 1977 alapján)



8. ábra. Inaktív (x) és aktív (o) foszforiláz kináz hatása a foszfatáz K_m értékére (GERGELY és BOT 1978 alapján)

ban már jelentősen gátlódik a defoszforiláció. Mivel a protein kináz gátló hatással csak cAMP jelenlétében rendelkezik, ezért a gátlás a disszociált enzimnek: a katalitikus (C) vagy a regulátor (R) alegységnek tulajdonítható. A protein kináz kétféle alegységét Blue-Dextran Sepharose affinitás kromatográfiával izoláltuk (GERGELY és BOT 1977) és megvizsgáltuk a tisztított, gélelektroforetikusan homogén alegységek hatását. A 7. ábrából látható, hogy csak az R alegység gátolja a defoszforilációt. Növelve mennyiségét a gátlás fokozódik. Ezzel szemben a C alegység még nagy mennyiségben sem mérsékli a defoszforiláció sebességét.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a cAMP-dependens protein kináz cAMP jelenlétében észlelt gátló hatása a szabaddá váló R alegységnek tulandonítható. Az R alegység a foszforiláz-*a*-ban létrehozott konformáció-változás útján gátol (GERGELY és BOT 1977).

A foszforiláz kináz is szerepet játszhat a foszfatáz szabályozásában. Korábban kimutattuk, hogy az inaktív foszforiláz kináz gátolja a foszforiláz-*a* defoszforilációját és a gátlás kompetitív (BOT és mtsai 1975a, 1975b). A 8. ábra bemutatja a foszfatáz affinitásának változását a foszforiláz-*a* iránt inaktív foszforiláz kináz jelenlétében. Az inaktív kináz gátló hatása viszont nem ad magyarázatot a foszfatáz átmeneti gátlására, mert ez a foszfatázt állandó gátlás alatt tartaná. Ismeretes, hogy a „flash activation" során, amikor a különböző enzimfehérjék foszforilálódnak, lejátszódik a foszforiláz kináz aktiválása is (YEAMAN és COHEN 1975, GERGELY és mtsai 1976). Ezért vizsgáltuk az aktív (foszforilált) kináz hatását is a foszfatáz reakcióra. Ezekhez a kísérletekhez tiofoszforilálással aktivált kinázt használtunk, mivel ezt a foszfatáz nem defoszforilálhatta, aktív állapota mindvégig megmaradt. A tiofoszforilált kináz is kompetitív módon gátolja a foszforiláz-*a* defoszforilációját. A

foszfatáz K_m változása a 8. ábrán látható. Az aktív foszforiláz kináz ötször nagyobb mértékben gátolja a foszfatázt, mint az inaktív. A Dixon szerinti inhibitor állandók 0,55 μM az inaktív és 0,1 μM az aktív kinázra (GERGELY és mtsai 1976, GERGELY és BOT 1978).

Ezek alapján a foszforiláz kináz gátló hatása reverzibilisnek tekinthető. Bár a kináz inaktív állapotában is gátolja a foszfatázt, ez a gátlás az aktív foszforiláz kináz képződésével jelentősen fokozódik. Nemcsak a tiofoszforilálással aktivált kináz, hanem a foszforilációval aktivált (*in vivo* keletkező forma) is gátolja a foszfatázt. Ezt tanulmányozva megállapítottuk, hogy az aktív foszforiláz kináz késlelteti a foszforiláz-*a* defoszforilációját. A foszfatáz először az aktív kinázt defoszforilálja és csak ezután indul meg a foszforiláz-*a* inaktiválása (GERGELY és mtsai 1976).

Megbeszélés

A foszforiláz foszfatáz szabályozásában többféle fehérje és ligand játszhat szerepet. Az *in vivo* megvalósuló reguláció szempontjából azok lehetnek jelentősek, amelyeknek intracelluláris koncentrációja elegendő a foszfatáz gátlásához.

Az 1. táblázatban összefoglaltuk azokat az anyagokat, amelyek a szabályozásban szerepet játszhatnak. Mindhárom fehérje típusú gátlószer reverzibilisen gátolhatja a foszfatázt. A protein kináz esetében ezt a változó cAMP koncentráció biztosítja, mert csak a cAMP hatására disszociált R alegység gátol. A másik kettőnél a cAMP-dependens protein kináz által katalizált foszforiláció hozza létre a gátlószer hatásos, foszforilált alakját. Így közvetett formában a cAMP-nek is reguláló szerepe van. Mindhárom fehérje reverzibilisen gátolja a foszfatázt. A protein kináz gátló hatása feltehetően a legkisebb, mert K_i értéke nagyobb, mint intracelluláris koncentrációja. A foszforiláz kináz és az inhibi-

1. táblázat

Foszfoprotein foszfatáz *in vivo* szabályozásában szerepet játszó anyagok

Gátlószer	Intracelluláris koncentráció, μM	K_i, μM
cAMP-dependens protein kináz	0,23	0,32
foszforiláz kináz	2,5	0,08
inhibitor-1	1,5	0,016
AMP	5—150	8
IMP	10—400	65
glukóz-6-foszfát	500—2000	—
glukóz	5500	—

tor-1 *in vivo* is hatásos gátlószerek, mivel mennyiségük elegendő akár teljes gátlás lértehozásához.

Kismolekulájú ligandok is szabályozhatják a foszfatázt; a nukleotidok intracelluláris koncentrációja elegendő a gátláshoz. A glukóz-6-foszfát és a glukóz pedig megfelelő mennyiségben lehet ahhoz, hogy a gátlást mérsékelje.

A foszfoprotein foszfatáz szabályozásának tehát két szintjét különböztethetjük meg. A *szabályozás első szintje* a foszfatáz gyors, teljes, de reverzibilis gátlását eredményezi. A gátlást a cAMP-dependens protein kináz és az általa foszforilált fehérjék okozzák. A *szabályozás második szintje* a ligandok által okozott hatás. Ha a sejt energiaszegény állapotba jut (AMP, IMP halmozódik fel), akkor ezek gátolhatják a foszforiláz-*a* defoszforilációját és ezzel elősegítik az energianyerést szolgáló glikogén lebontását. Finomítja ezt a szabályozást a glukóz és a glukóz-6-foszfát, amelyek a nukleotidok okozta gátlást felfüggesztik. Ezért a glikogén csak akkor mobilizálódik, amikor az egyéb energiaszolgáltató készletek (glukóz, glukóz-6-foszfát) már elfogytak.

IRODALOM

1. Adelstein, R. A., Conti, M. A., Hathaway, D. R.: J. Biol. Chem. **253,** 8347—8350 (1978).
2. Ashby, C. D., Walsh, D. A.: Methods Enzymol. **38C,** 350—358 (1974).
3. Barylko, B., Kuznicki, J., Drabikowski, W.: FEBS Lett. **90,** 301—304 (1978).
4. Bot, G., Dósa, I.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **6,** 73—87 (1971).
5. Bot, G., Gergely, P.: FEBS Lett. **24,** 7—10 (1972).
6. Bot, G., Varsányi, M., Gergely, P.: FEBS Lett. **50,** 351—354 (1975a).
7. Bot, G., Gergely, P., Varsányi, M., Vereb, G.: MTA Biol. Oszt. Közl. **18,** 397—407 (1975b).
8. Bot, G., Kovács, E., Gergely, P.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **12,** 335—341 (1977).
9. Bot, G., Kovács, E., Pólyik, E., Gergely, P.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **13,** 189—192 (1978).
10. Brandt, H., Capulong, Z. L., Lee, E. Y. C.: J. Biol. Chem. **250,** 8038—8044 (1975).
11. Chau, V., Anderson, C., Huang, C., Huang, F. L.: Fed. Proc. **37,** (6) 1329 (1978).
12. Cohen, P.: Eur. J. Biochem. **34,** 1—14 (1973).
13. Cohen, P., Antonow, J. F., Davison, J., Taylor, C.: in Metabolic Interconversion of Enzymes 1973, Springer-Verlag, Berlin, p. 33—42 (1974).
14. Cohen, P.: in Current Topics in Cellular Regulation, Vol. 14, Acad. Press, New York, p. 117—196 (1978).
15. Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J. G., Cohen, P. T. W., Vanaman, T. C., Nairn, A. C.: FEBS Lett. **92,** 287—293 (1978).
16. Cohen, P., Picton, C., Klee, C. B.: FEBS Lett. **104,** 25—30 (1979).
17. Corbin, J. D., Sugden, P. H., West, L., Flockhart, D. A., Lincoln, T. M., McCarthy, D.: J. Biol. Chem. **253,** 3997—4003 (1978).
18. Dombrádi, V., Gergely, P., Bot, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **13,** 235—238 (1978).
19. Dombrádi, V., Vereb, G., Bot, G.: Int. J. Biochem. **10,** 905—908 (1979).
20. Dombrádi, V., Gergely, P., Bot, G.: Biosystems **12,** 289—294 (1980).
21. Ehrlichman, J., Rosenfeld, R., Rosen, O. M.: J. Biol. Chem. **249,** 5000—5003 (1974).
22. Fletterick, R. J., Sprang, S., Madsen, N. B.: Can. J. Biochem. **57,** 789—797 (1979).
23. Geisow, M. J.: Nature **276,** 211—212 (1978).
24. Gergely, P., Vereb, G., Bot, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **9,** 223—226 (1974).
25. Gergely, P., Vereb, G., Bot, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **10,** 153—159 (1975).

26. GERGELY, P., VEREB, G., BOT, G.: Biochim. Biophys. Acta **429,** 809—816 (1976).
27. GERGELY, P., BOT, G.: FEBS Lett. **82,** 269—272 (1977).
28. GERGELY, P., BOT, G.: Biochem. Soc. Trans **6,** 21—25 (1978).
29. GERGELY, P., DOMBRÁDI, V., BOT, G.: FEBS Lett. **93,** 239—241 (1978).
30. GERGELY, P., CASTLE, A. G., CRAWFORD, N.: Biochim. Biophys. Acta **612,** 50—55 (1980).
31. GILL, N.: J. Cycl. Nucl. Res. **3,** 153—162 (1977).
32. GRATECOS, D., FISCHER, E. H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **58,** 960—967 (1974).
33. GRATECOS, D., DETWILER, T., HURD, S., FISCHER, E. H.: Biochemistry **16,** 4812—4817 (1977).
34. HAYAKAWA, T., PERKINS, J. P., WALSH, D. A., KREBS, E. G.: Biochemistry **12,** 567—573 (1973).
35. HOFMANN, F., BEAVO, J. A., BECHTEL, P. J., KREBS, E. G.: J. Biol. Chem. **250,** 7795—7801 (1975).
36. HSIAO, K.-J., SANDBERG, A. R., LI, H.-C.: J. Biol. Chem. **253,** 6901—6907 (1978).
37. JOHNSON, L. N., WEBER, I. T., WILD, D. L., WILSON, K. S., YEATES, D. G. R.: J. Mol. Biol. **118,** 579—591 (1978).
38. KHATRA, B. S., SODERLING, T. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **85,** 647—654 (1978).
39. KREBS, E. G., FISCHER, E. H.: Biochim. Biophys. Acta **20,** 150—157 (1956).
40. KREBS, E. G., BEAVO, J. A.: Ann. Rev. Biochem. **48,** 923—959 (1979).
41. LINCOLN, T. M., FLOCKHART, D. A., CORBIN, J. D.: J. Biol. Chem. **253,** 6002—6009 (1978).
42. MARTENSEN, T. M., BROTHERTON, J. E., GRAVES, D. J.: J. Biol. Chem. **248,** 8329—8336 (1973).
43. MELLGREN, R. L., AYLWARD, J. H., KILLILEA, S. D., LEE, E. Y. C.: J. Biol. Chem. **254,** 648—652 (1979).
44. NIMMO, H. G., COHEN, P.: in Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol. 8, P. Greengard and G. A. Robinson, eds, Raven Press, New York, p. 145—266 (1977).
45. NIMMO, H. G., COHEN, P.: Eur. J. Biochem. **87,** 353—365 (1978).
45a. OCHOA, S., DE HARO, C.: Ann. Rev. Biochem. **48,** 549—580 (1979).
46. RUBIN, C. S., ROSEN, O. M.: Ann. Rev. Biochem. **44,** 831—887 (1975).
47. SKUSTER, J. R., GRAVES, D. J.: Proc. FEBS Meet. 11th, 1977 Abstract A1—6 060 (1977).
48. TÓTH, G., GERGELY, P., PARSADANIAN, H. K., BOT, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **12,** 389—398 (1977).
49. VARSÁNYI, M., BOT, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **8,** 23—31 (1973).
50. WAISMAN, D. M., SINGH, T. J., WANG, J. H.: J. Biol. Chem. **253,** 3387—3390 (1978).
51. YEAMAN, S. J., COHEN, P.: Eur. J. Biochem. **51,** 93—104 (1975).

ADATOK A GAZDASÁGI ÁLLATOK VISELKEDÉSÉNEK VIZSGÁLATI MÓDSZEREIHEZ

CZAKÓ JÓZSEF

Agrártudományi Egyetem, Gödöllő

1. *Bevezetés*

A gazdasági haszonállatok termeléssel összefüggő tulajdonságait már régóta vizsgálja az anatómia, a fiziológia, a genetika és az ökológia. E tudományok nem tudnak mindenben megfelelő választ adni az egyed és a csoport viszonyára, a környezet által okozott terheléseknek ill. az emberi beavatkozások hatására létrejövő változásokra. Az állat viselkedése az a mutató, amely az egyed tulajdonságai és a környezet kölcsönhatására választ adhat. Az etológiai vizsgálatok arról tájékozathatnak, hogy az állatok hogyan viselik el fizikailag és pszichikailag a részükre nyújtott feltételeket (tartási rendszert).

1.1. *Az alkalmazott etológiai kísérletek tárgya*

Az alkalmazott etológia a gazdasági állatok viselkedésének analízisével, az egyed vagy populáció és a környezet közötti kölcsöhatásoknak az életmódra gyakorolt befolyásával foglalkozik. Az állatok csak akkor tudják termelési adottságaikat teljes egészében érvényre juttatni, ha fajtaspecifikus életigényük a környezettel teljes összhangban van. A szervezet és a környezet kölcsönhatása közötti összefüggés feltárása, az állatok veleszületett viselkedési tulajdonságainak a technológiákban való figyelembevétele, az adaptációs készség fejlesztése, az alkalmazott etológia legfontosabb vizsgálati területe.

Gyakorlati szempontból a viselkedésen értjük mindazokat a változásait az állati szervezetnek, amelyek: az anyagcseréhez, a tájékozódáshoz, a komfort mozgásokhoz, az ön- és fajfenntartáshoz, a társas megnyilvánulásokhoz, a támadáshoz, a védekezéshez kapcsolódnak.

A gazdasági állatok viselkedésével foglalkozó vizsgálatok elsősorban a viselkedésnek a termeléssel való összefüggéseire irányulnak. A cél nem a viselkedés mechanizmusának feltárása, hanem a termelést befolyásoló olyan jellemzők megállapítása, amelyek arra utalnak, hogy az ember által nyújtott környezet és az állat igénye között milyen az összhang. Ha a környezettel való harmónia folyamatos fenntartása nem igényel ismétlődő alkalmazkodást, akkor a termeléshez (pl. tejtermelés, testtömeggyarapodás) szükséges kedvező állapot létrejöttének nincs akadálya.

Az új technológiai rendszerek kialakítása során fontos, az adott állatcsoport veleszületett és társult viselkedési jellemzőinek ismerete és figyelembevétele. Erre nemcsak azért van szükség, mert az egyes viselkedési jellemzők ismerete teszi lehetővé a technológiai berendezések helyes kiválasztását és használatát, a megfelelő üzemelési rend kialakítását, a társas együttélés kedvező jelenségeinek kihasználását, hanem azért is, mert az állatok alkalmazkodó képességének, technológiai tűrésének megismerése révén válik csak lehetővé az állattartás műszaki-biológiai egységének megteremtése.

1.2 *A viselkedési formák megnyilvánulásai*

Az állatok csak akkor tudják a gazdaságilag hasznos tulajdonságaikat érvényre juttatni, ha specifikus igényeik a környezettel összhangban vannak. A környezettel szemben támasztott igényeket a következő életmegnyilvánulási körökben vizsgáljuk a viselkedés szempontjából:

— táplálkozás,
— pihenés,
— mozgás,
— ürítés,
— játék,
— komfort mozgások,
— térérzékelés,
— társas viselkedés, csoportképzés,
— fenyegetés, támadás, menekülés
— párosodási viselkedés,
— gondoskodási tevékenység,
— közlés jelei.

A gazdasági állatoknál ezeknek a viselkedési alaptípusoknak ismerete azért fontos, mert a felsorolt viselkedési mintázatok tartástechnológiai szempontból funkcionális területet jelentenek.

2. *Az alkalmazott etológiai kísérletek tervezése*

Az etológiai kísérletek a gazdasági állatok esetében a következő főbb területek megismerésére irányulnak:

— melyek az egyes gazdasági állatfajok, ezen belül az egyes fajták és típusok viselkedési jellemzői;
— milyen viselkedési jellemzők kibontakozását kell biztosítani az ipari jellegű termelési körülmények között, ill. milyen műszaki és technológiai megoldások gátolják a jellemző viselkedési formák kibontakozását;

— melyek a veleszületett, öröklődő viselkedési mintázatok, és azok öröklődhetősége hogyan alakul;
— viselkedési jellemzők értékének meghatározásához milyen módszerek szükségesek.

2.1. *A viselkedésvizsgálatok módszerének általános szempontjai*

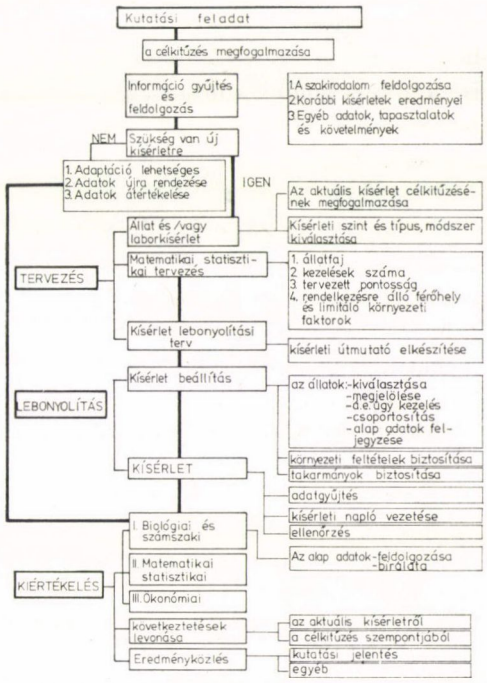
Kísérletekre akkor van szükség, amikor az információhoz nem lehet deduktív módon jutni vagy az adatgyűjtésből levezetni. A kísérlettervezés fontosabb részterületei:

a) a kísérleti feladat megállapítása;
b) a kísérlet típusának megválasztása;
c) a kísérleti feladat megoldásának megtervezése.

A kutatási feladat lebonyolításának általános modelljét — a célkitűzés megfogalmazásától az eredményközlésig — az *1. ábrán* állítottam össze.

A viselkedésvizsgálatok módszereinek szemügyrevétele alkalmából a következő kérdéseket is tekintetbe kell venni:

a) milyen esetben kell multidiszciplináris jellegű (team) kutatást végezni?
b) hogyan állapíthatjuk meg, hogy az alkalmazott módszerek megfelelőek-e?



1. ábra. A kutatási feladat modellje

c) mit kell tenni annak érdekében, hogy az eltérő időben és helyeken végzett megfigyelések bizonyos mértékig összehasonlíthatók legyenek?

d) a viselkedési típusok egyértelműek és megkülönböztethetők legyenek, hogy elkerülhessük a téves elbírálást,

e) bizonyos viselkedési jellemzők mennyiségi változása alapján nem lehet eldönteni, hogy az állat számára megfelel-e a környezet. A viselkedési formák különbsége legalább olyan döntő, mint a mennyiségi változás.

2.2. *Az alkalmazott viselkedési kísérletek típusai*

2. 2. 1. *A főbb viselkedési jellemzők megállapítása*

A gazdasági állatok viselkedésének jellemzésére a következő mutatók megállapítása jöhet szóba:

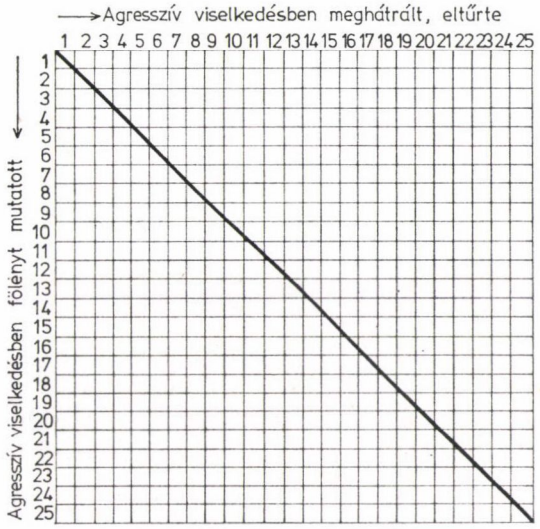
a) általános viselkedést kifejező paraméterek:
- takarmányfelvétel (beleértve a szopást is),
- ivóvíz felvétel,
- kérődzés,
- fekvés (beleértve a testhelyzetet is),
- mozgás,
- vizelet- és bélsárürítés,
- testápolás,
- anyai viselkedés és gondoskodás,
- szexuális viselkedés,
- agresszív viselkedés;

b) a közérzetet kifejező viselkedés:
- komfort viselkedés (testápolás, fürdés, testrázás, vakaródzás, nyújtózkodás, almokon történő fészkelődés),
- konfliktusos viselkedés gyakorisága,
- üres pótcselekvések gyakorisága,
- játékos viselkedés gyakorisága;

c) kiegészítő élettani paraméterek:
- testhőmérséklet,
- szívverés,
- légvétel,
- rágómozgások.

2. 2. 2. *A társas rangsor megállapítása*

A csoportos viselkedés indítékainak megértéséhez a dominálási sorrend megállapítása a leginkább alkalmazható módszer. A dominálási sorrend megállapításához az agresszív viselkedések (fenyegetés, támadás, előzés) számát



2. ábra. Rangsortábla a dominálási sorrend megállapításához

kell rögzíteni. E célból a *2. ábrán* bemutatott rangsorfelállítási táblát célszerű használni. A táblázatba azok a gyakorisági értékek kerülnek, amelyek egy-egy állat cselekedetének kimenetelét (tehát azt, hogy a fenyegetés, támadás stb. során felülkerekedett vagy alulmaradt a másikkal szemben) jelzik.

A rangsor megállapításának legegyszerűbb módszere az, ha jegyezzük, hogy az állat hányszor került fölénybe vagy hányszor maradt alul a csoport tagjaival szemben. Ennek alapján megállapítható, hogy az összes esetek hány százalékában volt egy-egy állat fölényben. Az így megállapított rangsor alkalmas arra, hogy az állat helyét a csoportban meghatározzuk.

A rangsor meghatározásához az etetés előtti időszakban észlelt versengés már megbízható adatokat szolgáltat, úgy nem szükséges az egész napi megfigyelés. A két egymásutáni napon azonos időpontban felvett agresszív viselkedés már elegendő biztonsággal mutatja a csoportban kialakult erőviszonyokat.

Az állatok azonosítása céljából célszerű a csoport tagjait számozással ellátni.

2. 2. 3. *A stresszhatás vizsgálata*

A nagyüzemi állattartásban az állatokat meglehetősen szűk helyre szorítjuk össze. A zsúfoltság gyakran a csoport kettéválását eredményezi. A csoport egyik fele, a domináns egyedek, a távolságtartás révén biztosítják maguknak az életmegnyilvánulások zavartalan lefolyásához szükséges életteret. A csoport másik felében a nem domináns egyedek zsúfolódnak össze. Ezek állandó stresszhatásnak vannak kitéve s ez a szorongás kedvezőtlenül hat a termelési folyamatokra.

A társas stressz hatása a gyakorlatban három módszerrel becsülhető meg:

a) a csoporton belüli kölcsönhatások gyakoriságával;

b) az egyedek egymástóli távolságtartásának alakulásával;

c) a csoporton belüli versengésnek a termelésre gyakorolt hatásával.

A csoporttagok kölcsönhatásának mérését az agonisztikus viselkedéssel mérjük, amelynek során ezeket a viselkedési elemeket osztályokba soroljuk. A viszonyítás alapja egy olyan populációban előforduló agonisztikus viselkedések száma és fokozata, amelynek természetes viszonyokat megközelítő terület, és 100%-os etetőtér áll rendelkezésére.

Az egyedek távolságtartását fénykép vagy filmfelvétel segítségével lehet tanulmányozni. A negatívot rácsosztályozóra lehet kivetíteni. A stresszhatás általában a domináns egyedek távolságtartásának növekedését idézi elő. Ha a távolságtartást skálabeosztáson mérjük, a társas környezet hatása számszerűen is kifejezhető. A társas stresszhatás mértéke a fiziológiai változások mérésével (mellékvese kéregállományának megnagyobbodása, a plazma lipid-, aszkorbinsav szintjének megváltozása, a pulzusszám növekedése stb.) is nyomon követhető. Ezek a módszerek a gyakorlatban — kivéve a telemetriás méréseket — igen nehezen alkalmazhatók, mert a vizsgálat maga is stresszhatást vált ki.

2. 2. 4. *A tanulási képesség vizsgálata*

A tanulóképesség elsősorban annak az érzékszervnek a kapacitásától függ, amelynek az illető probléma megoldásában kulcsszerepe van. Így például a sertés szaglása a legfejlettebb, ezt követi a mozgás, majd a hallás, s végül helyezkedik el a látás.

A tanulás folyamata a sikeres adaptációhoz szükséges reakciók felhalmozódása. A reakció a változáshoz való alkalmazkodási kísérlet. A tanulás mérésével megállapítható, hogy melyek azok az egyedek vagy csoportok, amelyek az adaptáció során — a mérőskála megválasztásától függően — sikertelenek bizonyultak.

A tanulási képesség vizsgálatára számos berendezés alkalmazható. A készülékek a *Skinner* által lefektetett elveken alapulnak, amely szerint egy bizonyos viselkedés meghozza az állat számára kívánt eredményt.

2. 3. *A gazdasági állatok viselkedésének mérésére alkalmas módszerek*

Az adatgyűjtés megkezdése előtt döntő fontosságú a megfelelő vizsgálati módszer megválasztása. Az alkalmazott etológiai kísérletek egyre inkább multidiszciplináris jellegűek lesznek, mert jellegüknél fogva komplex problémát jelentenek. Ebből következik, hogy több tudományterület vizsgálati módszerét is alkalmazni kell. Ezek szükségességét hangsúlyozva a következőkben néhány módszer rövid ismertetésére térek ki. Szeretném hagsúlyozni, hogy számos egyéb berendezés is alkalmas az adatok regisztrálására.

2. 3. 1. *A közvetlen megfigyelés, észlelés*

Valamennyi viselkedési forma mennyiségi és minőségi leírásához vagy a mintázatok előfordulási gyakoriságának megállapításához felhasználható a személyes megfigyelés. Célszerű, ha a leírást két személy egymástól függetlenül végzi, vagy az észlelők két óránként váltják egymást. A megfigyeléseket az észlelők leírják, vagy magnetofonra mondják be az eseményeket. Újabban az észlelők a viselkedési megnyilvánulásokat megfelelően előkészített jeladók működtetésével (billentyű lenyomásával) rögzítik. Ezeket a jeleket megfelelő jeltárolókban gyűjtik össze az adatfeldolgozáshoz.

Alkalmazási terület:

Csoportos és egyedi tartásban megállapítható valamennyi viselkedési forma időtartama és gyakorisága. Az ingerközlés és a reakció megjelenése között eltelt idő meghatározása.

2. 3. 2. *Mechanikus felvétel a táplálkozási életmegnyilvánulások meghatározására*

A mechanikus felvétel általában kétféle elv segítségével történik. Az egyik az, ha az állkapocsmozgásokat pneumatikus úton továbbítjuk a regisztráló készülékhez, míg a másik módszer szerint az állkapocsmozgásokat mágneses érzékelőfej és elektromos erősítő útján villamos jelekké átalakítják.

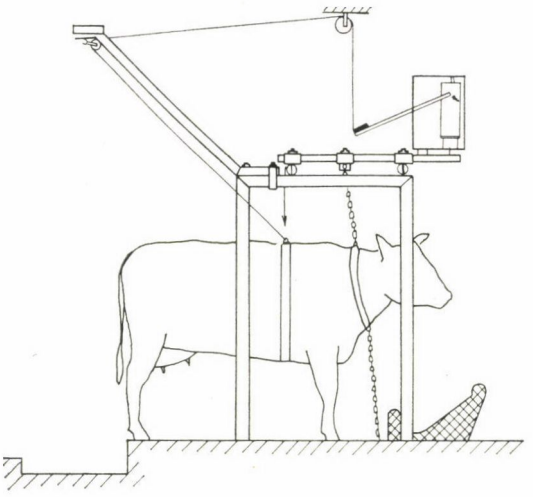
A mechanikus vizsgáló műszerek változtatható szalagsebesség,-szélesség mellett tetszőlegesen kinagyítható jeleket rögzítenek. Így a jelek kvalitatív jelleggel is jól érzékelhetők.

Alkalmazási terület: Egyedi tartásban evés, ivás, kérődzés idejének és gyakoriságának megállapítására. Az inger közlése és az evési, ivási, kérődzési reakció megjelenése közötti idő meghatározása. Az evés, ivás, kérődzés intenzitásának megítélése.

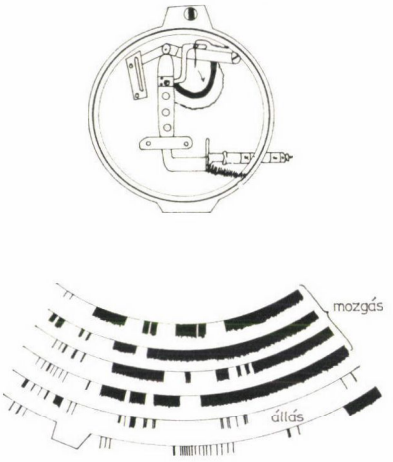
2. 3. 3. *Mechanikus mozgásfelvétel*

A helyváltoztatással nem járó mozgás mérésére általában két módszert használnak. Az egyik módszer szerint a dinamikus változások filmen rögzíthetők. A mozgásváltozás figyelemmel kíséréséhez az állat kültakarójának karakterisztikus pontjaira (pl. 3. hátcsigolya nyúlványa, könyökkulcs, ülőgumó, stb.) ún. célgombokat ragasztanak fel. A kitűzött pontok mozgását olyan vetítőberendezésen kell analizálni, amelyen a kép vizsgált pontjait koordináta-rendszerben lehet rögzíteni. A felvett koordinátákat grafikonon lehet ábrázolni.

A másik módszer szerint *(3. ábra)* az állat marjára erősített mágneshez húzódó mérőón helyzete adja meg az elmozdulás mértékét, amelyet egy írószerkezet az időfüggvényeken rögzít.



3. ábra. A mozgásváltozás mérése kötött állásban



4. ábra. A mozgási aktivitás megállapítása menetíró készülékkel (Vibracorder TFW)

Az állatok mozgási aktivitásának meghatározására többféle megoldás használható. A mechanikus mozgásidő-író készülékek általában a menetíró elve alapján rögzítik a mozgásokat (pl. Vibracorder TFW), amelyeknek intenzitásából az aktivitás minősége is megállapítható *(4. ábra)*.

Az állat lépéseinek vizsgálatára ún. „pedometer" használható, amely megfelelő áttétel segítségével a megtett út nagyságát óraszerkezeten mutatja.

Vannak olyan eljárások is, amelyek elektronikus mozgásfelvevő készülék felhasználásán alapulnak. Itt a kísérleti állat elektromágneses mezőben áll és mozgásával az erőtér változását hozza létre. A mozgás minősége nem regisztrálható.

Alkalmazási terület: Az állat lefekvése és felállása, a mozgáskorlátozó berendezések (lekötőberendezések) használhatóságának elbírálása. Ha az állat rögzítésének nincs elegendő játéka, minden lefekvés vagy felállás fáradságot okoz, az állat többször próbálkozik, mire elszánja magát rá.

A mozgás és lépésszámlálókkal az aktivitás mértéke állapítható meg. Ilyen például a társas rangsorban elfoglalt hely alapján vagy az ivarzás időszakában az aktivitás vagy az aktivitás minősége (lépés, legelés, fekvés).

2. 3. 4. *Fotocella (fénysorompó)*

Fotocella segítségével elsősorban kötött tartásban vagy fekvő boxban bizonyos mozgásokat lehet megszámlálni. A működési elv: a megfelelően elhelyezett infra fényforrás láthatatlan fénynyalábját megszakítva egy áramkör nyitását vagy zárását vezérlik és ezzel számlálószerkezetet vagy más berendezést működtetünk.

Alkalmazási terület: Egyedi kötött tartásban fekvés, állás idejének meghatározása, fekvőboxok használati idejének megállapítása.

2. 3. 5. *Felvétel képsorozattal*

A filmfelvevővel felvett viselkedési mintázat bármikor levetíthető és elemezhető. A célra jól felhasználhatók azok az automatikus vezérlésű ún. „robot-fényképezőgépek" is, amelyek csak bizonyos időközönként készítenek felvételeket.

A képmagnó is előnyösen használható a viselkedési formák megállapítására, mert nem szükséges az istállófelvételeknél sem külön fényforrás biztosítása. Ezen túlmenően az észlelő a hangszalagra mondhatja észrevételeit, amelyek segítségével a felvett képek jobban kielemezhetők.

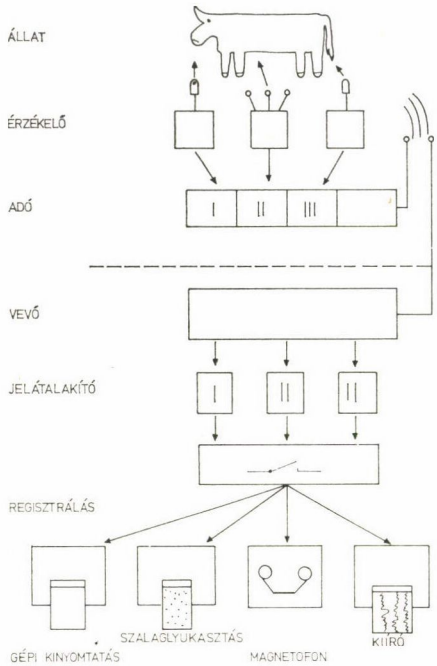
Alkalmazási terület: Csoportos és egyedi tartásban valamennyi viselkedési forma megállapítható. A felvételek közötti időtartam alapján (gyakoriság) meghatározható, hogy melyik mintázat értékelésére alkalmazható a képsorozat. Az egyedek távolságtartása is tanulmányozható a fénykép vagy filmfelvétel segítségével, ha a negatívot valamilyen rácsosztályozóra vetítjük.

2. 3. 6. *Telemetrikus berendezés*

Csoportos tartásban a viselkedési formák mérésére szinte egyedüli megoldást a telemetria jelenti! A telemetrikus mérés lényege, hogy az érzékelés és a kijelzés nagy távolságra is szétválasztható, ami a jel értékelésének és feldolgozásának szinte korlátlan lehetőséget biztosít.

A rádióbiotelemetria költséges berendezései miatt, eddig széles körű elterjedéséről nem beszélhetünk.

A berendezés legfontosabb jellemzői *(5. ábra)* az érzékelők, az adó, vevő, (ha szükséges a mérőátalakító), valamint a jeltároló.



5. ábra. A telemetrikus berendezés vázlata

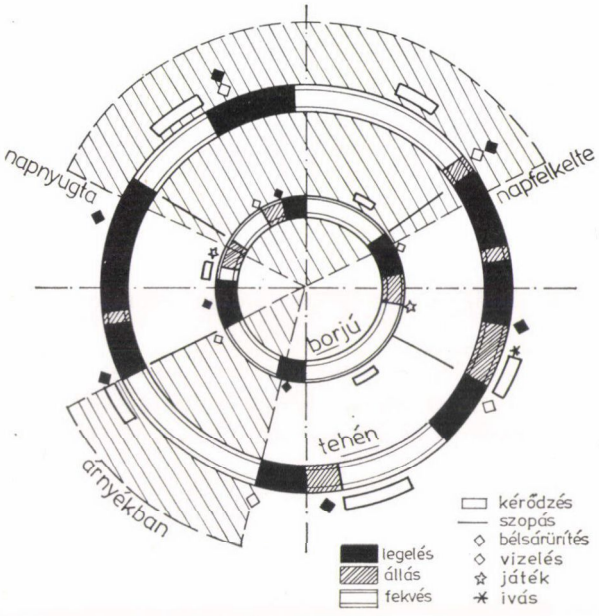
A telemetrikus berendezésekhez célszerű, egy korszerű adattároló és a gépi feldolgozásra alkalmas berendezés csatolása is.

Alkalmazási terület: Egyedi és csoportos tartásban olyan viselkedési formák és élettani paraméterek állapíthatók meg, amelyekre az ún. érzékelőket kialakították. Így például állkapocsmozgás (evés, kérődzés) mozgási aktivitás, pulzusszám, EKG-jelek, bőrhőmérséklet, a bőr elektromos ellenállása stb. mérése.

A felhasználás másik csoportját az állat belső szerveiben elhelyezett rádiószondák alkotják.

3. *A kísérletek elrendezése*

A gazdasági állatok viselkedésének vizsgálatában első lépés az ún. *etogram* (akciókatalógus) megszerkesztése, amely tartalmazza a viselkedésrepertoár elemeit. Ez mutatja az ingerekre (tartási tényezők) válaszként jelentkező viselkedés minőségi és mennyiségi mutatóit *(6. ábra)*.



6. ábra. A legelő tehén és borjú akciókatalógusa

3.1. *A kísérletek elrendezésének típusai*

A kísérletek lehetnek egy- vagy többtényezősek:

a) *Az egytényezős kísérletekben* a kezelésben részesült csoportokat (kísérleti) hasonlítjuk össze a kezelésben nem részesült (kontroll) csoportokkal. Így például, ha a szecskázás hatását vizsgáljuk az evés idejére, akkor a kísérleti csoport kapja a szecskázott takarmányt, míg a kontroll csoport ugyanazt a takarmányt szálas állapotban.

b) *Két vagy több független változót* is tanulmányozhatunk egy kísérletben (faktoriális kísérlet). Ilyenkor a kísérletező két vagy több független változót választ ki. A független változók keretében több szintet is kialakíthatunk.

A szarvasmarhákkal vizsgálhatjuk például a takarmány evési sebességének alakulását különböző napi evési idő és eltérő etetőtér ellátottság figyelembevételével. Az egyik változó az etetőtér ellátottság, míg a másik az evésre fordítható idő nagysága. A kísérleti elrendezés (mindkét független változónál 3—3 szinten) a következő:

Etetőtér ellátottság	Napi evési idő, óra		
	4	8	12
100%	+	+	+
66%	+	+	+
33%	+	+	+

Mivel a kezelések egyes variációi logikai alapon nem zárhatók ki, így $3 \times 3 = 9$ kísérleti csoport szükséges. A faktoriális elrendezéssel a független változók kölcsönhatásának tanulmányozására is lehetőség nyílik.

3.2. *A kísérletben szükséges megfigyelések ill. állatok számának megállapítása*

Az elméletileg szükséges megfigyelésszám meghatározásakor két tényezőt kell figyelembe venni. Az egyik, hogy milyen pontossággal (statisztikai biztonsággal) akarjuk becsülni a kiválasztott tulajdonság átlagát, a másik, mekkora eltérést tekintünk még a mintavétel hibájának.

A számításhoz ismernünk kell az egyes tulajdonságok szórását és a megengedhető becslési hibát. E szempontok figyelembevételével legegyszerűbben a következő képlet alapján kapjuk meg a szükséges megfigyelés ill. állatlétszámot:

$$n = \frac{t_{P\%}^2 \cdot cv\%^2}{h\%^2}$$

$t_{P\%} = 1{,}96$ (választott valószínűségi szint),
$h\% = 5$ (hibaszázalék),
$cv\% = 20$ (variációs koefficiens).

E három számadat ismeretében a szükséges megfigyelésszám állatlétszám kiszámítható. Így például a növendék hízóbikák kérdőzési idejének meghatározásához 5% pontossággal, $P = 5\%$ valószínűségi szinten, a kérődzés 20%-os variációs koefficiensével a szükséges állatlétszám: 61.

Minden kísérletnek alapvető követelménye, hogy a csoport egyedei közötti szóródást a lehető legkisebbre csökkentsük. A hibavariancia csökkentésének másik lehetséges módja, ha minden állat egyúttal saját magának is a kontrollja. Ez olyan kísérletekben lehetséges, ahol minden állatot egymás után minden vizsgált kezelési eljárásban részesítünk.

3.3. *A megfigyelési időközök megállapítása*

A főbb viselkedési jellemzők megbízhatósága elsősorban az állatok közötti egyedi különbségekből származik (ugyanis ez adja a variáció jelentős részét). A variációnak csak egy kisebb hányada származik a folyamatos vagy időszakos adatfelvételből, vagy abból hogy mennyi ideig, (hány nap) tartott a viselkedési alapadatok felvétele. Ennek ellenére ez utóbbi tényező figyelembevétele is fontos.

A folyamatos megfigyelés adja a legmegbízhatóbb adatokat. Ha erre nincs mód, akkor időszakos felvételekkel helyettesítjük a folyamatos megfigyelést.

Az időszakos megfigyelés természetesen csak azoknak a viselkedési jelenségeknek a meghatározására alkalmas, amelyeknek egy-egy szakasza általában annyi ideig tart, amilyen időközben az adatfelvétel történik. Ezért például a vízivás, a bélsár- és vizeletürítés napi időtartamát időszakos megfigyeléssel nem lehet megállapítani.

Az *1. táblázatban* saját vizsgálataim és irodalmi adatok alapján összeállítottam azokat a megfigyelési időköz nagyságokat, amelyekkel az egyes viselkedésmegnyilvánulási tulajdonságokban a folyamatos megfigyelés (legalább 0,98 erősségű korreláció alapján) időszakos adatfelvétellel helyettesíthető.

A viselkedési formák jellemző átlagértékének megállapításához egy-egy választott szakaszban 48 órás megfigyelési periódus már megbízható értéket ad. Két egymást követő megfigyelési nap átlaga éppen olyan megbízható értékű, a fekvési, evési, kérődzési idő és ezek gyakorisága, valamint a vízivások, bélsár- és vizeletürítések gyakorisága szempontjából mint a 72—96 óráig tartó megfigyelés.

A rövidített időtartamú — tehát nem 24 órára terjedő — időszakos megfigyelések értéke korlátozott mértékű. Az életmegnyilvánulások (evés, fekvés, kérődzés stb.) kifejezésére nem alkalmasak. A megfigyelések gyakoriságát a kísérleti terv készítésekor kell meghatározni.

1. táblázat

Adatfelvételi gyakoriság az állandó megfigyelés helyettesítésére

Megnevezés	Adatfelvétel			
	szopás	evés	kérődzés	fekvés
	percenként			
Szarvasmarha:				
Borjú 4 hónapos korig	3	5	5	10
Növendék marha	—	10	10	10
Növendék hízóbika	—	10	10	10
Tehén	—	10	10	10
Tenyészbika	—	10	10	10
Juh:				
Bárány	2	5	5	10
Hízóbárány	—	5	5	10
Anyajuh	—	10	10	10
Kos	—	10	10	10
Sertés:				
Szopós malac	2	1	—	3
Választott malac	—	3	—	5
Hízó	—	5	—	10
Anyakoca	—	5	—	10
Baromfi:				
Csirke (10 napos korig)	—	3	—	5
Broiler csirke	—	5	—	5
Tojótyúk	—	5	—	5

4. *A kísérletek lebonyolítása*

A kísérletet előkészítő tervezést a megvalósítás követi, amelynek alapdokumentuma, az aktuális kísérletre készített kísérleti útmutató. A kísérleti útmutatóban kell előírni a kezeléseket, a környezeti feltételeket, a speciális kívánságokat, a naplóban rögzítésre kerülő észleléseket.

A kísérleti állatok kiválasztása először biológiai szempontok szerint, majd a statisztikai elvek alapján történjék.

Minden kísérletben naplót kell vezetni. A szükséges adatfelvételezést elsősorban a célkitűzés határozza meg. Szükséges azonban néhány olyan adat rendszeres rögzítése is, amelyek a kísérlet normális lefolyását ellenőrzik, ill. támasztják alá.

5. *A kísérletek kiértékelése*

A kísérlet kiértékelését olyan szempontok alapján kell elvégezni, amely a célkitűzésnek, a feladat megválaszolásának leginkább megfelel. A statisztikai módszerek csak eszközt adnak a kutató, kísérletező kezébe. Egy olyan módszer sincs, amely minden esetben ajánlható lenne.

Az etológiai kísérletek kiértékelésére használatos statisztikai módszerekről a *2. táblázat* tájékoztat.

A kísérletek értékelése során nemcsak a mennyiségi változásokra vonatkozó mutatókat, hanem a minőségieket is figyelembe kell venni. Ez utóbbi — úgy látszik — a gazdasági állatok biológiai igénye és műszaki környezetük közötti összhang megítélése kérdésében nagyobb jelentőségű, mint a mennyiségi mutatók közötti különbségek szignifikanciája.

2. táblázat

Statisztikai módszerek az alkalmazott etológiai kísérletek kiértékelésére

A vizsgálati adatok jellege			MÓDSZEREK		
			Egyváltozós kísérletekhez	Két vagy többváltozós kísérletekhez	
				független változó	függő változó
Gyakorisági adatok	diszkrét	diszkrét eloszlás	Chi^2-teszt	Chi^2-teszt	Q-teszt
Rangsorolási próbák	diszkrét	nem normál eloszlás	Iterationsteszt Kolmogoroff—Smirnoff-teszt	H-teszt	Friedmann-teszt
Számlált adatok	folytonos	megközelítően normál eloszlás	Chi^2-teszt	Variancia-analízis	Variancia analízis Diszkriminancia analízis Többszörös regresszió

Mivel az alkalmazott etológiai vizsgálatokban ritkán van lehetőség az optimális biológiai igények kielégítését szolgáló környezeti feltételek (tartási rendszerek) biztosítására, így a kiértékelésben meg kell elégedni a viselkedési mintázatok relatív mértékű összehasonlításával. Ugyanakkor nagyobb figyelmet kell szentelni a minőségileg eltérő viselkedési minták előfordulásának, valamint a komfort érzetre utaló paraméterek figyelembevételének.

Az állatok tartási rendszerétől függő viselkedés vizsgálatakor nehéz a megfelelő következtetések levonása. Ha például a környezet nagyon egyhangú, az állatok nem reagálnak azokra az ingerekre, amelyekre egyébként normál viszonyok között reagáltak volna. Előfordulhat az egyhangú környezetben az is, hogy a legkisebb zavarás is igen erős reakciót vált ki. Így az ítéletalkotásban nem szabad csak a kapott adatokra szorítkoznunk, hanem figyelembe kell venni:

a) az állategészségügyi körülményeket,

b) az összehasonlítási alapul szolgáló viselkedési mintázatokat és azok mértékét.

Az összehasonlítási alapul szolgáló egységes rendszer — amelyben lehetősége van az állatnak megfelelő viselkedése kifejtéséhez, ösztöneinek kifejezésre juttatásához — sajnos ma még nem áll a kutatók rendelkezésére.

Összefoglalás

A szerző áttekinti az alkalmazott etológiai vizsgálatok tervezéséhez, lebonyolításához és értékeléséhez szükséges legfontosabb módszertani tudnivalókat. Ismerteti a viselkedést kifejező paraméterek, a társas rangsor megállapítására, a stresszhatás és a tanulási képesség megállapítására szolgáló módszereket. Áttekinti azokat a különböző vizsgálati eljárásokat, amelyek alkalmasak a gazdasági állatok viselkedésének mérésére.

Foglalkozik továbbá a kísérletek elrendezésének kérdéseivel, a szükséges megfigyelések számának és a megfigyelési időközök megállapításával. Végül rámutat arra, hogy a kísérletek kiértékelése milyen nehézségekkel jár együtt.

IRODALOM

Czakó J.: Gazdasági állatok viselkedése. Mezőgazdasági Kiadó Budapest (1978).
Fraser, A. F.: Farm Animal Behaviour, Bailliere Tindall, London (1974).
Hafez, E. S. E.: The behavior of domestic animals. Bailliere — Tindall Co. London (1962).
Hahn, Le R.: Behaviour studies as means in environmental research: research methods. Agricult. University of Norway CIGR Reports As (1977).
Hinde, R. A.: Animal Behaviour. Mc. Graw-Hill Book Co. New York (1966).
Immelmann, K.: Einführung in die Verhaltensforschung. Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg (1976).
Marler, P.—Hamilton, W.: Az állatok viselkedésének mechanizmusai. Mezőgazdasági Kiadó Budapest (1975).
Stokes, A. W.: Praktikum der Verhaltensforschung. VEB. G. Pischer Verlag, Jena (1971).
Tembrock, G.: Grundriß der Verhaltenswissenschaften. VEB. G. Fischer Verlag, Jena (1973).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója. Műszaki szerkesztő: Marton Andor
A kézirat nyomdába érkezett: 1979. III. 22. — Terjedelem: 22,4 (A/5) ív, 54 ábra

80.8329 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

50,— Ft ISNN 0052—0333

TARTALOM

Megemlékezés 1

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

Kövér András és Gesztelyi István: Primycin hatása a vázizom elektromos sajátságaira és az elektromechanikai csatolásra 5
Szabolcs Márton: Kalcium-transzport vizsgálatok fragmentált szarkoplazmatikus retikulumon 15
Kériné Fülöp Ildikó, Jóna István és Kónya László: A vázizom Ca-kompartmentalizációjának matematikai analízise számítógépes programmal 29
Kónya László: A koffein kontraktúrák paramétereit befolyásoló tényezők vizsgálata béka vázizmon 37
Laczkó Jenő és Varga Sándor: A vörösvértest alak vizsgálatának néhány aspektusa konzervált és konzervált-rejuvenált vérmintákon 43
Tóth Ida: Biológiai minták előkészítése és kvalitatív röntgen-sugár mikroanalízise 53
Ligeti Erzsébet: Mitchell kemiozmotikus elmélete a mitokondriális ion-transzport folyamatok tükrében 67
Szász Ilma, Sarkadi Balázs, Hasitz Mária, Enyedi Ágnes és Gárdos György: A Ca-pumpa sajátságainak vizsgálata ép emberi vörösvérsejteken, izolált membrán fragmentumokon és kifordított membrán vezikulákon 93
Hasitz Mária: Az emberi trombocita membrán glükoproteinjeiről 109
Török Tamás és Vizi E. Szilveszter: Nátrium-pumpa (Na + K-aktiválta membrán ATPáz) jelentősége a neurokémiai transzmisszió posztszinaptikus szabályozásában 123
Ábrahám Ambrus: Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok emberi carotis testeken ... 143
Baranyi Ilona: Citológiai változások a p-bróm-metamfetamin (V—111) hatására a tavi kagyló (*Anodonta cygnea* L.) központi idegrendszerében 179
Menyhárt János és Marcsek Zoltán: A tüdőszövet sejtjeinek in vivo DNS szintézisét specifikusan gátló, fehérje természetű faktor részleges tisztítása marhatüdőből ... 189
ifj. Gáspár Rezső, Damjanovich Sándor és Somogyi Béla: Sejtpopulációk automatizált analízise és szeparálása 205
Gergely Pál és Bot György: Fehérjék foszforilációs és defoszforilációs átalakulásának szabályozása 223
Czakó József: Adatok a gazdasági állatok viselkedésének vizsgálati módszereihez 239

Megjelent 1980. XII. 30.

Index: 26.496

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

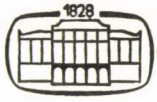
BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI

TIGYI JÓZSEF

XXIII. KÖTET 3—4. SZÁM



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST
1980

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK
KÖZLEMÉNYEI

A SZERKESZTŐ BIZOTTSÁG TAGJAI
ALFÖLDI LAJOS, BALOGH JÁNOS, FARKAS GÁBOR, JERMY TIBOR

SZERKESZTŐ
TIGYI JÓZSEF

TECHNIKAI SZERKESZTŐ
DÉZSI LÁSZLÓ

SZERKESZTŐSÉG: MTA BIOLÓGIAI OSZTÁLYA BUDAPEST 1051 MÜNNICH FERENC U. 7.

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST 1363 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:

1051 Budapest Münnich F. u. 7. Dézsi László technikai szerkesztő.

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 84,— forint. Megrendelhető belföldre az Akadémiai Kiadónál (Budapest 1363 Alkotmány u. 21. Pénzforgalmi jelzőszám: 215-11488), külföldre a „KULTÚRA" Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest 1389 Fő utca 32. Pénzforgalmi jelzőszám: 218-10909) 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, az összefoglalók pedig további egy, ill. két nyelven. A dolgozatot magyar vagy a megfelelő idegen nyelven az alábbi címekre kell beküldeni:

Acta Biochimica et Biophysica szerkesztősége, 1113 Budapest Karolina út 29. (Dr. Sajgó Mihály) és 7624 Pécs Szigeti út 12. (Dr. Niedetzky Antal).

Acta Biologica szerkesztősége, 8237 Tihany MTA Biológiai Kutatóintézete (Dr. Salánki János).

Acta Botanica szerkesztősége, 2163 Vácrátót, MTA Botanikai Kutató Intézet (Dr. Borhidi Attila).

Acta Chirurgica szerkesztősége, 1082 Budapest Üllői út 78/b. Urológiai Klinika (Dr. Rényi-Vámos Ferenc).

Acta Medica szerkesztősége, 1083 Budapest Szigony u. 43. KOKI (Dr. Stark Ervin).

Acta Microbiologica szerkesztősége, 1097 Budapest Gyáli út 4. OKI (Dr. Lányi Béla).

Acta Morphologica szerkesztősége, 1094 Budapest Tűzoltó u. 58. Szövet- és Fejlődéstani Intézet (Dr. Somogyi Endre).

Acta Paediatrica szerkesztősége, 1083 Budapest Bókay János u. 53. I. sz. Gyermekklinika (Dr. Véghelyi Péter)

Acta Physiologica szerkesztősége, 7622 Pécs, Rákóczi út 80. (Dr. Hartmann Géza).

Acta Zoologica szerkesztősége, 1088 Budapest Baross u. 13. Természettudományi Múzeum (Dr. Soós Árpád).

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYA 1980. ÉVI KÖZGYŰLÉSI BESZÁMOLÓJA

TIGYI JÓZSEF

Osztályülésünkre nem az eddigi szokásos 3 éves cikluson belül kerül sor, hanem egy évvel később. Az MTA Elnöksége és az elmúlt évi közgyűlés azért döntött így, hogy a testületek élete, tevékenysége is jobban igazodjék az államélet, a népgazdasági tervezés immár hagyományos ötéves ciklusához. Bár az évi közgyűlésünk soron következő tisztségújító és számvetést tévő közgyűlések egyike, az 1980-as év mint századunk 8. évtizedének első éve, inspirál arra, hogy egyrészt távolabbi múltba tekintsünk vissza számvetésünk alkalmával, másrészt soron következő feladatainkat is távolabbi jövőre fogalmazzuk meg.

Számunkra, biológusok számára nyilvánvaló, hogy a folyamatok időbeni lefolyása nagymértékben független a kronológiai időtől, de a társadalmi mozgásokat, eseményeket mégis ezzel kell mérnünk

Az 1950-es években szakterületünkre az útkeresés és az önállóságra való törekvés volt a jellemző. A szervezeti, ideológiai gátak ellenére mégis volt lehetőségünk a biológiai kutatások — bár szerény — de igen széles körű anyagi támogatására. Ennek volt köszönhető a biológiai tudományos munkának — a felszabadulás előtti időkhöz nem mérhető — kibontakozása. A 60-as évekre sikerült elérni osztályunk önállóságát az Akadémia szervezetén belül és megvalósítani a biológia egységét. Megalakultak a mai szakmai bizottságok. Ez időben jóllehet a támogatott kutatóhelyek száma csökkent, a kutatás állami támogatása mégis nagymértékben emelkedett. Különösen jelentős volt az Akadémia részéről az a segítség, amellyel a kutatóhelyek műszerezettségéhez, korszerűsítéséhez járult hozzá. A 70-es évek további jelentős fejlődést, egyúttal változást hoztak. Megvalósult a már az 50-es évek második felében fogant terv; elkészült a Szegedi Biológiai Központ, amely ma már mint a hazai kísérletes biológiai kutatás legjelentősebb bázisa funkcionál.

Az SZBK mellett a többi intézeteink és az egyetemi biológiai kutatóhelyek megerősödését bizonyítja, hogy a biológiai kutatásokról szóló beszámolóinkban arról adhattunk számot, hogy a kutatások metodikai színvonala több területen megközelítette, vagy elérte a nemzetközi színvonalat. Eredményeink és kutatóink elismerését bizonyítják, a 60-as évek közepétől a 70-es évek közepéig hazánkban megtartott nemzetközi rendezvények sorozatai,

amelyeken az egyes szakmák legnevesebb külföldi képviselői is részt vettek. Gyarapodtak pozícióink a nemzetközi tudományos szervezetekben nemcsak tagsági szinten, de a vezető tisztségekben is.

Az Akadémia szervezetének 1970-ben történt átalakulása új helyzet és feladatok elé állította a tudományos osztályokat. Ez az átállás a „tisztán" testületi tevékenységre nem ment végbe zökkenőmentesen. De végül Osztályunk is és a tudományos bizottságaink is megtalálták a részben új problémákat és a korai bizonytalankodás után hozzáláttak az újszerű feladatok megoldásához. Ezekről a korábbi közgyűléseink alkalmával részletesen beszámoltunk. Emlékeztetőül engedjenek meg csupán néhány kiemelt jelentősebb példát: állásfoglalás a biológiai műveltségről, közreműködés a közművelődési határozatok kidolgozásában, a természetvédelmi törvény előkészítésében, az oktatási reformban. Jelentős volt közreműködésünk az OKKFT kidolgozásában, helyzetelemzések, prognózisok készítésében, de számos főhatóság elhatározásában — rendeletében megtaláljuk testületi állásfoglalásainkat, javaslatainkat.

Osztályunk, bizottságaink négy éves tevékenységének összefoglalását megtalálják vendégeink a *közgyűlés fehér könyvében*. Engedjék meg, hogy itt csak néhány kiemelést tegyek, de szívesen vennék néhány további részletet bizottságaink tagjai hozzászólásaiból. Örvendetesen szaporodott a kandidátusok száma a négy év alatt. Számuk 90-nel növekedett. Feltűnő a gyakorlati, klinikai, üzemi, mezőgazdasági munkahelyen dolgozók arányának növekedése.

Doktoraink száma 6-al növekedett, jelenleg folyamodnak számosabban e magasabb fokozatért. A 70-es évek elején a biológia elméleti kérdéseire történő figyelem felkeltésünknek és támogatásunknak eredményei mutatkoztak. Személynevek helyett itt most helyénvalóbb témákat említeni, mint pl. a hominid evolúció, ökológia, enzimológia, biofizika, molekuláris evolúció területén, amelyek könyvekben, disszertációkban jelentek meg, illetve Akadémiai Díjjal ismertünk el.

Rendezvényeink száma a korábbi évekhez képest csökkent. Örvendetes viszont, a hazai multidiszciplináris témájú és metodikai tanfolyamszerű tanácskozások arányának növekedése. Összesen 18 neves külföldi tudós tartott előadást osztályunk rendezésében és látogatott meg számos hazai intézetet.

Könyvkiadásunkban az előző évekhez képest tovább növekedett az önálló művek aránya; az elmúlt évek terméséből az oktatás és továbbképzés szempontjából kiemelendőnek tartjuk a Biofizika c. kézikönyv második kiadását, továbbá a Biokémia c. kézikönyvet. Nagy sikert értünk el Jávorka—Csapody Nagy Képes Növényhatározója facsimile kiadásában. Hosszas stagnálás után újabb kötetekkel gyarapodott a Magyar Tájak c. sorozat. Eredményes a Symposia Biol. Hung. sorozatunk. Actáink jó színvonalat képviselnek. Mindemellett kutatóink eredményeik bemutatására szívesebben prefe-

rálják a fémjelzett nemzetközi szakmai lapokat. Az indok legtöbbször a hazai Acták megjelentetésének lassúsága. Úgy hiszem mind szerkesztőbizottságaink, mindpedig modern felszereltségű nyomdánk állhatná a versenyt a legtöbb külföldi vezető lappal, ha egyrészt kutatóink a hazai szerkesztőségekbe is olyan gondosan formált, elkészített és olyan tökéletesen fordított cikkeket adnának be, mint azt a hivatkozott külföldi lapoknál teszik, másrészt a Kiadó is kiemelt ügyként kezelné az Actáink gyors átfutási idejét.

Tényként kell megállapítani, hogy az utóbbi néhány évben a kezdeti lendület alábbhagyott és testületeink mindinkább annak adnak hangot, hogy véleményeink, állásfoglalásaink visszhang nélkül maradnak, vagy kevésbé érvényesülnek. Azt hiszem, nem járok messze az igazságtól, ha ennek okát részben — és kiemelten hangsúlyozni kívánom, hogy csak részben — abban látom, hogy erre az időre esik az országos kutatás-fejlesztés extenzív időszakának országos csökkenése és az intenzív fejlődés követelményének előtérbe kerülése. Ez lehet egyik oka annak, hogy a testületi ajánlások nem fogannak az elvárt mértékben a nehéz döntések előtt álló igazgatási, irányítási állásfoglalásokban.

Meggyőződésem: nem szócséplés, ha megállapítjuk, hogy az új évtized, de legalább is az előttünk álló öt év, (miként egész országunk életében) a feladatokban új helyzetfelismerést, új munkamódszert és célkitűzéseket vár tőlünk is. Feladatunkat tömören a következőkben látom és erről kérem a tisztelt kollégák véleményét. A jövő érdekében szinten kell tartani az alapkutatást, de ez egyúttal lépéstartás kell legyen a nemzetközi színvonallal. A kutatóhelyeknek törekedniök kell, hogy eredményeik minél egyszerűbben, közvetlenebbül kerüljenek alkalmazhatóvá; hogy a megváltozott gazdasági feltételek között is elismert, megbecsült maradjon a tudományos kutatás. Ennek elősegítésére a testületek igen sokat tehetnek. A gyorsan változó világ, a hazai és nemzetközi helyzetképek elemzését teszik szükségessé. Fokozott felelősséggel kell készítenünk közép- és hosszútávú prognózisokat. A bizottságok, munkabizottságok sokoldalú képviseletüknél fogva — különösen ha általánossá és folyamatossá teszik a kutatóhelyeken folyó munkák helyszíni figyelemmel kísérését — kiválóan alkalmasak a messenger szerepére alapkutató laboratóriumok és a termelés között.

Mind több biztató jelét látjuk annak, hogy kutatóink komolyan veszik az idő szavát, a párt és a kormány irányítását és terveikben, munkájukban mind határozottabban jelentkezik a gyakorlat, a termelés igényeihez való igazodás. Annak azonban, hogy ez a reménytkeltő közeledés a termelés és alapkutatás között valóban gyümölcsözőbbé váljék, két alapvető feltételét látom. Az *egyik* az, hogy kölcsönösen nyíljanak meg az üzemek és laboratóriumok ajtajai és találjanak egymásra a kutatók konkrét kérdéseikkel és eredményeikkel. Ismerjék meg a problémákat, lehetőségeket, feltételeket. Fontos ez azért, mert a legjobb szándékú terv és a legbölcsebb tudomány-

politika sem képes minden esetben arra, hogy éppen fontos kérdésekben a megfelelő kutatókat összehozza. E reményemet szeretném előbb említett jó példával alátámasztani. Hivatkozom a nemzetközi rendezvényeink sikerére, melynek alapja a kérdésben legjobb kutatók összehozása volt. Bíznunk kell abban és segítenünk kell, hogy ezt a sikert hazai viszonylatban a termelés legfontosabb kérdéseiben is elérjük.

A *másik* feltételt egy kissé egyoldalúbban látom. Az alapkutatás az elmúlt évtizedekben óriási léptekkel haladt előre. Ez elkerülhetetlenül a kutatók túlspecializálódásához vezetett. Ugyanakkor a termelésben is jelentősen emelkedett a technikai szint, ami a gyakorlati szakemberek részéről is erős szakosodást követelt meg.

Ez a tendencia rányomta bélyegét a szakemberképzésre is. A szűk szakma magas szintű oktatása mellett a határterületek — adott esetben a biológiai — alaptárgyak korszerű oktatása háttérbe szorult, ill. nem érte el azt a korszerű ismeretszintet, amely lehetővé tenné az alapkutatási eredmények hasznosítási lehetőségeinek gyors felismerését, adaptálását, illetőleg a szükséges kommunikációs lánc kiépítését a megfelelő alapkutató laboratóriumokhoz.

Mindezzel azt szeretném hangsúlyozni, hogy korunk követelményeinek csak korszerű szervezési módszerekkel, és korszerű oktatással tudunk megfelelni.

Akadémiánk új gazdasági helyzete, a biológiai kutatáshoz szükséges módszerek árának hatalmas arányú növekedése kiemelt feladatunkká teszi a nemzetközi tudományos együttműködések fokozott — lehetőleg valutamentes formában való — támogatását. Akadémiai és egyéb főhatóságokhoz tartozó biológiai, egészségügyi, és mezőgazdasági kutatóhelyekkel is fokozottan szervezett együttműködést kell kialakítanunk. Az ilyenfajta együttműködésnek eddig is már számos pozitív példáját sikerült megvalósítani. Néhány példával illusztrálnám milyen alkalmazási lehetőségek bonthatók ki az elméleti kutatásokból. A tegnapi nagysikerű és új alkalmazási perspektívákat megnyitó tudományos ülésszakunk az agrár-ökológiai potenciálról a korábbi évek, évtizedek hazai autökológiai, szünbiológiai, produkciós biológiai kutatásokból sarjadt ki. A korszerű növényvédelem nem nélkülözheti az állatfajok és életmódjuk ismeretét. A víziszervezetek a műszereknél jobban jelzik a vizek minőségét; korábbi alapadatok nélkül a jelenlegi felgyorsult folyamatok nem lennének ellenőrizhetőek. A ma nagyüzemileg termelt halivadék előállításának elvi problémája több évvel ezelőtt Tihanyban alapozódott meg.

Az SZBK Enzimológiai Intézetében készült az az aminosavanalizátor, mely az esszenciális aminosavak gyors kimutatásával a mezőgazdasági termékek minőség ellenőrzését fejlesztette jelentősen. Enzimológiai Intézetünk nemzetközi szintű háttere lehet az élelmiszeriparban és az állati takarmányok

jobb hasznosításában oly jelentős szerepet vivő enzimológiának. A genetic engineering-nek már több gyakorlati eredménye van külföldön, pl. inzulin gén coli-ba való beépítésébe. Hasonló eredmények fogadására, adaptálására jól felkészült hazai team-ünk van.

A Paksi Erőmű nem működhetne megfelelő felkészültségű radiobiológiai gárda nélkül. A nukleáris medicina ismertebb fogalma mellett a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban is mind szélesebb körben alkalmazzák az ionizáló sugárzásokat, e kutatások metodikai alapjait a hazai sugárbiofizikai kutatások szolgáltatták. Ki lehetne próbálni több alapkutatást szolgáló műszer gyakorlati felhasználását, mint pl. az egysejtszámlálót az ivarspecifikus sperma előállítására. Ennek esetleges sikerét az állattenyésztők — úgy vélem — értékelnék. A molekuláris biológia átütő elméleti eredményeit nagy várakozás, majd erős szkepticizmus követte hazánkban is. Megfelelő idő kellett ahhoz, hogy a módszerek, új technikák és magának a kutatási stratégiának öntörvényű trendje elérje a rendkívül bonyolult sejt-szöveti szintet. A magasabbrendű mechanizmusokba való *tudatos* — és nem „a sötétben is lehet valamit markolni" elven való — behatoláshoz idő kellett. A citológia, genetika, immunológia mai eredményei a molekuláris technikák ismerete nélkül elképzelhetetlenek lennének.

Az Osztály bizottsági tevékenységében is szervezetten erősíteni kell kapcsolatunkat a társfőhatóságokkal, mert valljuk meg őszintén — e területeken sok még a tennivalónk.

Feltétlenül rendezni és fokozni kell az együttes tevékenységet, valamint a koordinációt az Oktatási Minisztériummal, az Egészségügyi Minisztériummal, a Mezőgazdasági- és Élelmezésügyi Minisztériummal, a Természet- és Környezetvédelmi Tanáccsal, ill. az Országos Testnevelési és Sporthivatallal is.

Tisztelt Osztályülés!

Most legyen szabad a jövő teendői legfontosabb alapelveinek felvázolására rátérnem.

Mindenekelőtt a fő célkitűzésünket kell világosan megfogalmaznunk: A magyar biológusok — s így a Biológiai Osztály — feladata az, hogy legjobb tudásuk szerint műveljék a biológia tudományát, mindezt elsősorban azért, hogy a tudomány eredményeivel társadalmunkat, a dolgozó népet segítsük abban, hogy hazánk anyagi és szellemi életszínvonala a lehető leggyorsabban növekedhessék. A XII. pártkongresszus kijelölte és meghatározta a tudománnyal kapcsolatos elvárását:

„A párt igényli a tudomány fokozottabb részvételét a döntések megalapozásában, feladataink megoldásában. A tudományos munkában is az erők ésszerű koncentrálására kell törekedni, főleg azokon a területeken, ahol hagyományaink, adottságaink, a személyi feltételek és anyagi erőforrásaink reális lehetőséget adnak az eddiginél nagyobb eredmények elérésére. Tervszerűbbé kell tenni a kutató-fejlesztő munkát, a tudományos intézmények

és a termelőüzemek együttműködését. Részesüljenek jelentőségüknek megfelelő támogatásban a tudomány fejlődését, a társadalmi céljainkat szolgáló fontos alapkutatások."

Azt hiszem ezen célkitűzéseket minden magyar biológus elfogadja és magáévá teszi.

Ezen általános elvárás alapján a prioritások kijelölése és az erők fontosság, valamint adottságok szerinti elosztása közös feladatunk.

A magyar biológiának — kis ország lévén — nem lehet ereje arra, hogy a biológia egész területét lefedje és nagy intenzitással művelje. Ki kell válogatnunk azokat az irányokat, amelyeket a tudomány távlati fejlődése, valamint a népgazdaság igényei hangsúlyozottan követelnek, ezekre kell mozgósítanunk erőnk nagyobb részét. Ez azonban nem jelenti azt, hogy nem kellene gondoskodnunk arról, hogy minden fontosabb részdiszciplínában folyjék szinttartó kutatás, hiszen sohasem lehet tudni, hogy a biológia rohamos fejlődése révén a súlypontok a közeli és távoli jövőben hogyan alakulnak.

Alapkutatási szinten azokat az irányokat kell művelnünk, melyekben nemzetközi versenyt bírni képes szakembergárdánk és megfelelő felszerelésünk is van. A népgazdaság által követelt kutatási célokat szintén súlypontozni kell és világosan el kell dönteni, hogy mi gazdaságosabb, ill. előnyösebb a hazai kutatás, vagy külföldi tapasztalat, licencek, know-how-k átvétele. Persze szem előtt kell tartani azt is, hogy annak kiválasztása, hogy éppen melyik szabadalmat vegyük át, és hogy azt adequát módon alkalmazzuk szintén jelentős kutatási tapasztalatot igényel.

Osztályunknak 3 fő kutatási irányban kell figyelmét és erejét koncentrálnia.

1. Az életfolyamatok szabályozásának mechanizmusa (bioreguláció).
2. A biológiailag aktív vegyületek kutatása.
3. Természet és környezetvédelmi kutatások (bioszféra).

Az első — a *Bioreguláció* — témáért formálisan is a MTA, ill. Osztályunk a felelős, koordináló intézet az SZBK, de több más intézetünk és kutatócsoportunk is részt vesz benne.

A nagyrészt alapkutatási jellegű kérdésfelvetésben számos orientált téma szerepel, melyek az orvostudomány és a mezőgazdaságtudomány praktikus problémáihoz közel állnak, ill. ilyen jellegű konkrét együttműködés folyik.

A *biológiailag aktív vegyületek kutatásáért* nem az Osztály a felelős, de számos intézetünk jelentős kapacitással vesz részt benne. Az a véleményünk — és ez a felfogás alakult ki az Osztály tagjai Visegrádon tartott kötetlen eszmecseréjén is — hogy fokozni kell e témában és egyáltalán a népgazdaság szempontjából is fontos *magyar gyógyszeriparban* az együttműködésünket. A gyógyszergyártás, a mezőgazdaság kemizálása és a biológiai egyensúlyt a lehető legkevésbé károsító ágensek feltárásában.

A *bioszféra* főirány kutatásáért szintén nem Osztályunk a felelős, de eddig is úgy gondoltuk és a továbbiakban is az lesz a vezérelvünk, hogy a magyar biológus szakembereknek mindig éberen kell őrködniök és legjobb tudásuk szerint a szaktudomány legmodernebb szintjén kell véleményüket kifejteni, ha kell, szenvedélyesen vitatkoznunk azért, hogy ez a szép ország gyermekeink és unokáink számára is kellemes és egészséges életkörülményeket tudjon biztosítani.

Konkrétan: permanens feladatunk, hogy szemmel tartsuk és tudományos módszerekkel ellenőrizzük biológiai környezetünket, továbbá óvó és javító intézkedéseket dolgozzunk ki 1. a Balaton, valamint 2. a Budapest-i agglomeráció kérdésében.

Továbbra is tanulmányozni kell a Gabcsikovo—Nagymarosi dunai vízlépcső biológiai egyensúly eltolódásainak várható alakulását, valamint a Tiszai vízlépcső hatásainak szakszerű ellenőrzését.

Hosszú időre feladatunk marad még az atomipar kialakításával kapcsolatos sugár- és hőszennyezési problémák tanulmányozása, konkréten a Paksi atomerőmű környezetbiológiai problémái.

Az említett folyamatos feladataink mellett fokozott gondot kell fordítanunk az ökológia tudományszakának fejlesztésére, már csak azért is, hogy a fenti feladatok megoldásához szakszerűbben tudjunk közelíteni.

Új és az energiaéhséggel kapcsolatos — de még alapkutatási fázisban lévő — feladatot is kaptunk az elnökségtől a bioszoláris energiaátalakítás kutatását. Ez a munka egyelőre az SZBK Biofizikai Intézetében folyik előkísérleti stádiumban.

Csak a legfontosabb tudományos feladatainkat említettem, emellett még számos fontos és értékes téma folyik, melyeket erőnk szerint támogatni javaslunk. Szeretném kihangsúlyozni, hogy az Osztály egyik állandó feladata kell legyen, hogy a világ biológiai tudományának növekedési pontjaira érzékenyen reagáljon és terveit mindig rugalmasan, eszerint próbálja kidolgozni.

Miután vázlatosan ecseteltem főbb célkitűzéseinket és főbb kutatási feladatainkat, vizsgáljuk meg, hogy milyen módszerekkel tudjuk ezeket megvalósítani.

A Biológiai Tudományok Osztálya testületi szerv, munkáját ennek megfelelő formában kell végeznie. Az Osztálynak nincs a kutatások támogatására anyagi lehetősége, de meglévő szakmai, szellemi tőkéjét képes kamatoztatni, ha megtalálja azokat a szervezeti módokat és csatornákat, melyeken a szellemi energia anyagi erővé válik.

Mindenekelőtt az Osztály tagjainak és a bizottságainkba tömörült lelkes és hozzáértő kollektívának egybehangolt és rendszeres tevékenységére van szükség.

Azt hiszem, a hozzáértéssel nincs baj, de a szervezettséget, rendszerességet és az együttes, egyértelmű fellépés vonalát még erősítenünk kell.

Bizottságaink rendszerét nem javasoljuk gyökeresen megváltoztatni, de fokozni kívánjuk az interdiszciplinaritást és együttműködést más tudományterületek képviselőivel. Javasoljuk, hogy hozzunk létre két akadémián kívüli testületekkel közös bizottságot is:

1. Természetvédelmi Bizottságot az Országos Természet- és Környezetvédelmi Hivatallal.

2. Sportbiológiai Bizottságot az Országos Sporthivatallal. Gondolkozunk azon, hogy a Neurobiológiai Bizottságot az Orvosi Osztállyal közösen működtessük és nagyobb figyelmet kívánunk fordítani a Földtudományok és az Orvosi Osztály közös bizottságában a Bányaegészségügyi és Bányászati Ergonómiai Bizottságban való tevékenységünkre.

Munkánk szakmai színvonalának fejlesztésében legfontosabb kutatóink képzettsége, ezért fokozni kívánjuk az egyetemekkel való együttműködést, de követni kívánjuk az általános és középfokú biológiai oktatást is. Megvalósuláshoz kell segítenünk a biológus posztgraduális képzést mind kutatói, mind biológus-tanári szinten.

Hogy a felsorolt feladatokat megoldhassuk, igen jelentős mértékben kell javítanunk a már említett szakfőhatóságok, valamint a Természettudományi II. Biológiai Főosztállyal való együttműködésünk színvonalát és rendszerességét. Ezen együttműködések alapja az lehet, hogy javaslatainkat mindig szakmailag a legmagasabb szinten, reálisan, időben tesszük meg, s nemcsak tőlük kapott kérdésekben nyilatkozunk, hanem — mint a tudomány helyzetének legmagasabb szintű ismerőitől elvárható — iniciatívákat is felvetünk és ezzel a fejlődés perspektíváinak kijelölésében is segítséget nyújtunk. Meg vagyok győződve arról, hogy ilyen feltételek mellett minden szakigazgatási szerv szívesen és intenzívebben fog velünk együttműködni.

A fenti szervezeti jellegű tevékenység mellett van egy fontos feladatunk, melyet a munka hatékonysága miatt is előtérbe kell helyezni. A nívós szakmai tudományos ankétok, munkaértekezletek, vitaülések számának növelése. Az alkotó légkörű szakmai viták, a megfelelő építő kritikai szellem, a fiatal szakemberek aktivizálása igen jelentős mértékben megnövelheti ütőképességünket, munkánk eredményességét és a társadalom számára való hasznosítását.

Tisztelt Osztályülés !

Meg vagyok győződve arról, hogy az igen tehetséges magyar biológusok tábora egyetért ezen célkitűzésekkel. Rajtunk, a Biológiai Tudományok Osztályán múlik, hogy mennyire sikerül a következő ötéves tervperiódusban ezeket az erőket mobilizálni és összefogni. A testületi jellegű munkában sokszor van olyan érzése az embernek, hogy erőfeszítései hiábavalóak, süket fülekre, sőt néha rosszindulatra találnak. Én hiszek a „szellemi energia megmaradásának" elvében. Egy valóban értékes gondolatsor, terv, javaslat, — ha aktuálisan el is vetik — előbb-utóbb hasznosítódik és nem vész el. Meg

vagyok győződve arról, hogy ha így fogjuk fel a testületi munkát, találni fogunk elég aktív, energikus fiatal és lélekben fiatal biológust, aki hajlandó csatasorba állni és a magyar biológia felvirágoztatásáért lelkesen dolgozni.

HOZZÁSZÓLÁSOK

ALFÖLDI LAJOS:

Tisztelt Osztályülés! Az elnöki beszámolóban említés történt a Szegedi Biológiai Központ működéséről is.

Intézményünk alapításakor az Akadémia vezetése megszabta feladatainkat. Első helyen azt a feladatot kaptuk, hogy a kísérletes biológia néhány aktuális területén érjük el a nemzetközi szintet, sőt a nemzetközi mezőnyben legyünk versenyképesek. Úgy gondolom, nem az én feladatom, hogy az elért eredményeinket értékeljem, éppen ezért azt szeretném kérni az Osztály vezetésétől, hogy a jövő évi akadémiai nagyhéten biztosítson számunkra lehetőséget eddig elért tudományos eredményeink bemutatására. Ez a bemutatás annál is inkább aktuálisnak látszik, mert intézményünk megnyitásának jövő évben lesz a 10. évfordulója, s az Osztály és a hazai tudományos közvélemény méltán lehet kíváncsi arra, hogy eleget tettünk-e a velünk szemben támasztott követelményeknek.

Szakmai jellegű feladataink megítéléséhez hozzá szeretném még tenni, hogy az elmúlt néhány évben különös hangsúlyt nyert alapkutatási feladatainknak olyan módosítása, hogy azok népgazdasági haszonnal is járjanak. Ennek a kívánalomnak olyan módon próbáltunk eleget tenni, hogy szoros kapcsolatot építettünk ki a gyógyszeripar és a mezőgazdaság felé. A Gyógyszerkutató Intézettel, nagy gyógyszergyárainkkal mint a Kőbányai Gyógyszerárugyár, CHINOIN, EGYT, BIOGAL, ALKALOIDA Gyógyszervegyészeti Gyár, mindennapos kapcsolatba kerültünk. A mezőgazdaság területén a Gabonatermesztési Kutató Intézettel, a Sasad Tsz-el, a Rozmaring Tsz-el, a Dohánykutató Intézettel és még sok más mezőgazdasági jellegű munkát folytató intézménnyel kerültünk kapcsolatba. Ugyancsak megtaláltuk a kapcsolatot a növényvédőszeriparral is. Ezeknek a gyakorlati kialakításoknak az orientálásánál nagy segítségünkre volt az Országos Műszaki-Fejlesztési Bizottságtól kapott céltámogatás.

Elsődleges kutatási feladataink mellett még két fontos feladatot kaptunk. Egyik a posztgraduális kutatóképzésben való intenzív részvétel, a másik a nemzetközi kapcsolatok megfelelő szinten történő kiépítése.

A posztgraduális képzés területén legsikeresebbnek a nemzetközi továbbképző tanfolyamunkat tekintjük, ami 8 évvel ezelőtt a UNDP—UNESCO támogatás keretében indult. Három éve azonban kizárólag saját erőből működtetjük. Erre a nemzetközi továbbképző tanfolyamra évente 15—20 külföldi hallgatót áll módunkban felvenni, és minden évben kétszeres — négyszeres

túljelentkezés mutatkozik. Hazai 15 helyünkre azonban még sosem volt 15 hazai jelentkező.

A nemzetközi kapcsolataink úgy véljük jól alakultak. Különösen fontos ez azért, mert az igazán új tudományos ismereteket gyorsan és időben személyes kapcsolatok alapján lehet megszerezni. Ha egy kutató egyedül a publikált anyagra támaszkodik, jó pár éves késésben van.

Különösen örömünkre szolgál, hogy a szocialista országok akadémiai intézményeivel is kitűnő kapcsolatokat építettünk ki, és a Szovjetunió nagy biológiai központjaival, a puscsinoi, novoszibirszki és a moszkvai akadémiai intézetekkel sikerült az együttműködési lehetőségeket megtalálni.

Az elmondottak után szeretném megköszönni az intézetünknek nyújtott támogatást és kérni, hogy a Biológiai Osztály a jövőben még fokozottabban vegyen részt a kutatóközpontunk tudományos profiljának kialakításában és formálásában.

TERPÓ ANDRÁS:

Tisztelt Osztályülés! Az MTA Botanikai Bizottságának *Botanikuskerti Albizottsága* 10 éve alakult. Feladatul kapta a magyarországi botanikus kertek helyzetfelmérését, ajánlások kidolgozását tudományos tevékenységük koordinálására, fejlesztésére. A helyzetfelmérés során abból indultunk ki, hogy Európában a botanikuskertek (arborétumok stb.) többszáz éves tudományos múltra tekintenek vissza; a kísérletes tudomány bölcsői voltak és az ún. génalaptartalékok létesítésében, továbbá *ritka* (kipusztulóban lévő) növények betelepítésében és megmentésében messze megelőzték a ma általánossá váló, a környezetvédelem körébe tartozó intézkedéseket, eljárásokat.

Annak érdekében, hogy a kertek szakemberei megismerjék egymást, eddig négy országos tanácskozást tartottunk és bekapcsolódtunk a szocialista országok botanikuskerti szervezeteinek munkájába is (NDK, Csehszlovákia). Kiadtuk a hazai kertek jegyzékét (TERPÓ A.: „A magyarországi botanikuskertek jegyzéke és bibliográfiája"), amely azóta elfogyott.

A botanikuskerti tanácskozásokon olyan kérdéseket vitattunk meg, mint pl.:

— a kertek és a természetvédelmi területek munkájának összehangolása;

— a szakosítás és az élőgyűjtemények;

— a botanikuskertek növényanyagának tudományos és gyakorlati hasznosítása;

— valamint általában megtárgyaltuk a botanikuskertek nemzetközileg is hangsúlyozott funkcióit, amelyek a következők:

1. biológiai közművelődési feladatok;
2. szakmai, oktatási tevékenység;
3. tudományos feladatok ellátása;

4. „Index Seminum" kiadása, azaz bekapcsolódni a nemzetközi szaporítóanyag cserébe és a nemzetközi botanikuskerti szervezeti életbe.

A teljesen kialakult kertek bekapcsolódtak a *nemzetközi szaporítóanyag* (mag) cserébe is. Ez a kertek egy olyan negyedik funkciója, amelyet a magyarországi kertek közül csak 13 kert végez. Ha hozzátesszük még azt, hogy néhány intézmény közösen ad ki Index Seminumot, akkor ez a szám eléri a 17-et.

A botanikuskertek első feladatát értékelve hangsúlyoznunk kell, hogy azok mindig kulturális intézménynek is számítottak. Egyéb kulturális intézményektől (színházak, múzeumok, állatkertek), abban különböznek, hogy a pénzügyi támogatásuk rendkívül csekély. Ennek ellenére erről a kérdésről is beszélnünk kell, mert a soron következő feladatok, mint:

a) az élő gyűjtemények bemutatókon történő hasznosítása;

b) a kiskertmozgalom segítése;

c) növényismereti tanfolyamok rendezése;

d) biológiai versenyek szervezése.

elengedhetetlenné teszi a színvonalas és főleg a korosztályoknak, továbbá a szakmai képzettségnek megfelelő, színvonalas biológiai közművelési és pedagógiai tevékenység végzését.

A bemutatók közül ki kell emelnünk néhányat, amelyek már közismertek az országban. Legjelentősebb a *Jeli Erdészeti Botanikus Kert (Kám)* rendszeresen, évről-évre visszatérő — *rhododendron* bemutatója, a *Dísznövény és Gyömölcstermesztési Kutató Intézet rózsabemutatója* (Budapest), a Kertészeti Egyetem *Soroksári Botanikus Kertjének gombabemutatója.*

A botanikus kertek mint a tudományos kutatás legrégibb intézményei — ma is több esetben kisebb ráfordításokkal (beruházással) — végeznek korszerű kutatómunkát (kísérleti-ökológiai, kísérleti-rendszertan, feno-ökológia). Mások viszonylag kisebb anyagi és személyi támogatással bekapcsolhatók lennének a kísérleti kutatómunkába.

Azt is hangsúlyoznunk kell, hogy a nemzetközi tapasztalatokból olyan következtetések vonhatók le: csak az olyan kutatómunka hat fejlesztőleg egy-egy füvészkertre, amelyik szorosan összefügg a kert sajátos tevékenységével, céljaival. Ha az intézmény vagy a kert kutatási tervében ez nem szerepel, egyszóval ha nem az említett típusú kutatási munkát végezzük, akkor az annyira elkülönülhet a botanikus kerttől, hogy inkább teher, mint előny, a botanikus kerti funkciók sikeres végzéséhez.

Bizonyos minimális kutatómunka minden kertben végezhető. Amennyiben azt is jobban tudatosítjuk, hogy minden botanikus kert *fő tevékenysége* — a kisebb-nagyobb élőgyűjtemények összehasonlítása és fenntartása, azaz a gyűjtemények szakszerű elrendezése és meghatározása, mindig kísérleti és kutatómunka is — akkor eljutottunk odáig, hogy a kertek, ill. az élőgyűjtemények létesítése, a rendkívül eltérő ökológiai igényű növények sikeres meg-

tartása, nemcsak a termesztés, hanem a tudományos kutatómunka szférájába is tartozik. Az így fenntartott és feldolgozott (néha részben már honosított potenciálisan is tudományos értékű anyag, jelenti a génalaptartalékokat, és további kutatásokra, más intézmények részére is rendelkezésre áll.

Gyakran nevezik a volt kastélyparkokat az ún. *történelmi kerteket* is botanikus kerteknek (arborétumoknak).

A történelmi kertek rendszerint természetvédelem alatt állnak, a kert stílusa miatt, vagy értékes — rendszerint — idegenföldi fafajaikért. Mint *élőgyűjteményeket* vagy *dendroparkokat* feltétlenül támogatnunk kell. Az is jó megoldás, ha egy-egy botanikus kert vagy arborétum vállalja szakmai gondozásukat és fejlesztésüket; ezt a formát érdemes volna általánossá tenni.

A botanikus kertek és a védett területek élőgyűjteményeinek fenntartására, kutatására, a biológiai köznevelésben történő hasznosítására irányuló évszázados törekvéseket nemcsak nálunk, hanem külföldön is — a korszerű *igényeknek megfelelően* — napirendre tűzték. Bár botanikus kertjeink fő funkcióikban, illetve típusaikban jelentős mértékben eltérnek egymástól — vannak köztük *iskolakert típusú*, *tudományos célú* (kutatóintézeti), *ismeretterjesztő* jellegű kertek —, mindegyik rendelkezik ma értékes és elég gazdag növényanyaggal.

Füvészkerti, eddigi gyakorlati munkájuk során sokat tettek a ritka, értékes és hasznos (vadontermő (félkultúr-) növények megőrzése, fenntartása és bemutatása érdekében. Nem jelentkezik tehát teljesen új feladatként az élőgyűjteményeknek, a mai igények szerint történő *létesítése*, *fenntartása*, *kutatása*, *bemutatása* és a gyakorlatnak vagy az alkalmazott kutatási ágazatoknak való átadása.

Feladataik megvalósítása érdekében ugyan sok nezézséggel kell megküzdeni, de ezen a szakterületen dolgozó szakemberekre sem volt jellemző, hogy nem tettek volna meg mindent a növénykertek fejlesztéséért, az értékes növényanyag begyűjtéséért, fenntartásáért. Anyagi és szakember ellátottságuk növekedésével, a kertek és a kapcsolódó intézmények koordinációjának fejlődésével, munkájuk a mainál is lényegesen eredményesebbé válhat.

BODROGKÖZY GYÖRGY:

Tisztelt Elnök Úr, Tisztelt Hallgatóság! A nagy érdeklődéssel hallgatott osztálybeszámolóval kapcsolatban, mely röviden foglalkozott a hidrobiológia, valamint a környezet- és természetvédelem problémaköre kutatásának helyzetével is, kiegészítésként szabad legyen megemlítenem, hogy a Tiszakutató Munkaközösség évtizedek óta foglalkozik a Tisza-völgy hasonló feladatainak kutatásával. Az ötvenegy tagot számláló Munkaközösség tagjait, akik között az egyetemek és főiskolák munkatársain, a vízügyi igazgatóságok szakemberein kívül biológus tanárok és muzeológusok egyaránt képviseltek, kizárólag

a szakmai érdeklődés és lelkesedés kovácsolt össze egységes, társadalmi jellegű munkacsoporttá. Megoszlásukat tekintve vízkémikusok, hidrobiológusok, természetföldrajzosok és klimatológusok, zoológusok és botanikusok alkotnak kisebb-nagyobb kutatócsoportokat. Feladatuk az általános Tisza-völgy kutatás, az ott fellelhető ökoszisztémák és környezetökológiai viszonyaik, produkcióbiológiai változásainak feltárása mellett, kiemelt feladatok megoldása. Erőinket elsősorban a Mártély—Saséri Tájvédelmi Körzet természetes biocönózisainak a lehetőségek keretein belüli rekonstrukciója, valamint a Kiskörei-víztároló környezet átalakító hatásának vizsgálata köti le. Ugyanakkor hozzákezdtünk a leendő Alpári víztároló területének hidrobiológiai-biocönológiai kutatásaihoz is. 1980-tól előbbre lépve, egyidőben kölcsönösen végzett, az egyes kutatócsoportok vizsgálati eredményeire támaszkodva, a környezetökológiai tényezők, elsősorban a hidrográfiai és edafikus hatások maximálisan figyelembe vevő komplex kutatások indultak, melyek összhangba kerülnek és hozzájárulnak a gyakorlat által igényelt vízminőségi, haltenyésztési, vadgazdálkodási, rét- legelőművelési, erdészeti és nem utolsó sorban a természetvédelmi kérdéseknek a Tisza-völgy vonatkozásában történő megoldásához.

Eredményeink nemzetközi vonatkozásban is elismertek, Horváth Imre professzor által annak idején megindított kapcsolatfelvételek eredményeként a Szovjetunióban az Ungvári és Jugoszláviában az Újvidéki Tudomány Egyetemmel válik, illetve vált lehetőség tiszakutatási együttműködési szerződés megkötésére. Ezáltal a Tisza forrásvidékétől a torkolatáig összehangolt bioökológiai vizsgálatok időszaka veheti majd kezdetét, egységes munkaprogram keretében.

Legnagyobb problémát a szűkös anyagi lehetőségek jelentik. Vázolt feladatainkat csak megfelelő anyagi háttér biztosítása teszi realizálhatóvá. Nagy erőfeszítések árán tudja csak megjelentetni periodikánknak a Tiscia-nak évenkénti köteteit, melyek cseréje a könyvtár, ill. folyóirat állományunk fenntartásának, fejlesztésének egyetlen biztosítéka. Ehhez kérjük a Biológiai Tudományok Osztályának további erkölcsi és anyagi támogatását.

SALÁNKI JÁNOS:

Tisztelt Biológiai Osztály! Az utóbbi években egyre gyakrabban hangzik el a szelektív kutatástámogatás mint követendő finanszírozási elv. Részletesen szólt erről az elnökségi és a főtitkári beszámoló is. Ezzel összefüggésben egyre inkább felmerül a kutatómunka objektív értékelése iránti igény és gyakran esik szó azokról a módszerekről, melyek bevezetése ennek érdekében célirányos lenne. Az igazság az, hogy különböző nyilvános fórumokon többnyire dicsérni tudunk csak, bírálni még alig. Az értékelés eme kevésbé népszerű válfaja legfeljebb a folyosókon vagy csak négyszemközti beszélgetéseken hangzik el és

gyakorta ugyanez tapasztalható a tudományos minősítés disszertációs vitái kapcsán is. Márpedig nyilvánvaló, hogy az objektív értékelés — mint ahogy a tudományos közvélemény is — nemcsak elismerést, hanem bírálatot, sőt elmarasztalást is magában foglal, de ennek kimondására, ami kényelmetlen, nem túlságosan hálás, sőt sokak szemében barátságtalannak tűnő magatartás, nem sokan vállalkoznak. Azt gondolom, az így kialakult helyzetben reálisan nem is várható, hogy egyik napról a másikra lényeges változás következzen be a nagy kongresszusokon, vándorgyűléseken, konferenciákon elhangzó előadások vitája tekintetében. Az azonban elvárható, hogy szűkebb műhelymegbeszéléseken, így elsősorban az Osztály szakmai bizottságaiban érdemi és objektív értékelésre, kritikára, szakszerű véleménymondásra kerüljön sor a beszámolók és tervek megbeszélése, a kutatóhelyek meglátogatása során. Azért tulajdonítok ebben nagy fontosságot az Osztály bizottságainak, mert ott, szakmailag hozzáértő szűkebb körben jobban elvárható a szókimondó bátorság, továbbá megteremthetők a lélektani feltételei is nemcsak az elismerés kinyilvánításának, de a kritikai megjegyzések elmondásának, az aggályok és kényes kérdések felvetésének, vitára serkentő javaslatok megtételének, tanácsok adásának is.

Az értékeléshez természetesen jelentősen hozzájárul a tudományos eredmények közzététele, mind a konferenciákon, hazai és külföldi kongresszusokon való előadás, mind a közlemények megjelentetése. Úgy gondolom nemcsak elégséges, de talán sok is a hazai rendezvények száma, mert gyakori, hogy ugyanazzal az anyaggal — esetleg más társszerző előadásában — több helyen is találkozni lehet. Ennek az is oka, hogy a Társaságok és különböző szervek rendezvényeinek tematikája nincs koordinálva és a különösen divatos témák rövid időn belül többféle szervezésben — de majdnem azonos előadókkal — is megjelennek a tudományos közélet porondján. Hasznos lenne, ha az Osztály megfelelő ütemezésben foglalkozna a területéhez tartozó szervezetek éves rendezvénytervével, megkísérelné koordinálni azokat és javaslatot is tehetne témákra, illetve a felesleges párhuzamosságok kiiktatására. Lényegesnek tartanám a hazai nemzetközi rendezvények további támogatását, ahol egy-egy hazai kutatási irány vagy iskola nemzetközi fórum előtti bemutatása teljesebben történhet meg, mint amit egy-egy kutató külföldi kongresszuson való részvétele biztosíthat.

A tudományos munka értékelésében a szcientometriai módszerek egyre inkább elterjednek hazánkban is. A TMB kezdte ezt azzal az igénnyel, hogy a doktori fokozatra pályázóknak be kellett nyújtaniuk a munkáikra való irodalmi hivatkozások jegyzékét, és ma már az Akadémiai könyvtárban hozzáférhetők az idézettség-figyeléssel kapcsolatos világadatok, melyek mintegy 3800 folyóirat folyamatos feldolgozásából származnak. Jóllehet ez a módszer is távol van a tökéletességtől, arra azonban egyértelműen ráirányítja a figyelmet, hogy a legjobb tudományos eredmények értéke is csak akkor

realizálódik, ha a publikálási politika biztosítja azoknak a nemzetközi irodalomba való bejutását. Ehhez elengedhetetlen a hazai kutatási eredmények külföldi folyóiratokban, illetve az Akadémia idegennyelvű Actáiban való közlése. Utóbbiakat sok kritika éri, nem mindig jogosan. Ezen a fórumon, mint az Acta Biologica jelenlegi főszerkesztője, szeretném elmondani: nem a kiadói és nyomdai átfutás jelenti a fő gondot — bár zavarok és hiányosságok a Kiadó munkájában is vannak — hanem az, hogy sok szerző az Actához küldött kéziratok esetében távolról sem jár el azzal a gondossággal és gyorsasággal, mint a külföldi folyóiratok esetén teszi. Biztosan állíthatom, hogyha elegendő számú és csak nyelvi lektorálást kívánó angolsággal megírt kéziratokat kapnánk, továbbá, ha nem akadna minden számnál egy-két gondatlan, lassú, és hogy úgy mondjam nemtörődöm szerző, aki a nyomdai munkát a korrektúrák javítása idején hátráltatja, a benyújtástól számított 8—10 hónap alatt a dolgozatok megjelenhetnének. Nagyon jó lenne persze, ha az Akadémia segíteni tudná a Kiadót és az Acták szerkesztőségeit szakavatott fordítók, ill. nyelvi lektorok képzésében, továbbképzésében és a jelenleginél serkentőbb díjazásában.

Szó esett a beszámolóban arról, hogy az Akadémia alapvető feladatának tekinti az alapkutatás támogatását, de ezzel együtt szorgalmazza az eredmények gyakorlati hasznosítását, a gyakorlattal való kapcsolatot is. Fontosnak tartom mind a kettőt, de kiemelendőnek vélem: szükséges az alapkutatás támogatásának nemcsak hangsúlyozása, de gyakorlata is, mert ezt az Akadémia helyett más főhatóság feladatánál fogva nem teszi meg. Az alapkutatások művelése elsődlegesen az Akadémia által fenntartott és támogatott kutatóhelyekre, valamint az egyetemekre hárul. Mindamellett én is úgy vélem, a Biológiai Osztály is többet tehet a gyakorlati igények kielégítése, illetve az elért eredmények gyakorlati felhasználása tekintetében, mint amit eddig tett. Éppen ennek érdekében javasolnám, hogy a Bizottságok újraszervezése során a fiatalítás mellett, — ami a fehér könyvben feladatként szerepel — azt is fontolja meg az Osztály, miként lehetne gyakorlati szakembereket is bevonni a Bizottságok munkájába. Ez javítaná az információ áramlását, az eredmények alkalmazási lehetőségeinek feltárását, érdemi együttműködés kialakítását a kutatóhelyek és a gyakorlati intézmények között. Az elmúlt években különösen az olyan nagy intézetek, mint az SZBK és mások sok eredményt értek el ebben a vonatkozásban, de azt hiszem, a kormány által kijelölt fő kutatási témák közül pl. a gyógyszer- és növényvédőszer kutatásban az élettani kutatások révén az eddiginél több bekapcsolódási lehetőség kínálkozik. Jelenleg az a helyzet, hogy még a régen megfogalmazott és kialakult elképzelések megvalósításának üteme is igen vontatott és bizonytalan. Példaként elmondhatom, hogy még osztályelnök korában Szentágothai akadémikus vetette fel 1972-ben, hogy a rovarkártevők elleni védekezés, így a hazai növényvédőszerkutatás korszerű rovarélettani kutatásokat igényelne. Erre válasz-

ként és főosztályi támogatással a Tihanyi Biológiai Kutatóintézetben el is indult egy kezdeményezés, hogy az ottlévő neurobiológiai csoport felszereltségbeli és szellemi kapacitásának felhasználásával egy ilyen irányzat kifejlődhessen. Ez a fejlesztés azonban megtorpant, jelenleg csak egy kis volumenű célprogram és a NEVIKI-vel való 5 éves külső megbízásos szerződés biztosítja a kezdeményezés fenntartását. Azt gondolom, szükséges a finanszírozó, intézetfejlesztést biztosító főosztály egyértelmű állásfoglalása annak érdekében, hogy tudjuk, vajon a korábbi elhatározás és a helyi erőből kialakult kezdeményezés megvalósulásának, ill. kibontakozásának támogatására lehet-e számítani és célszerű-e tovább folytatni az eddigi, már eredményt is felmutató erőfeszítéseket, vagy sem. Köszönöm a figyelmet.

SAJGÓ MIHÁLY:

Tisztelt Osztályülés! Az Acta-kérdéssel kapcsolatban szeretném a figyelmet egy véleményem szerint lényeges körülményre felhívni.

Már az előttem szólók említették, hogy az Acta-sorozat füzetei a tervezetthez képest jelentős késéssel jelennek meg. Ennek okaként a beküldött kéziratok egy részének alacsony színvonalát, gyenge fordítását, illetve az Akadémiai Nyomda munkájának lassúságát jelölték meg.

Én magam már tizenötödik éve végzem igaz örömmel az Acta Biochimica et Biophysica biokémiai anyagának technikai szerkesztését így alkalmam volt egy sajnálatos folyamat kialakulását megfigyelni, mely részben magyarázza ezt az időbeni elcsúszást. Ez az ok a következő. Jelenleg a folyóirat — a közlésre kész kéziratanyagot tekintve — szinte egyik napról a másikra él. Keservesen gyűlik össze egy-egy füzetnyi anyag, ezért rendszerint késünk a nyomdakész kézirat leadásával. Ha elcsúszunk a leadással, már a Nyomda ütemezéséből is kiesünk, tehát késni fog a megjelenés. Ha késik a megjelenés, természetszerűleg nyúlik egy-egy cikk átfutási ideje, ezért kevesebb cikket kapunk: a kör bezárul.

Nem állítja senki, hogy az Acta Biochimica et Biophysica az élvonalba sorolt folyóirat. De az is tény, hogy a Current Contents-ben időnként megjelenő értékelés szerint idézettségét tekintve nem áll éppen rossz helyen, annyira semmiképpen nem rossz, hogy a hazai kutatók ennyire tartózkodjanak a folyóiratban történő közléstől.

Úgy érzem, hogy elsősorban ott lehet segíteni, ahol a segítség rajtunk múlik. Javaslom ezért az Osztály nagytekintélyű és nagyhatalmú tagjainak hogy szelíden vagy kevésbé szelíden kíséreljék meg munkatársaikat úgy befolyásolni, hogy eredményeik egy részét az Actában közöljék. Ha a Szerkesztőségnek elegendő anyag áll rendelkezésére, már van remény arra, hogy az ördögi kör felnyíljon és a jelenlegi képtelenül hosszú átfutási idő rövidüljön. Köszönöm figyelmüket.

A MATEMATIKAI ÉS FIZIKAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK, AZ ORVOSI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK,

valamint

A BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK EGYÜTTES TUDOMÁNYOS ÜLÉSE

1980. május 7—8.

ÚJ VONÁSOK A BIOFIZIKÁBAN

AZ ELŐADÁSOK PROGRAMJA

TARJÁN IMRE, az MTA rendes tagja, az ülés elnöke: Megnyitó

STRAUB F. BRUNÓ, az MTA rendes tagja: Biológiai makromolekulák szerkezete és funkciója

ZÁVODSZKY PÉTER, a biológiai tudományok kandidátusa: Az immunglobulin — különböző tevékenységek összehangolása egy makromolekulában

CSER LÁSZLÓ, a fizikai tudományok kandidátusa: Az immunglobulinok konformációjának vizsgálata

DAMJANOVICH SÁNDOR, a biológiai tudományok doktora és munkatársai: A fehérje matrix dinamikája és az enzimfunkció közötti kapcsolat

VENETIANER PÁL, a biológiai tudományok doktora: Génműködés és nukleinsavszerkezet

RONTÓ GYÖRGYI, a biológiai tudományok kandidátusa: Pontszerű sérülések fágokban

KESZTHELYI LAJOS, a fizikai tudományok doktora: Membránhoz kötött fehérjék működése

GYÖRGYI SÁNDOR, a biológiai tudományok kandidátusa: Szerkezeti átalakulások lipidmembránokban

SZENTÁGOTHAI JÁNOS, az MTA rendes tagja: Idegi strukturák és funkciójuk

SALÁNKI JÁNOS, az MTA levelező tagja: Az idegsejt elektromos aktivitása

FEHÉR OTTÓ, az orvostudományok doktora: Tanulás az idegsejt szintjén

LÁBOS ELEMÉR, a biológiai tudományok kandidátusa: Neuronális rendszerek analízise és szintézise

ZIMÁNYI JÓZSEF, a fizikai tudományok doktora: Neuronhálózatok önszerveződésének egy matematikai modellje

VÁMOS TIBOR, az MTA rendes tagja: A mesterséges és természetes intelligencia

TIGYI JÓZSEF, az MTA rendes tagja: Távlati lehetőségek

BERÉNYI DÉNES, az MTA levelező tagja: Elektronspektroszkópia: Új lehetőségek a biológiai-orvosi problémák kutatására

KAPUY EDE, a fizikai tudományok doktora: Kvantumkémiai módszerek
SZLÁVIK FERENC, a KFKI Műszaki igazgatóhelyettese: Számítógépes kardiológiai módszerek

MEGNYITÓ

TARJÁN IMRE, az MTA rendes tagja

Korunk tudományát a fokozódó interdiszciplinaritás jellemzi. Az utóbbi években a közgyűlések alkalmával többször került sor komplex, több tudományágat, következésképp több tudományos osztályt érintő tudományos programok szervezésére és lebonyolítására. Az idén a Matematikai—Fizikai Tudományok, az Orvostudományok és a Biológiai Tudományok Osztályai állítottak össze közös programot, *új vonások a biofizikában* címmel.

Témáink elsősorban az atomi és molekuláris kölcsönhatások biológiailag is érdekes kérdéseivel, valamint a szerkezet és a funkció közötti kapcsolatok problémáival foglalkoznak. Pontosabban: az előadások három kérdéskör köré csoportosulnak. Az egyik a biológiailag érdekes makromolekulák, éspedig fehérjék, a nukleoproteidek (kromoszómák) és a lipoproteidek (biológiai membránok) szerkezetével és funkciójával foglalkozik, a másik az idegi struktúrákkal és funkcióikkal, a harmadik pedig a szerkezetvizsgálati fizikai módszereinek újabb hatásos lehetőségeivel. Természetesen a programban szereplő előadások nem adnak teljes képet még a megjelölt témakörben sem az itthoni munkákról. Néhány újdonság bemutatásáról van szó, ez is speciális aspektusból, éspedig főként a fizika oldaláról.

Úgy vélem, magyarázatot kíván a címben szereplő „új vonások" kifejezés. Ezzel igényességünket kívántuk kifejezésre juttatni. Olyan eredmények ismertetésére gondolunk, amelyek nemcsak önmagukban érdekesek, hanem új összefüggésekre mutatnak rá, vagy új megközelítési módokat jelentenek, mindenesetre további gondolatokat ébresztenek.

Hazánkban a biofizikának szép hagyományai vannak. Ernst Jenő nemcsak itthon, de nemzetközileg is az elismert úttörők közé tartozik. Aktivitásának lényeges szerepe volt abban, hogy hazánkban viszonylag korán alakultak ki kisebb-nagyobb kutatócsoportok is, és ezek száma növekedőben van. Az utóbbi években különösen megnőtt az érdeklődés a biofizika iránt a legkülönbözőbb alapképzettségű kollégák körében. A fokozódó érdeklődés összefügg azzal a ténnyel, hogy nagy lépéseket tettünk meg az anyag lényegének a megismerésében, és ebben éppen a fizika járt és jár elöl. Ez a fejlődés teszi lehetővé, hogy minden természettudományban a jelenségek, folyamatok alapjait atomi, ill. molekuláris szinten kereshessük. Ha az atomok, molekulák világában mozgunk, eltűnik az a különbség a tudományágak között, ami valamikor a szeparálódás alapjául szolgált, de ami csak addig van meg, amíg makroszkópikus szinten dolgozunk.

BIOLÓGIAI MAKROMOLEKULÁK SZERKEZETE ÉS FUNKCIÓJA*

STRAUB F. BRUNÓ

MTA Szegedi Biológiai Központ Enzimológiai Intézete,
Budapest

A biológiai makromolekulák kifejezés tulajdonképpen kettős értelmű. Egyfelől jelenti összefoglalóan azokat a makromolekulákat, amelyek az élő szervezetekben, sejtekben előfordulnak, az élő sejt *termékei*. Másrészt viszont ennek a kifejezésnek van egy olyan értelme is, hogy ezek azok a makromolekulák, amelyek sajátos fizikai és kémiai tulajdonságai olyanok, hogy biológiai jelenségek *alapjául* szolgálhatnak. Annak összefoglalására vállalkoztam, hogyan alakulnak ki ezek a sajátos tulajdonságok.

Az alapvető biológiai makromolekulák egyszerűbb szerves molekulákból kovalens kötésekkel összekapcsolt nagy láncmolekulák, melyek 10^4—10^{10} dalton nagyságrendűek, közülük a fehérjék a kisebbek, a nukleinsavak a legnagyobbak. Az utóbbi két-három évtizedben a fizika, kémia és a genetika módszereivel a biológiai makromolekulák szerkezetének legtöbb fontos vonását megismertük.

(A poliszaharidok közül a tartalék és a rostanyagok, mint a keményítő vagy a cellulóz, aránylag egyszerű szerkezetűek, szerkezetük funkcionális jelentősége nem hasonlítható össze a fehérjék vagy a nukleinsavak szerkezetének jelentőségével, ehelyütt ezekkel nem is foglalkozunk. Hasonlóképpen, rövidség okából nem tárgyaljuk a posztszintetikus módosításoknak a makromolekulák egyrészében jelentős szerkezeti és funkcionális szerepét.)

Fehérjék szerkezete

A fehérjék szerkezetének az a legfontosabb elve, hogy az aminosavakból kovalens peptidkötésekkel felépülő — el nem ágazó, lineáris — polipeptidlánc in vivo körülmények között *egy előre meghatározott térszerkezetű makromolekulává* gombolyodik össze. Az így kialakuló makromolekula nagyjából globuláris, ezen belül a polipeptidlánc előre meghatározott feltekeredésének módját, a magasabbrendű szerkezetet, a fehérje aminosav sorrendje (ún. elsődleges szerkezete) határozza meg.

BERNAL már 1934-ben kimondta, hogy a fehérje szerkezetén belül minden egyes atomnak meghatározott helyzete van. Ennek a meghatározott

* Bevezető előadás.

szerkezetnek a létrejöttében és fenntartásában szerepe van olyan hidrogénhidaknak — gyenge kölcsönhatásoknak, melyek révén a polipeptidlánc különböző részleteiben elhelyezett peptidkötések (-CO-NH-csoportok) között jön létre kapcsolat. Ennek eredménye lesz az ún. alfa-hélix: a kb. 3,6 aminosavmenetmagasságú csigavonalban közelítőleg egymás felett elhelyezkedő peptidkötések CO- és NH-csoportjai közötti hidrogénkötésekkel stabilizált szerkezet. Más esetben a polipeptidlánc két különböző kinyújtott részlete egymás mellett fut (vagy parallel vagy antiparallel elhelyezkedéssel) és ezek -CO-NH-csoportjai között alakul ki néhány peptidkötés között hidrogénhíd. Az ilyen szerkezeti elemet béta-hajtogatott lemez szerkezetnek nevezzük. Mint az 1. ábrán látható, egy fehérjemolekulán belül alfa-hélix és béta-hajtogatott lemez szerkezetek váltakoznak „nem rendezett" (de jól meghatározott térszerkezetű) szakaszokkal.

A polipeptidlánc végső feltekeredettsége (ún. harmadlagos szerkezete) nemcsak az eddig említett hidrogénhidakkal stabilizált elemekből tevődik össze, hanem a szerkezet kialakításában résztvesznek a polipeptidláncról oldalra kinyúló, változatos és jellegzetes aminosavoldalláncok is. A vízben oldható fehérjékre jellemző, hogy belsejükben a hidrofób aminosavoldalláncok gyenge kölcsönhatásai révén több a hidrofób oldallánc, míg a fehérje felületén relatíve több a hidrofil oldallánc. (Hidrofób oldallánca van a glicin, alanin, valin, leucin és más aminosavaknak, míg a savanyú és a bázikus, valamint a hidroxi--amino-savak oldallánca hidrofil.)

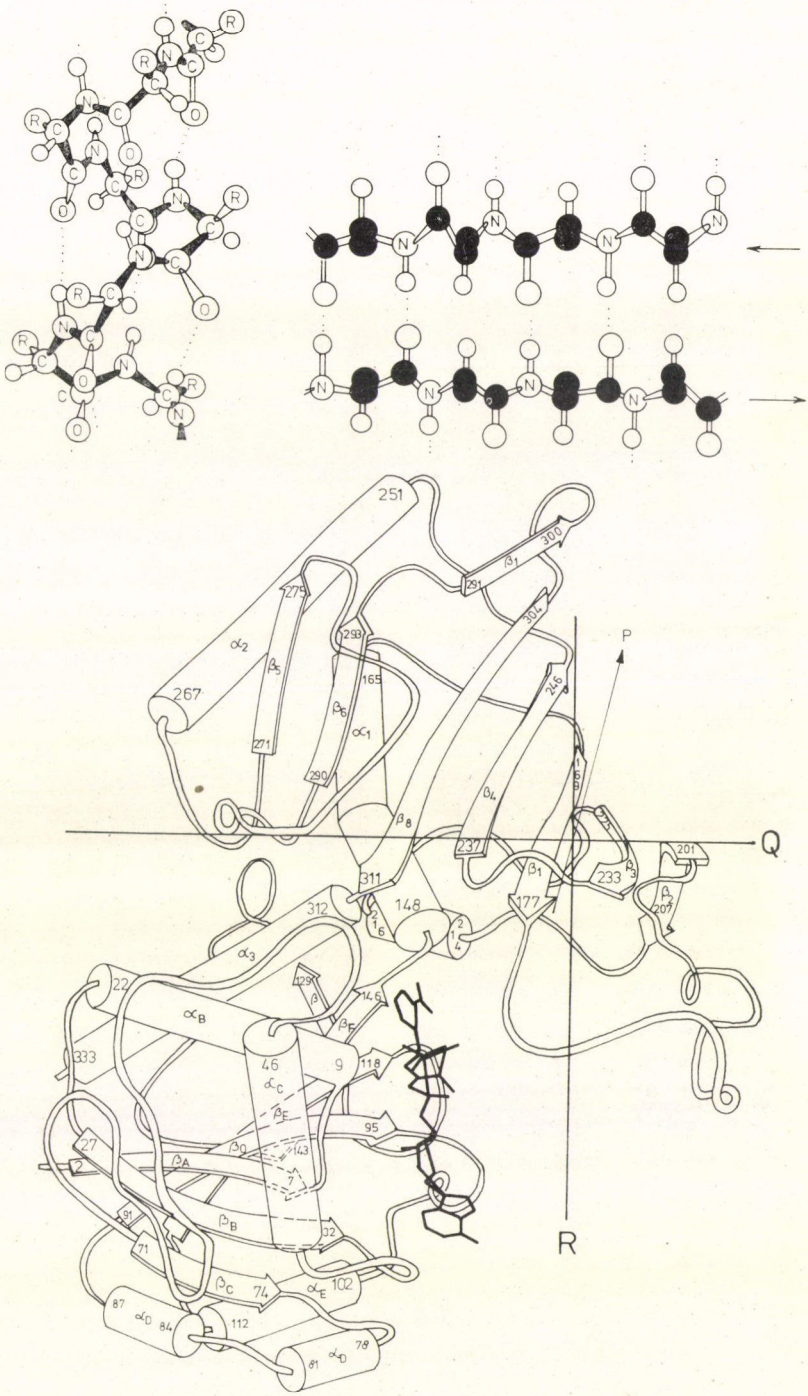
A harmadlagos szerkezet kialakulására jellemzőek a következők:

— a polipeptidlánc feltekeredése i n v i v o körülmények *között, spontán szükségszerűen bekövetkező, gyors folyamat,*

— a kialakult fehérjemolekula lényegében véve *tömör* szerkezet, melyen belül kismolekulasúlyú anyagot, vízmolekulát alig lehet találni,

— a fehérjén belül azonban a polipeptidlánc *motilis*, állandó gyors mozgás, *fluktuáció* állapotában van.

E jellegzetes és néha látszólag ellentmondásos tulajdonságok alapja egy és ugyanaz: a fehérjeszerkezetet összetartó gyenge kölcsönhatások *kooperatív jellege.* Önmagában bármelyik gyenge kölcsönhatás (hidrogénhíd, elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatás) erőssége összemérhető az egy szabadságfokra eső kT energiával, másszóval könnyen felhasad és újraképződik. Mivel azonban térközelben több gyenge kölcsönhatás rögzíti a polipeptidlánc egy-egy darabját, így annak *konformációja* csak akkor változik, ha egyszerre több gyenge kölcsönhatás szűnik meg. Ilyenkor olyan új konformáció jön létre, melyet az eredetitől eltérő gyenge kölcsönhatások jellemeznek. Egy-egy konformációs állapotnak a valószínűsége a kooperatív kölcsönhatások erősségével arányos. A fluktuáció tehát kisebb-nagyobb állandó konformációváltozás, a legvalószínűbb szerkezet mint egyensúlyi állapot körül.



1. ábra. Fehérje szerkezete

Fent másodlagos szerkezetek — α-helix (balra) és β-lemez (jobbra). Lent a glicerinaldehidfoszfát-dehidrogenáz térszerkezetének modellje (egyetlen alegység). A sötétrajzú részlet a kötött NAD koenzim. A hengerek α-helix, a lapos nyilak β-hajtogatott lemez szerkezeti részletek

A fehérje makromolekula kialakulásának legfontosabb következménye, hogy a polipeptidlánc feltekeredésével a felületen szoros térközelben olyan *aminosavoldallánc mintázatok* alakulnak ki, melyek fehérjéről-fehérjére mások, *specifikusak*.

A fehérjefelület specifikus oldalláncmintázata négy jelentős következménnyel jár:

(1) egyes részletekben valamelyik aminosavoldallánc egy gyöke környezetének hatására különleges reaktivitásra tesz szert, — így válhat egy szerin OH-ja, egy cisztein SH-ja, egy hisztidin gyűrű N-je, egy aminosav savanyú vagy bázikus oldallánca egy enzim *aktív csoport*jává, a katalitikus hatás alapjává,

(2) más részletekben az aminosavoldalláncok olyan mintázata alakul ki, amely *specifikusan képes megkötni* egy kismolekulasúlyú anyagot, anyagcsere intermediert — így alakul ki az enzim szubsztrát-kötő helye, egy enzim regulátor-kötő helye, egy receptor effektor-kötő helye,

(3) ismét más felületi részleteken az aminosavoldalláncok olyan specifikus mintázata alakul ki, amely lehetővé teszi, hogy a fehérje egy másik fehérjemolekulával szoros kapcsolatba lépjen.

(4) a fehérjefelületek specifikus oldalláncmintázata következtében a fehérjemolekulák más makromolekulákkal — így különböző nukleinsavak specifikus részleteivel, vagy lipidmembránokkal — kapcsolódnak, s így jönnek létre a sejten belüli szerkezetek.

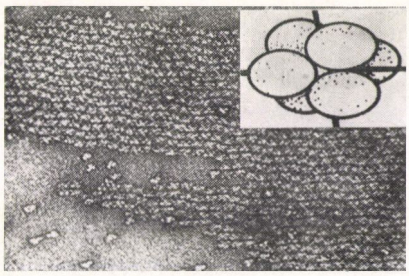
Mindezekben a kölcsönhatásokban, melyek komplexek képződéséhez vezetnek, többszörös gyenge, kooperatív kölcsönhatások szerepelnek, de összességük néha meglepően szoros kapcsolatot eredményez. E gyenge kölcsönhatások között ismét hidrogénkötések, elektrosztatikus, hidrofób erők vegyesen résztvesznek. Természetesen a kölcsönhatás következtében mind a fehérje, mind pedig a vele kapcsolódó anyag konformációja megváltozik.

Ennek a *konformációváltozás*nak a mechanizmusát kétféleképpen lehet magyarázni. A legegyszerűbb modellben fel lehet tételezni, hogy pl. az enzim vagy a receptor, amikor megköti a szubsztrátot vagy a regulátor anyagot, egy meghatározott konformációból átugrik egy másik konformáció állapotába. Számomra sokkal megfelelőbbnek látszik a fehérjeszerkezet dinamikus felfogása, amely abból indul ki, hogy a fehérjeszerkezet állandó fluktuációs állapotban van. Eszerint az enzim (receptor) állandó fluktuáció közben különböző statisztikus valószínűséggel felvesz számos, különböző konformációt (5, 10). A specifikus szubsztrát vagy regulátor távollétében *ezek közül* az egyik fajta, míg annak megkötése esetén egy másik fajta konformáció valószínűsége lesz a legnagyobb. Ez a fluktuációs modell sokkal plauzibilisebbnek tűnik, mint az a feltételezés, hogy a regulátor anyag közeledése instruktív módon („indukált kötődés") hozza létre a regulátort kötni képes, újfajta konformációs állapotot.

Fehérjekomplexek

A magasabbrendű komplexek kialakításában nagy biológiai jelentősége van a (3) alatt említett kölcsönhatásnak, a fehérje-fehérje kölcsönhatásnak. Ennek számos példája közül néhány tipikusat említenék.

A legtöbb fehérje fiziológiás körülmények között nem egy, hanem több — egyforma vagy különböző — fehérje *alegységből* szervezett állapotban van jelen (2. ábra). Közismert a hemoglobin szerkezete, melyben négy alegység — ebből kettő-kettő azonos — kapcsolódik meghatározott felületi részletekkel egymáshoz. A lényeg az, hogy ez az alegység-kölcsönhatás a biológiai funkcióban újat eredményez: a négy alegység kölcsönhatása következtében az egyik-



2. ábra. Glutamátdehidrogenáz kristályos enzim elektronmikroszkópos képe, betét: a molekula alegység-szerkezete

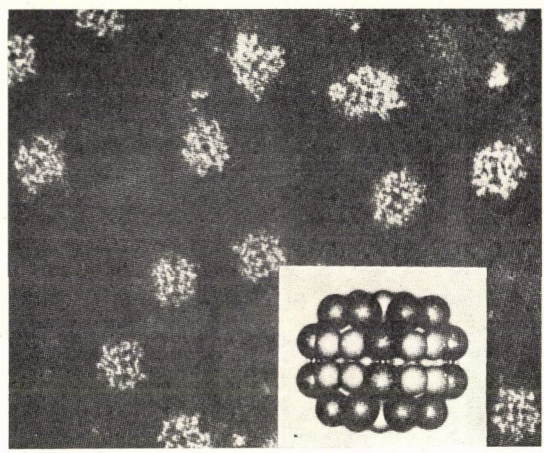
ben bekövetkező oxigén-hem kölcsönhatás nemcsak ebben okoz konformációváltozást, hanem a vele kapcsolódó többi alegységben is. Így az első oxigén megkötése következtében a többi alegység oxigén iránti affinitása megnő. Ismeretes, hogy éppen ez eredményezi az oxigénellátás megkönnyítését, hiszen így a hemoglobin oxigénkötése és elengedése igen szűk oxigén-koncentráció határok között bekövetkezik.

Az intracelluláris enzimek nagy része több alegységből áll, leggyakrabbak a tetramér enzimek, de igen gyakran előfordulnak dimérek, hexamérek, oktamérek stb. is.

Az alegységkölcsönhatásnak igen fontos következő példája a piruvátdehidrogenáz enzimkomplex (8). Ez 4 millió daltonos enzimkomplexként izolálható (elektronmikroszkópos képét mutatja a 3. ábra). Más kivonási módszerrel viszont külön-külön izolálható három különböző enzim, amelyek külön-külön a piruvátdehidrogenáz komplex anyagcserefolyamatának olyan részlépéseit katalizálják, mint a piroszőlősav dekarboxilezését és a keletkezett aldehid gyöknek acilgyökké történő oxidálását, az acetilgyöknek a koenzim-A útján történő megkötését, ill. a keletkezett NADH visszaoxidálását. A teljes folyamat együtt:

$$CH_3CO \cdot COOH + NAD^+ + HS - CoA = CO_2 + NADH + CH_3CO{-}S{-}CoA$$

Ha a külön-külön izolált enzimeket összekeverjük, akkor ismét a nagy 4 millió daltonos komplex áll össze, amelynek szerkezete ugyanolyan, mint a sejtből izolált nagy komplexé: legbelül van a 3—3 alegységből álló nyolc transzacetiláz enzim molekula, ezt kívülről 24 piruvát-dehidrogenáz és 24 flavoprotein veszi körül. (Utóbbi enzim az ún. diaforáz, mely a keletkezett NADH-t NAD^+-á oxidálja vissza, a modellen a sötétebb gömbök jelzik.) A 72 alegységből álló komplex funkcionális jelentősége kézenfekvő: a piruvát egymást követő reakciók révén alakul át, az első enzim terméke így mindjárt



3. ábra. Bakteriális piruvátdehidrogenáz elektronmikroszkópos képe, a betét az alegység szerkezet modellje

a másik enzimhez jut, ennek terméke a harmadikhoz. Ez a szerveződés kettős jelentőségű: egyrészt a diffúzió kiküszöbölésével meggyorsítja a konszekutív reakciófolyamatot, másrészt megakadályozza, hogy a reaktív köztitermékek idegen enzimekkel kapcsolódjanak és mellékreakciókhoz vezessenek.

A bakteriális piruvátdehidrogenáz komplex jó példája az organizált multi-enzimrendszereknek. Vannak olyan kölcsönhatások multienzimkomplexekben, melyek ennél szorosabbak, de vannak olyanok is, amelyekben az asszociáció gyengébb. Miután az asszociáció koncentráció-függő, így gondolni kell arra, hogy a sejtben, ahol a fehérjekoncentráció magas, makromolekuláris komplexek alakjában lehetnek jelen olyan fehérjék is, melyek híg oldatban külön izolálhatók és asszociációt nem mutatnak. Hogy ez valóban így lehet és van, arra Intézetünkben végzett kísérletek is utalnak (3, 7). Nevezetesen a glikolitikus folyamat néhány enzimjéről, amelyek a folyamat egymás után következő lépéseit katalizálják, kimutattuk, hogy képesek in vitro — magasabb koncentrációban — egymással asszociálni. Feltehetően in vivo viszonyok között is ilyen asszociált állapotban vannak. Ez a komplex azonban elég laza ahhoz, hogy híg oldatban már szétesik.

Ha ezt a képet egy kicsit extrapolálom, eljutunk ahhoz a felfogáshoz, hogy a sejten belül az egyes anyagcserefolyamatokban résztvevő „oldott" fehérjék nem összevisszaságban vannak, hanem specifikus organizáltság révén, szerkezetileg is kapcsolódnak egymással, eloszlásuk a sejten belül nem statisztikus. Egy érdekes következménye lehet ennek a képnek, s erre is vannak már adatok. Szerintem az anyagcsereutak enzimei nemcsak a sejtorganellumokban, hanem az ún. hialoplazmában is organizált enzimrendszerekben vannak. Egy anyagcsere intermedier termék eszerint a kép szerint keletkezik egy enzim hatására, de térközelben ott van mindjárt a másik enzim, amely ezt — így vagy úgy — továbbalakítja. Eszerint, ha például kémiai módszerrel meghatározom, hogy x gramm szövetben ennyi és ennyi az intermedier anyagcseretermék mennyisége és ezt elosztom a szövet szabad vízmennyiségére, akkor egy adathoz jutok, mely megadja, hogy mekkora az intermedier koncentrációja az adott szövetben. Csakhogy a fenti kép szerint ennek az adatnak az égvilágon semmi jelentősége nincs, mert az intermedier anyag koncentrációja a sejten belül bizonyos helyeken nagyon magas, másutt pedig zérus. Akkor, amikor az in vitro adatokból következtetni akarunk a sejten belüli helyzetre, ezt az újonnan kialakuló képet figyelembe kell vennünk és meg kell ismerkednünk a sejtenbelüli kompartmentalizáció adataival, annak mértékével (6).

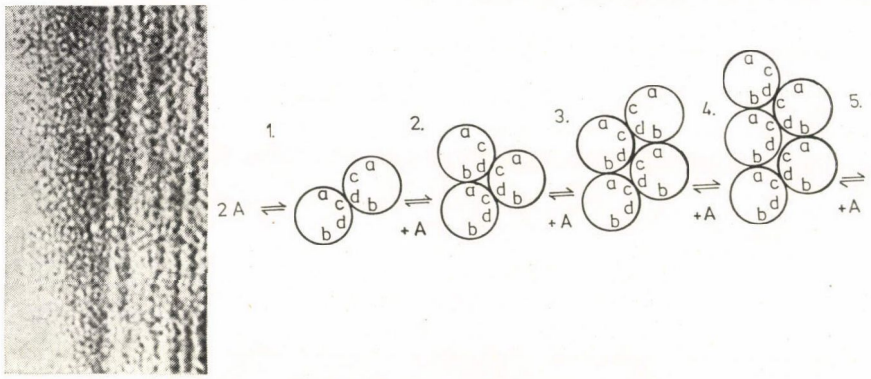
Hangsúlyozzuk, itt újra: a multienzimkomplexeknél, a több alegységből összekapcsolódó dimér, tetramér stb. fehérjéknél a kapcsolódás nagyon specifikus: egyrészt a felület aminosavoldalláncmintázata révén a szomszédos felületek között kialakuló gyenge kölcsönhatások kooperatív jellege, másfelől ezen oldalláncok térbeli komplementaritása teszi lehetővé a szoros egymásmellé illeszkedést.

Ezt mutatja nemcsak a piruvátdehidrogenáz komplex, melyben a kívül és a belül elhelyezkedő fehérjemolekulák helyét nyilvánvalóan az határozza meg, hogy milyen illeszkedő felülete van egy-egy fehérje-molekulának, ezt láthatjuk a fibrilláris fehérjék felépülésénél is. Az aktin, mely a kontraktilitás jelenségének egyik molekuláris alapja, globuláris, 41 000 dalton méretű alapegységekből fiziológiás sóoldatban egy rendkívül hosszú, kettős helikális lánccá polimerizál (4. ábra). Mint a séma mutatja, minden globuláris egységnek meghatározott pontja kapcsolódik egy másik globuláris egység, egy másik — komplementér — pontjával, így jön létre az egymásra csavarodott kettős csigavonal-szerkezetű, igen stabil polimér lánc.

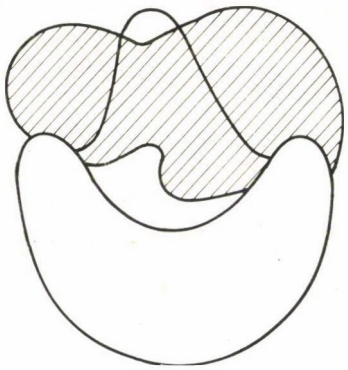
Fehérje-nukleinsav komplexek

A sejtben előforduló ribonukleinsav legnagyobb mennyisége a riboszómák ribonukleinsava. Ma már a prokariota riboszómák összetételét messzemenően ismerjük és az eukarióta riboszómáról is sok adat gyűlt össze (1).

Az *E. coli* riboszómája $2{,}5 \cdot 10^6$ dalton és két alegységből áll, amelynek alakját az 5. ábra szemlélteti, összetételét a táblázat mutatja.



4. ábra. a) Parakristályos F-aktin elektronmikroszkópos képe, b) az aktin polimerizáció (G → F átalakulás) sémája

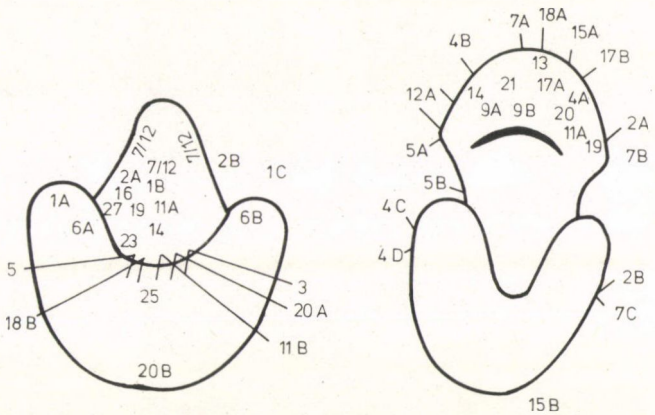


5. ábra. Az *E. coli* baktérium riboszómájának modellje. A vonalkázott rész a kisebbik alegység

E. coli riboszóma néhány tulajdonsága

	Nagyobbik alegység	Kisebbik alegység
Szedimentációs konstans	50 S	30 S
Vízmentes molekulasúly	$1{,}6 \cdot 10^6$	$0{,}9 \cdot 10^6$
RNS molekulák száma	2	1
RNS-ben nukleotid	3500 ill. 130	1700
Fehérjemolekulák száma	35	21

A riboszóma egyes komponensei külön izolálhatók, ma már a legtöbbnek az aminosav-sorrendjét, ill. a nukleotid-sorrendjét ismerjük. Az izolált komponenseknek megfelelő módon való összekeverése után funkcióképes riboszómák keletkeznek, melyekben tehát minden valószínűség szerint tökéletesen helyre áll a natív szerkezet, az RNS és a fehérjemolekulák elhelyezkedése azonos az eredetivel. Ez az önszerveződésnek szép és jól kidolgozott példája. A riboszóma funkcionáló szerkezete úgy jön létre, hogy az 56-féle fehérje és a megfelelően feltekeredett 3 különböző RNS molekula meghatározott részletei specifikusan kapcsolódnak a megfelelő fehérjékkel. A riboszómán belül szelle-



6. ábra. A riboszóma alegységek felületén felismerhető fehérjék. (Az egyes fehérjéket számok jelzik, egyes fehérjék eleje-vége természetesen máshol jeentkezlik, pl. 9A és 9B). Baloldalt: nagyobbik alegység „szemből", jobboldalt: kisebbik alegység „szemből"

mes módszerekkel számos fehérjekomponensnek a helyzetét meghatározták, ezt mutatja a 6. ábra. Ezen túlmenően, az RNS láncok nukleotid sorrendjében is ismeretes több pont, amelyekhez egyik vagy másik fehérje kapcsolódik.

A sokféle egyéb nukleinsav valóságos szerkezetéről ma még nagyon keveset tudunk. A fehérjeszintézisben résztvevő transzfer RNS-ek egyszálú RNS-e a röntgenkrisztallográfia tanúsága szerint erősen feltekeredett, bázispárosítással meghatározott szerkezettel rendelkező kompakt molekula. Más egyszálú RNS-nél, így a messenger RNS-nél is úgy látszik a lánc különböző részletei között létrejövő bázispárosítások kooperatív kölcsönhatása „hajtű" és egyéb alakzatok létrehozásával másodlagos és talán harmadlagos szerkezeteket hoz létre.

Ennél azonban sokkal fontosabbnak látszik az, hogy valószínűleg a nukleinsavak *in vivo* szerkezete fehérjékkel történő kölcsönhatások révén alakul ki. Így pl. rendkívül érdekesek az utóbbi évek eredményei az eukarióta sejtek DNS-ére vonatkozóan. Bakteriális nukleáz enzim hasítása után kimutatható, hogy az eukarióta sejtek maganyaga, a kromatin egyforma

méretű ún. nukleoszóma egységekre esik szét, melyek 140—200 bázispárt tartalmazó kettős csigavonalú DNS darabot tartalmaznak és minden nukleoszómában megtalálható a bárikus hiszton fehérjék mindegyik fajtája. A nukleoszómán belül a kettőshélix DNS egy szuperhélixbe csavarva található, mely kb. másfél csavarmenet magasságú, ezt a szerkezetet a hisztonok, s talán mellettük lévő egyéb, ma még nem ismert fehérjék tartják össze (4).

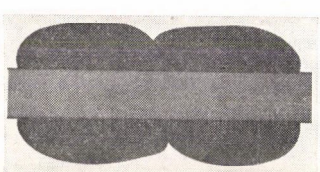
A fehérje-nukleinsav specifikus komplex kialakulásának és az ezen alapuló funkciónak elég jól ismert esete a *lac*-represszor fehérje kötődése a *lac*-operátor régióhoz. Tankönyvi adat, hogy egyes baktériumokban a tejcukor hasításához szükséges gének sorozata egy bizonyos génszakaszon van egymás mellett, ezt a szakaszt *lac*-operonnak nevezik. A *lac*-operon „elején" van egy olyan DNS szakasz, az ún. operátor, melyhez egy fehérje — a *lac*-represszor — szorosan kapcsolódik. Ilyenkor az egész *lac*-operon működésképtelen, gátolt állapotban van. Ha az anyagcserefeltételek megváltoznak (nincs szőlőcukor, de van tejcukor), akkor a *lac*-represszor leszakad az operátorról, megindul a gén működése és termelődnek a tejcukor bontásához szükséges enzimek.

Szellemes módszerekkel izolálták mind a represszor fehérjét, mind pedig azt a DNS szakaszt, amely a *lac*-operon operátor szakaszának bizonyul. A 7. ábra mutatja, hogy az operátor kettős-lánca érdekesen szimmetrikus bázis-sor-

```
5′  A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T  3′
    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
    . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
3′  T T A A C A C T C G C C T A T T G T T A A  5′
```

7. ábra. Az operátor régió bázissorrendje a kettősszálú DNS-ben. Az egyes bázisokat (adenin, citozin, guanin, timin) kezdőbetűk jelzik

rendet mutat (pl. fent balról és lent jobbról). Úgy látszik ez a specifikus DNS bázissorrend ad olyan specifikus kötőfelületet, amely a represszorfehérje felületének egy részletével kapcsolódik (9). A represszor fehérje egyforma alegységekből áll, amelyek körülveszik ezt a DNS szakaszt (8. ábra). A represszor-fehérje és a *lac*-operátor DNS-része közötti kapcsolat hihetetlenül

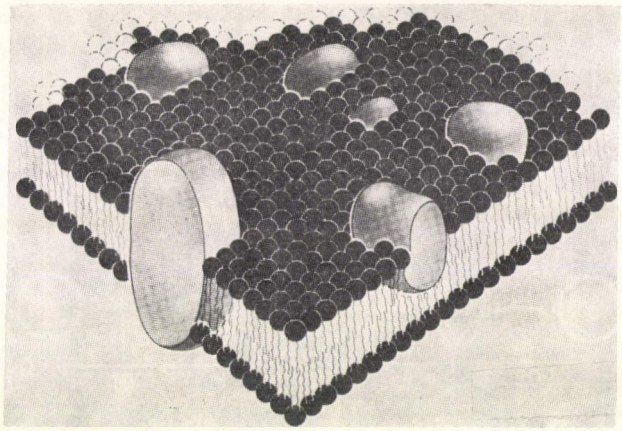


8. ábra. A represszor-operátor kapcsolat modellje (keresztmetszet). A világosabb DNS fonalat a tetramér represszorfehérje öleli körül

nagy specificitását mutatják a következő adatok. Kimutatható, hogy a represszor fehérje egyáltalában nem kötődik olyan DNS-hez, amely nem tartalmaz *lac*-operátor régiót, másrészt pl. az *E. coli* baktérium több millió bázispárból álló DNS genomjában csak a *lac*-operátor régióhoz kapcsolódik és fiziológiás körülmények között a komplex disszociációs konstansa igen kicsi, 10^{-13} M.

Makromolekulák és membránok

Hosszú időn keresztül a biológiai makromolekulák kutatása csak azokra terjedt ki, amelyek vizes oldatból izolálhatók. Az utóbbi évtizedben nagy lendületet kapott a membránszerkezet kutatása, bár a technikai problémák



9. ábra. Membrán modellje, beágyazott fehérjemolekulákkal, a kisebb fekete gömbök a lipidek poláros részét jelzik

itt még nem egészen megoldottak. Az mindenesetre már világos, hogy a sejt különböző membránjai, mint a plazmamembrán, a mitokondriumok belső és külső membránja, a magmembrán, az ergasztoplazma, a lizoszóma vagy a tejzsírcsepp membránja összetételében egymástól specifikusan különbözik, még azonos sejten belül is. Nemcsak mások a fehérjék és nemcsak különbözők és arányukban változatosak a lipidkomponensek (9. ábra). A különbségek még a membrán kettős lipidrétegen belüli lipidösszetételre is vonatkoznak: a sejt felőli lipidréteg más összetételű, mint a kifelé fordult réteg lipidje. A fehérjék — melyek vagy a membrán belső felületébe vannak ágyazva és a külvilág felé fordulnak, vagy a membrán teljes lipidrétegen átvonulva, a belső és külső környezet között fehérjekapcsolatot létesítenek — mind olyan specifikus fehérjék, amelyek a membrán lipidkörnyezetében veszik fel végleges szerkezetüket, felületükön a vízoldékony fehérjékhez képest több hidrofób aminosavoldalláncot tartalmaznak, kölcsönhatásaik a lipidekkel specifikusak.

* * *

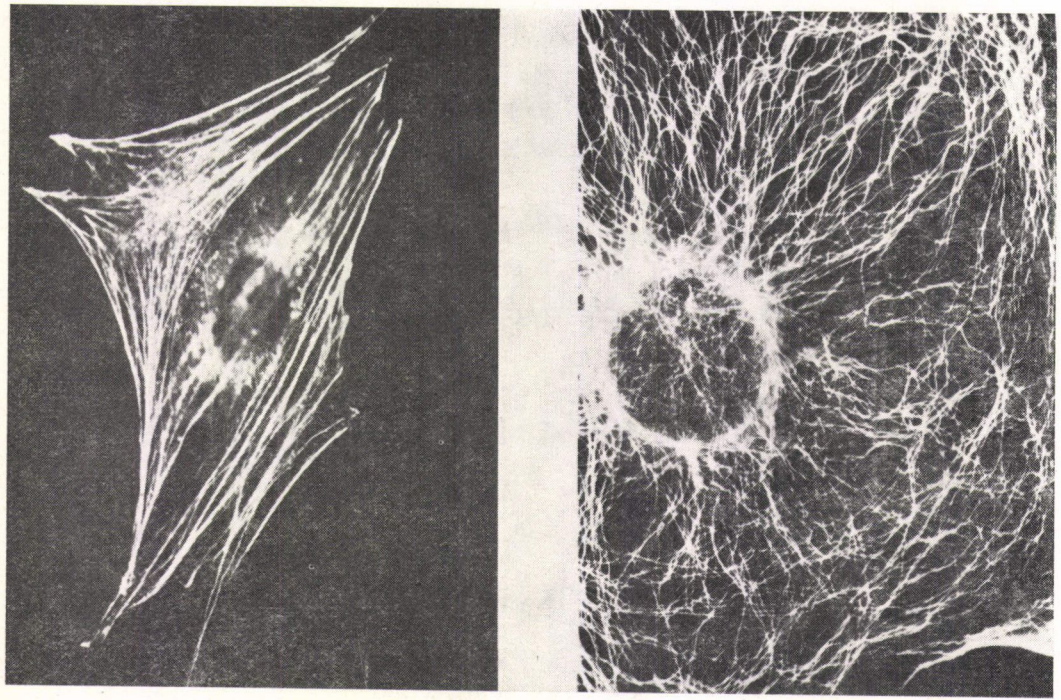
Az élő sejt alkatrészeinek és elsősorban makromolekuláinak kémiájáról és fizikájáról, a biológiai folyamatokban játszott szerepükről, a kölcsönhatások természetéről az utóbbi időben olyan hatalmas mértékben nőttek ismereteink, hogy bennem az a gyanú merül fel, e területen tudásunknak még csak az elején vagyunk. A molekuláris biológia technikájával egyre újabb, bonyolult szerkezeteket találunk. Így szeretnék befejezésül bemutatni két szép képet, mindkettő fibroblaszt sejtről készült kissé eltérő nagyítással. Az egyik sejtben immunofluoreszcenciás technikával az aktin helyzete mutatható ki, a másikon ugyancsak immunofluoreszcencia technikával a tubulintartalmú szálak láthatók a mag körüli protoplazmában (10. ábra). Nyilvánvaló, hogy az aktin filamentumok a plazmamembránhoz, a tubulin filamentumok a magmembránhoz kötődnek. Vajon milyen magasabbrendű organizációt jelent a membrán-filamentum kapcsolódás? Vajon milyen biológiai funkció alapját képezi? Továbbmenve, a 11. ábrán azt mutatnám, hogy ami egyszerűnek látszik, az milyen bonyolult tud lenni. Egy időben örültünk, hogy a polimerizált aktinnal (F-aktin (9)) azonosítani lehetett a harántcsikolt izom vékony filamentumát. Ma már tudjuk, hogy ez a vékony filamentum bonyolult szerkezet. EBASHI jól ismert modellje szerint a tropomiozin 2 szála fonja körül az aktint, ehhez kapcsolódik a troponin, amely önmaga is három különböző funkciójú fehérje komplexe. Ahol ez a vékony filamentum az izomban a Z membránnal találkozik, ott újabb, bonyolult szerkezetnek kell lennie.

Összefoglalva: mondanivalóm röviden az: a biológiai makromolekulákban a lineárisan kondenzált láncmolekulákból önszerveződéssel, alkotórészeik nem-kovalens kölcsönhatásai révén, másodlagos, harmadlagos, negyedleges szerkezetek alakulnak ki, így olyan felületi részletek jönnek létre, amelyek más makromolekulákkal, vagy kis molekulasúlyú anyagokkal képesek kölcsönhatásba lépni. A magasabb szerveződési formákat ma még nem tudjuk rendszerezni, de figyelmünk egyre inkább arra irányul, hogy az *in vivo* kölcsönhatásokat kell megértenünk. A biológiai funkciót elsősorban nem az individuális makromolekulák, hanem a specifikusan szervezett makromolekuláris komplexek teszik lehetővé.

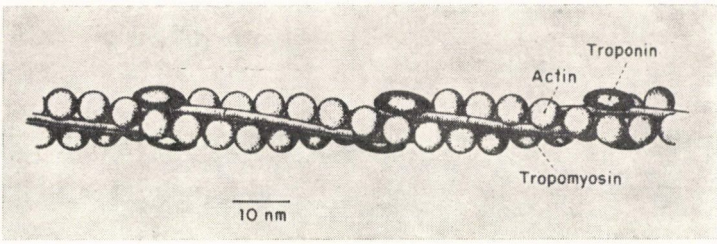
Befejezésül egy idézet kívánkozik ide, mely az enzimológia egyik klasszikusától származik: „... denn nur durch die Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen chemischen Stoffen kommen jene Erscheinungen zustande, deren Gesamtheit man als Lebensvorgänge bezeichnet."*

Ezt a gondolatot BUCHNER (2) pontosan 75 éve fejtette ki, amikor persze a biológiai makromolekulákról még semmi nem volt ismert. De attól ma is igaz és igazabb, mint valaha.

* „... mert csak a különböző kémiai anyagok kölcsönhatásai révén jönnek létre azok a jelenségek, melyek összességét életfolyamatoknak nevezzük."



10. ábra. Fibroblaszt sejtben az aktin (baloldalt), ill. a tubulin (jobboldalt) elhelyezkedése



11. ábra. Az aktin komplex

IRODALOM

1. Brimacombe, R., Stöffler, G. és Wittman, H. G.: Ann. Rev. Biochem. **47,** 217—249 (1978).
2. Buchner, E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **44,** 237 (1905).
3. Cseke, E., Váradi, A., Szabolcsi, G. és Biszku, E.: FEBS Letters **96,** 15—18 (1978).
4. Finch, J. T. és Klug, A.: Cold Spring Harbor Spmp. Quant. Biol. **42,** 1—10 (1978).
5. Lindenstrøm-Lang, K. U. és Schellman, J. A.: The Enzymes **1,** 443 (1959).
6. Ottaway, J. H. és Mowbray, J.: Current Topics in Cellular Regulation **12,** 107—208 Acad Press (1977).
7. Patthy, L. és Vas, M.: Nature **276,** 94—95 (1978).
8. Reed, L. J.: Current Topics in Cellular Regulation **1,** 233—251 Acad. Press (1969).
9. Steitz, T. A., Richmond, T. J., Wise, D. és Engelman, D.: Proc. Nat. Acad. Sci. **71,** 596 (1974).
10. Straub, F. B. és Szabolcsi, G.: Molekularnaja Biologija, Problemü i Perszpektivü 182—187 c. Izd. Nauka Moszkva (1964).
11. Straub, F. B.: Studies Inst. Med. Chem. Szeged **3,** 23 1943).

AZ IMMUNGLOBULIN — KÜLÖNBÖZŐ TEVÉKENYSÉGEK ÖSSZEHANGOLÁSA EGY MAKROMOLEKULÁBAN

ZÁVODSZKY PÉTER

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Enzimológiai Intézete, Budapest

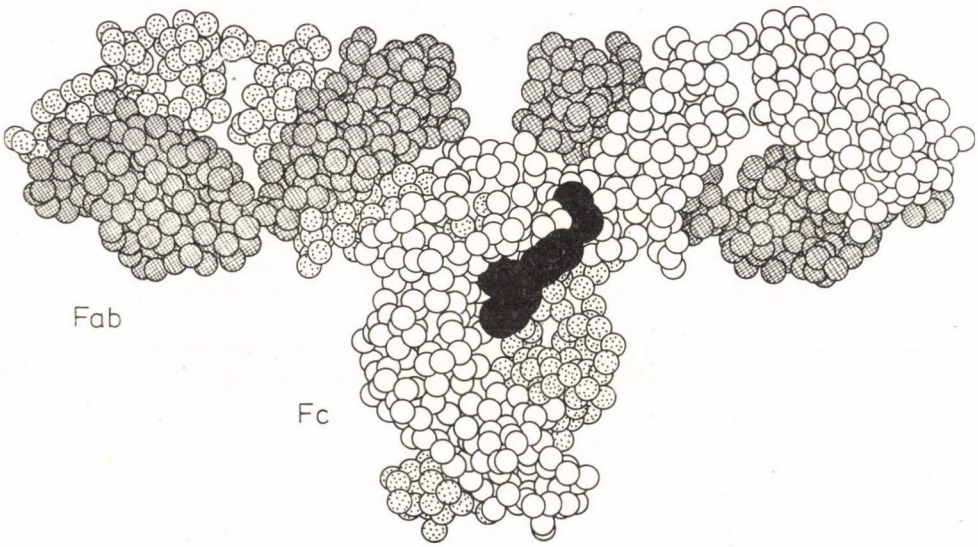
Straub professzor úr bevezető előadásában a biológiai makromolekulák specifikus kölcsönhatásainak jelentőségét hangsúlyozta. Azt hiszem e makromolekuláris kölcsönhatások egyik leglátványosabb példája a molekuláris immunválasz, melynek középpontjában az immunglobulin molekulák állnak. Mielőtt az immunreakciók molekulaszerkezeti alapjait illető vizsgálataink részleteire térnék, szeretném röviden összefoglalni az immunglobulinok szerkezetére és az immunválaszban betöltött szerepükre vonatkozó ismereteinket. Előre bocsájtom, hogy ez a kép vázlatos és csak a továbbiak szempontjából rontos fogalmak és ismeretek felelevenítését szolgálja.

Az immunrendszer egyrészt biztosítja a magasabbrendű szervezetek védekezését fertőzések ellen, másrészt különbséget téve a saját és nemsaját struktúrák között védi a szervezet integritását. Az immunreakciók különböző sejt- és molekulaszintű kölcsönhatások szövevényére épülnek. Az utóbbi években jutott el az immunológia tudománya arra a fokra, hogy az immunfolyamatban résztvevő különböző fehérjék szerkezetét és kölcsönhatásait fizikai és kémiai módszerekkel vizsgálva, közelebb jusson az immunreakciók molekuláris mechanizmusának és szerkezeti alapjainak megértéséhez.

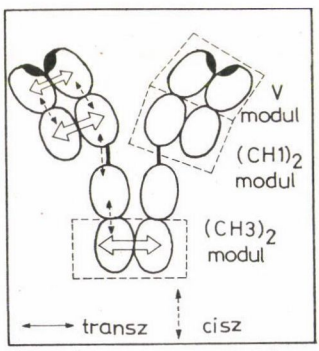
A kutatásaink tárgyát képező immunglobulinok a szervezetbe kerülő idegen anyagok — antigének — hatására képződő szérum fehérjék, amelyek felismerik a képződésüket kiváltó antigéneket és azokkal specifikus kölcsönhatásba lépnek. Ennek hatására beindulnak az ún. effektor funkciók, amelyek az idegen anyag megsemmisítéséhez vezetnek (10, 23, 24).

Az 1. ábra az immunglobulin molekula szerkezetének sémáját mutatja. A molekula szimmetrikus, két ún. nehéz és két könnyű láncból épül fel. Az 1. ábrán látható antitest az immunglobulinok G osztályát reprezentálja, röviden IgG-nek nevezzük. A láncokat diszulfid hidak kapcsolják egymáshoz, az egyes láncszakaszok egymástól jól elhatárolt globuláris doméneket alkotnak, amelyeket egy-egy diszulfid híd is stabilizál. Az egyes doméneket a kovalens kölcsönhatásokon kívül, nemkovalens, másodlagos erők is egymáshoz kötik. Ezek a kölcsönhatások a különböző domének között különböző erősségűek. Irányuknak megfelelően (2. ábra) cisz és transz kölcsönhatásokat különböztetünk meg (3).

Nagyszámú különböző élőlényből izolált és különböző osztályokhoz tartozó immunglobulin aminosav sorrendje ismertes (1, 9, 12, 15) és növekszik a röntgen diffrakciós vizsgálatokból származó térszerkezeti adatok száma is



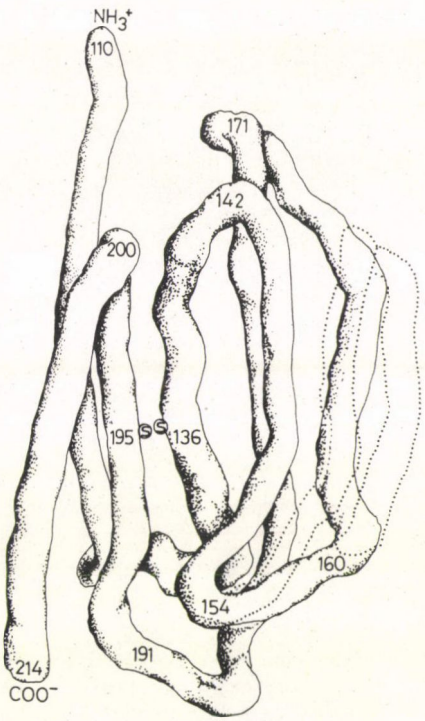
1. ábra. Az emberi IgGl krioglobulin háromdimenziós szerkezete. Az egyik nehéz lánc fehér, a másik pöttyözött, a könnyűláncok szürkék. A szénhidrát láncot fekete szín jelöli (SILVERTON és mt. után [26])



2. ábra. A domének közötti kölcsönhatások az IgG molekulában (GERGELY után [10])

(8, 13, 21, 26). Ezen ismeretek alapján kirajzolódott az immunglobulin molekulák felépítésének fő elve. A könnyű láncot két globuláris domén alkotja, az egyik az ún. konstans, a másik a variábilis. A nehéz lánc négy domént alkot: az N terminális részen a variábilis, és ezt követően a három konstans domént. A domének térszerkezete igen hasonló egymáshoz és ez a hasonlóság a külön-

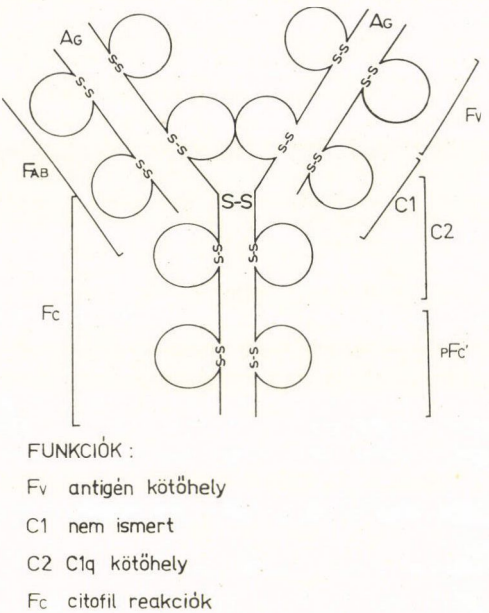
böző eredetű immunglobulinok között is megtalálható (8, 11). A domének vázát az immunglobulin „fold" (3. ábra), egy diszulfidhíddal rögzített kettős béta lemez alkotja, amelynek egyik oldalán három, a másikon négy párhuzamos láncszakasz található. A négyszálas oldal konkáv és gazdag hidrofób oldalláncokban. A variábilis domének a háromszálas oldalaikkal fordulnak egymás felé. Ez a kontaktus gyenge, de a domének összetartásához elegendő köl-



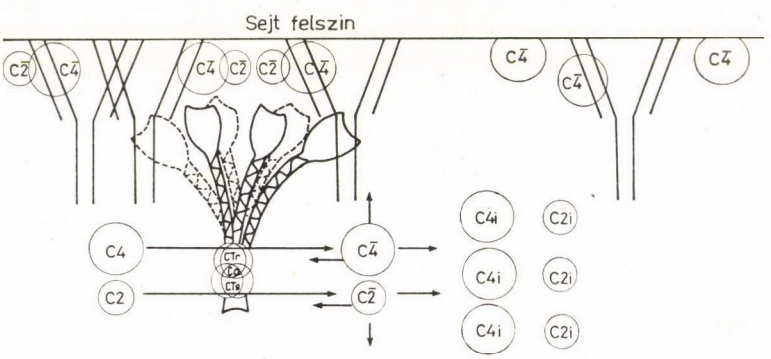
3. ábra. Az ún. immunglobulin „fold". A folytonos vonal jelöli a polipeptid lánc menetét a konstans doménekben. A szaggatott vonal a variábilis doménekre jellemző kiegészítő íveket mutatja (POLJAK és mt. után [22])

csönhatást biztosít. A könnyű és nehéz lánc konstans doménjei négyszálas oldalukkal fordulnak egymás felé, s erős hidrofób jellegű kölcsönhatások tartják össze őket. A két CH2 domén háromszálas lemezével fordul egymás felé, ez és a két domén között elhelyezkedő cukor lánc megakadályozza összekapcsolódásukat. A CH3 domének között szoros nemkovalens kölcsönhatás van a négyszálas lemezek felszínének részvételével. A molekulát tehát a kapocs régió diszulfid hídján kívül a CH3 domének közötti nemkovalens kölcsönhatások tartják össze. E kölcsönhatásokhoz járul még a $C_H—C_L$ és a $V_H—V_L$ transz és a domének közötti cisz kölcsönhatás (11, 13, 7) (2. ábra). A különböző szerkezeti domének különböző funkciók hordozói (4. ábra).

A variábilis domének közösen képezik a két antigén felismerő helyet. Az Fc részen találjuk a másodlagos funkciókat hordozó kötőhelyeket. A CH2 domén a komplement rendszer első komponensét a Clq-t köti, a CH2 és CH3



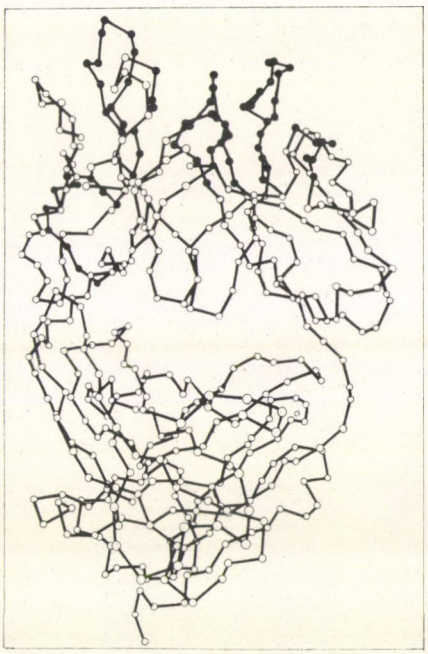
4. ábra. Az IgG molekula különböző doménjeihez tartozó biológiai funkciók összefoglalása



5. ábra. A komplement aktiválás sémája (PORTER után [23])

doménekhez rendelhetjük a citofil funkciókat (24). A komplement rendszer említésénél megszakítanám ezt a gondolatmenetet, hogy néhány szót ejtsek — a jobb megértés kedvéért — a komplement rendszer aktiválásáról és szerepé-

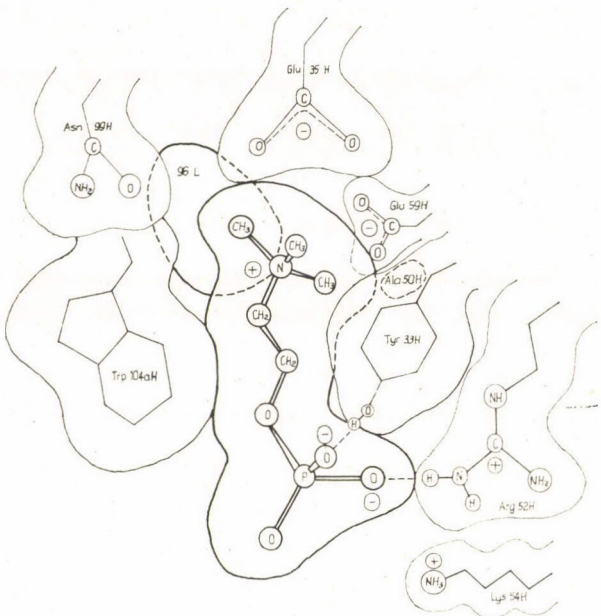
ről. Az immunglobulinok specifikus makromolekulák, szintézisüket az antigén megjelenése indítja meg, a komplementrendszer fehérjéi mindig jelen vannak a vérben, de inaktív formában. Ezek kevésbé specifikus fehérjék, minden antigén esetében egyformán fejtik ki működésüket, mely sok lépés után az antigén megsemmisítéséhez vezet (23). Aktiválásukhoz viszont az antigén-antitest kölcsönhatásra van szükség (5. ábra).



6. ábra. Az McPC 603 immunglobulin Fab részének polipeptid lánca. A V domén felső részén látható fekete körök a hipervariábilis aminosavakat mutatják (DAVIES és mt. után [4])

Az immunglobulinok működésének megértésével kapcsolatban két alapvető kérdés merült fel: az antigén felismerés és a diverzitás szerkezeti alapjainak kérdése, valamint a másodlagos effektor funkciók beindításának mechanizmusára vonatkozó kérdés. Az immunglobulin molekula funkciója az, hogy a vérben egymástól függetlenül keringő molekuláris és sejtes elemeket megfelelő rendszerbe kapcsolja antigén megsemmisítő funkciójuk összehangolt elvégzéséhez, és az elemi folyamatokat megfelelő térbeli és időbeli rendbe szervezve biztosítsa a specifikus és hatékony felismerő és elimináló tevékenységet. Az antigén felismerés kérdésének szerkezeti alapja eddigi ismereteink szerint világosnak tűnik és a szerkezeti komplementaritás elvére épül (11). Az antigén kötő helyet tartalmazó variábilis domének béta lemezeit (6. ábra) az ún. hipervariábilis ívek kapcsolják össze és ezek alkotják

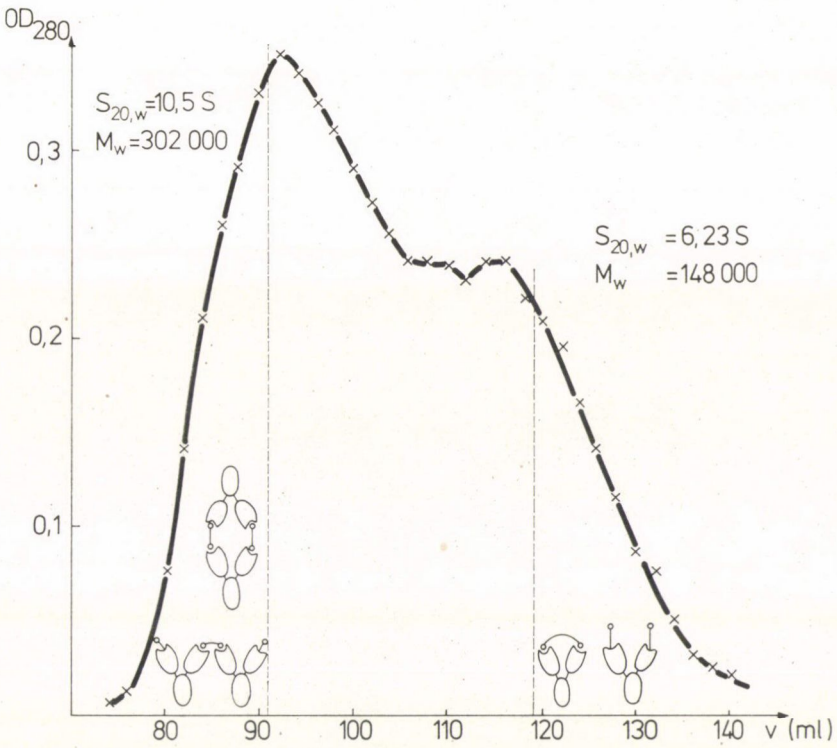
az antigén felismerő kötőhelyet. Röntgen diffrakciós vizsgálatok (20, 25) és nagyfelbontású NMR kísérletek (5) eredményei alapján tudjuk, hogy a kötőhely alakja, töltéseloszlása, a potenciális hidrogén hidak száma és elhelyezkedése biztosítja az antigének jellegzetes csoportjainak nagy affinitású, nemkovalens megkötését (7. ábra).



7. ábra. Az McPC 603 immunglobulin antigén kötő helyének és a foszforil-kolin hapténnek specifikus kölcsönhatásai, sematikus ábrázolásban (PADLAN és mt. után [20])

Nincs ilyen világos elképzelésünk a molekula Fc részéhez (4. ábra) rendelhető másodlagos, ún. effektor funkciók kérdésében, nem ismerjük a kötőhelyek elhelyezkedését, térszerkezetét, a kötést biztosító kölcsönhatások természetéről is keveset tudunk. Vitatott kérdés, miként közvetíti az antitest molekula az információt az antigén felismerő helyről a távoli, másodlagos komplement kötőhelyre. Nem ismeretes a komplement kötőhely szerkezete és az immunglobulin-komplement kölcsönhatás molekuláris mechanizmusa sem. Az MTA Enzimológiai Intézetében, együttműködve az ELTE Immunológiai csoportjával és az Oxfordi Egyetem Biokémiai Intézetével, érzékeny fizikai módszereket kombinálva kerestünk választ ezekre a kérdésekre.

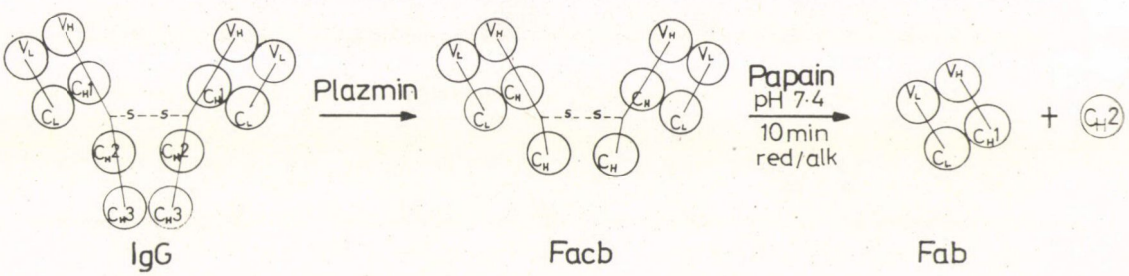
Fontosnak tartom, hogy néhány szót ejtsek vizsgálataink objektumairól, mivel általános a molekuláris immunológiai kutatások területén a heterogén antitestek és a kismolekulasúlyú haptének használata. Vizsgálatainkat homogén indukált anti-poliszaharid immunglobulinnal és monovalens, ill.



8. ábra. Az anti SIII poliszaharid IgG bivalens antigénekkel képzett ciklikus monomerjeinek elválasztása az oligomer frakcióktól

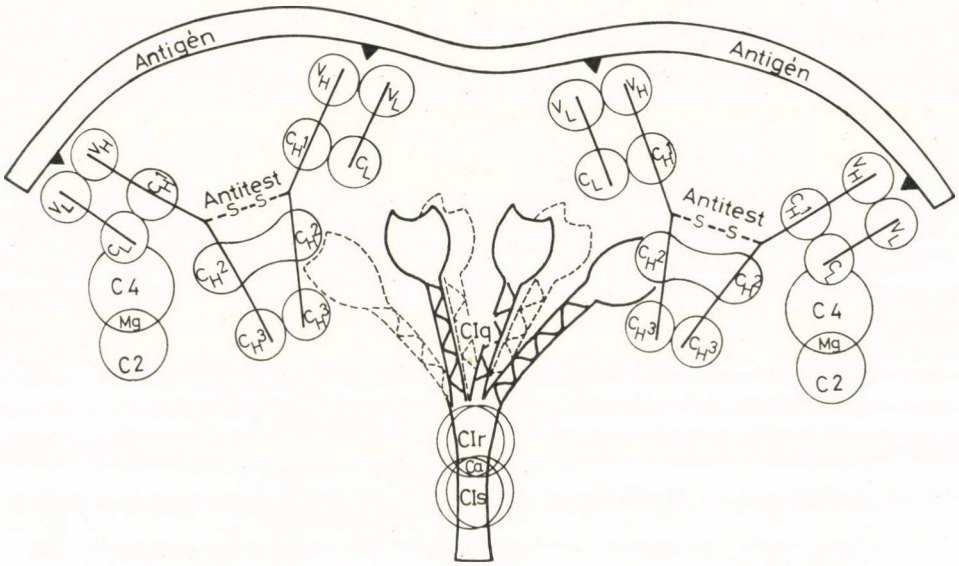
bivalens, térkitöltő poliszaharid antigénekkel végeztük (16). A bivalens antigénekkel végzett kísérleteinkben a ciklikus monomer frakciót elválasztottuk (8. ábra), ügyelve az oligomerizáció méréseket zavaró hatásának elhárítására (35).

Az immunglobulinok a fizikus számára hálás kísérleti objektumok, mivel az azonos elvek szerint felépített domének, melyek a különböző biológiai ufnkciókat hordozzák, egymástól enzimatikus úton elválaszthatók (9. ábra)



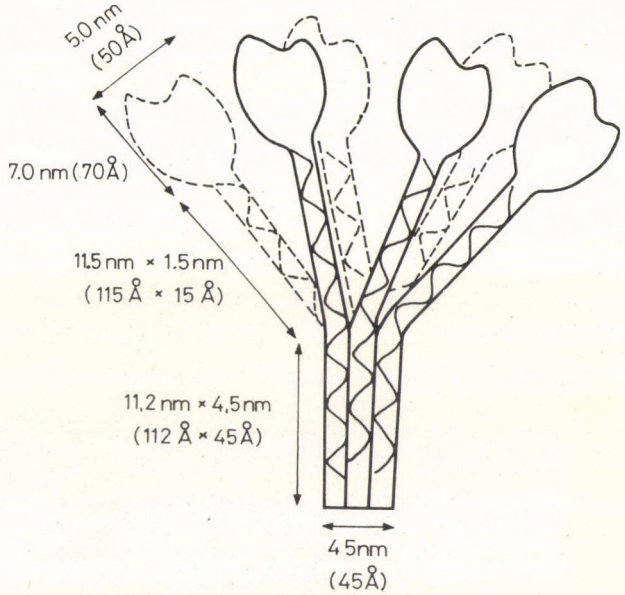
9. ábra. A CH2 domén előállítása nyúl IgG-ből proteolitikus hasítással [34]

a molekula egy, vagy néhány domént tartalmazó, funkcionálisan aktív fragmentumai izolálhatók (10, 24, 34). Az egyszerűbb szerkezet, a kisebb molekulaméret lehetővé teszi olyan fizikai-kémiai módszerek alkalmazását, amelyek a nagyobb és bonyolult IgG molekula, ill. az immunkomplexek esetén kudarcot vallanak.

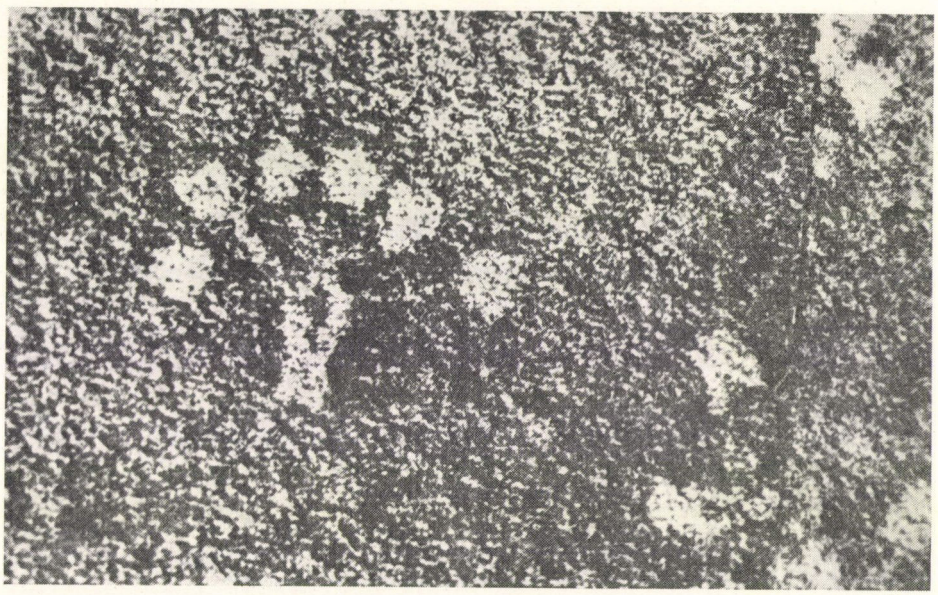


10. ábra. A komplement aktiválás első lépéseinek sematikus ábrázolása (PORTER szerint [23])

Mint már említettem az immunglobulin molekula szerepe az, hogy az antigén felismerés és az antigén megsemmisítéséhez vezető másodlagos effektor funkciók térbeli és időbeli rendjét biztosítsa. E bonyolult molekuláris kölcsönhatások mechanizmusának és térszerkezeti alapjainak tisztázása céljából vizsgáltuk milyen szerkezetváltozásokat hoz létre az antigének kötődése az immunglobulin molekulák szerkezetében, s miként reagálnak a „felismerésre" az effektor funkciókat hordozó távolabbi kötőhelyek. Mielőtt e vizsgálatok részleteire kitérnék, röviden összefoglalnám a komplement aktiválás klasszikus útjának első lépéseit (10. ábra). Mi e soklépcsős, komplikált folyamat (23) első lépésére a Clq—IgG kölcsönhatás kialakulásának mechanizmusára összpontosítottuk figyelmünket. A Clq molekula egy hat szál tulipánból álló virágcsokorhoz hasonlít, amelynek méreteit és szerkezetének sémáját mutatja a 11. ábra. A 12. ábrán a Clq molekula elektronmikroszkópos képe látható (17). A virágszerű képződmények szárai kollagén jellegűek, a globuláris fejek kapcsolódnak az antigén-IgG komplexhez. A komplement rendszer első komponensének a Clq-nak és az antigén-antitest komplexnek a kölcsönhatását mutatja a 13. ábra, amelyen azt is megpróbáltam szemléltetni, hogy a komp-

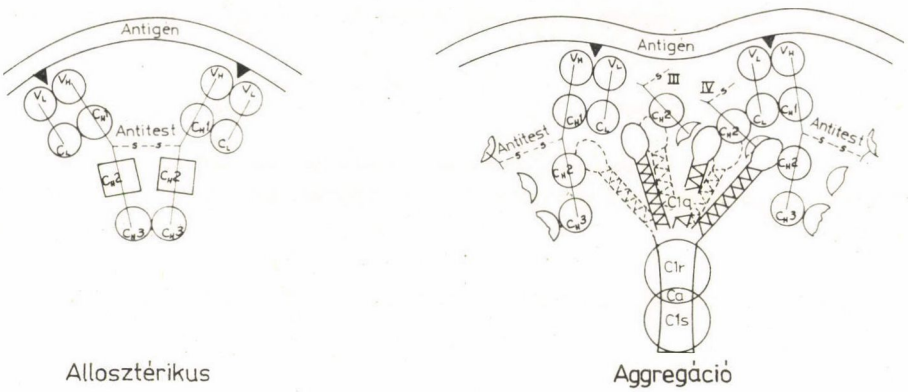


11. ábra. A Clq molekula szerkezete és méretei



12. ábra. Elektron-mikroszkópos felvétel a Clq molekuláról. (KNOL BEÉS mt. felvétele [17]

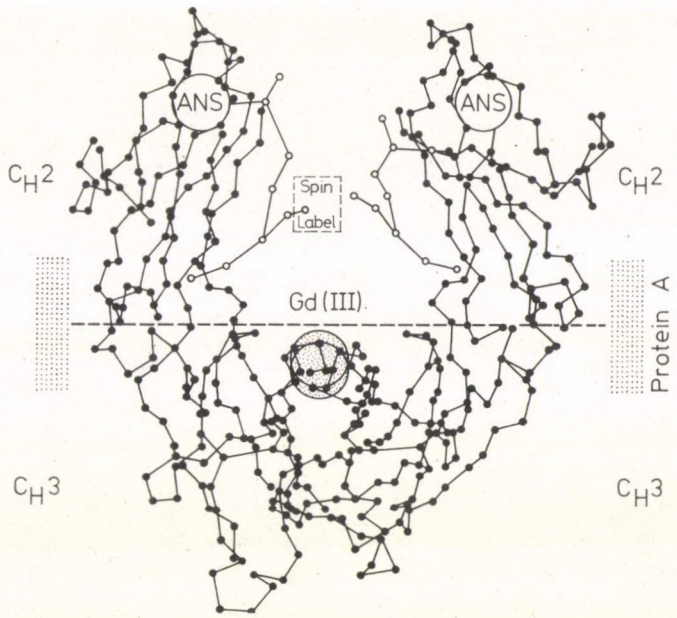
lement kötés iniciálását illetően az aggregációs és allosztérikus mechanizmust feltételező elképzelések állanak ma egymással szemben (19). Az antigén kötés által indukált konformációváltozások funkcionális jelentőségét, sőt sokan azok tényét is vitatják. Vizsgálataink során a különböző fizikai próbák alkalmazásával kerestünk választ arra a kérdésre: okoz-e kimutatható változást az Fab antigén kötőhelytől meglehetősen távoli (7,0 nm) komplement kötő Fc fragmentum szerkezetében az antigén megkötése. Olyan specifikus külső riporter csoportokat igyekeztünk elhelyezni, melyek specifikusan az Fc mole-



13. ábra. Az antigén-antitest-Clq kölcsönhatás sematikus vázlata

kularész valamely ismert helyére kötődnek és amelyeknek valamely mérhető fizikai tulajdonsága érzékeny a hordozó molekula térszerkezetének változásaira. Hosszas, de végül eredményes próbálkozás után a 14. ábrán látható, háromféle ilyen riporter csoportot sikerült elhelyezni (6, 33). A CH2 doménekhez csatlakozó poliszaharid lánc terminális sziálsav részére párosítatlan spinü nitroxid csoportot, ún. spinjelet, a CH3 domének érintkezési felületére háromértékű gadolinium iont, vagyis paramágneses próbát és a CH2 domének külső konkáv, hidrofób felszínére fluoreszcens, nemkovalensen kötődő 1-anilino naftalén-8-szulfonsav molekulát. Az ESR és NMR jelekben nem tapasztaltunk változást az antigén kötés során. Mivel ezek a jelek igen nagy pontossággal mérhetők és nagyon érzékenyek a környezet változásaira, egyértelmű a következtetés, hogy a cukor-lánc mozgékonyságában és az a CH3 domének relatív helyzetében és kapcsolatában nincs változás. Bár negatív, de fontos adatok ezek, mert ugyan nem zárják ki a konformációváltozás tényét, de arra utalnak, hogy drasztikus változásokról és jelentős szerkezeti átrendeződésről nincsen szó. Ezt a képet támasztották alá kisszögű röntgenszórásos (15. ábra) és differencia szedimentációs vizsgálataink is (35). A detektált csekély változás a hidrodinamikai paraméterekben arra utal, hogy nincs

jelentős változás a molekula térfogatában és a domének térbeli elrendezésében. Az érzékenyebb kisszögű röntgen szórásos vizsgálatok is megerősítették ezt. A fluoreszcens próba féléletidejében viszont jól mérhető változást tapasztaltunk, ami a hidrofób kötőhely szerkezetének antigén hatására történő megváltozására utal. — A térszerkezet egészének állapotát tükröző statisztikus információt szolgáltató módszerekkel, mint pl. ORD, CD és infravörös spekt-

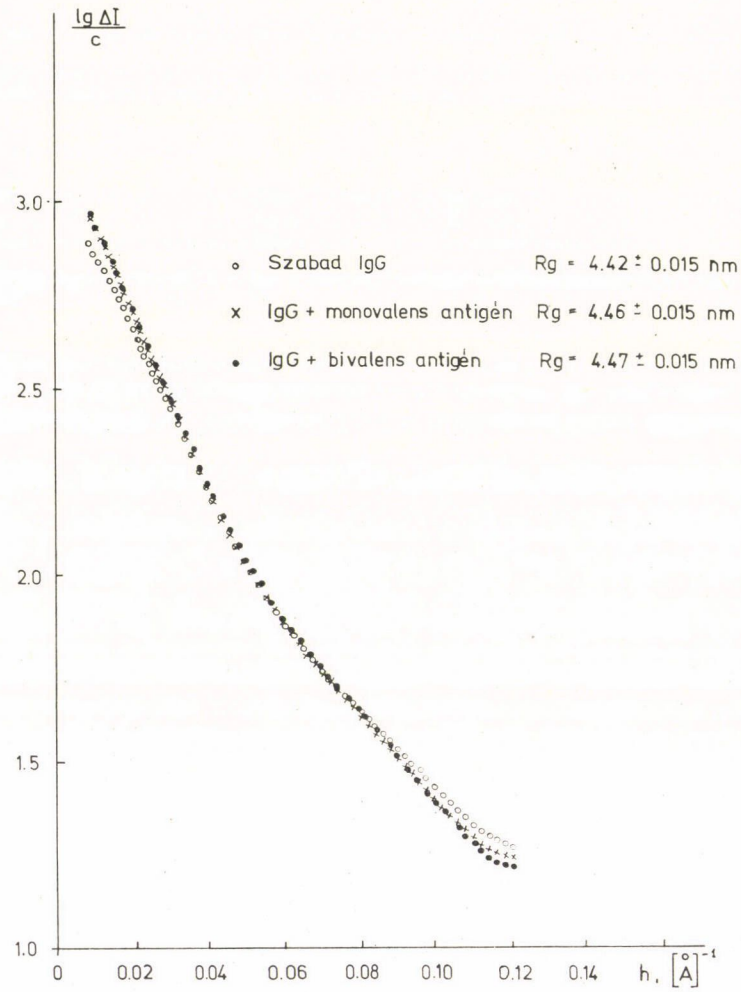


14. ábra. Riporter csoportok az Fc molekula fragmentumon. (ANS: 1-anilino-naftalén-8-szulfonsav; Protein A: *Staphylococcus aureus* protein A, monovalens fragmentum; spin label: kovalens kötésben levő nitroxil szabad gyök [6])

roszkópia, nem tudtunk ligand indukálta konformáció változásokat kimutatni. Természetesen az, ha egy bizonyos módszerrel nem vagyunk képesek valamiféle jelenséget érzékelni, az nem jelenti azt, hogy az illető jelenség nem létezik. Tudva, hogy drasztikus átrendeződés a molekulán belüli atomi pozíciókban nem következik be antigén hatására, másjellegű és érzékenyebb fizikai módszerek felé fordultunk.

Mint már a bevezető előadásban erre utalás történt, s mint erről részletesen hallani fogunk Damjanovich professzor előadásában, a fehérje molekulák a szerkezetüket stabilizáló erők természeténél fogva nem merev mozdulatlan konstrukciók, hanem — legalábbis fiziológiás hőmérsékleten — örökös nyüzsgésben lévő szerkezetek, s az általunk lerajzolt, megépített, röntgen diffrakcióval meghatározott térszerkezet csak egy egymással gyors

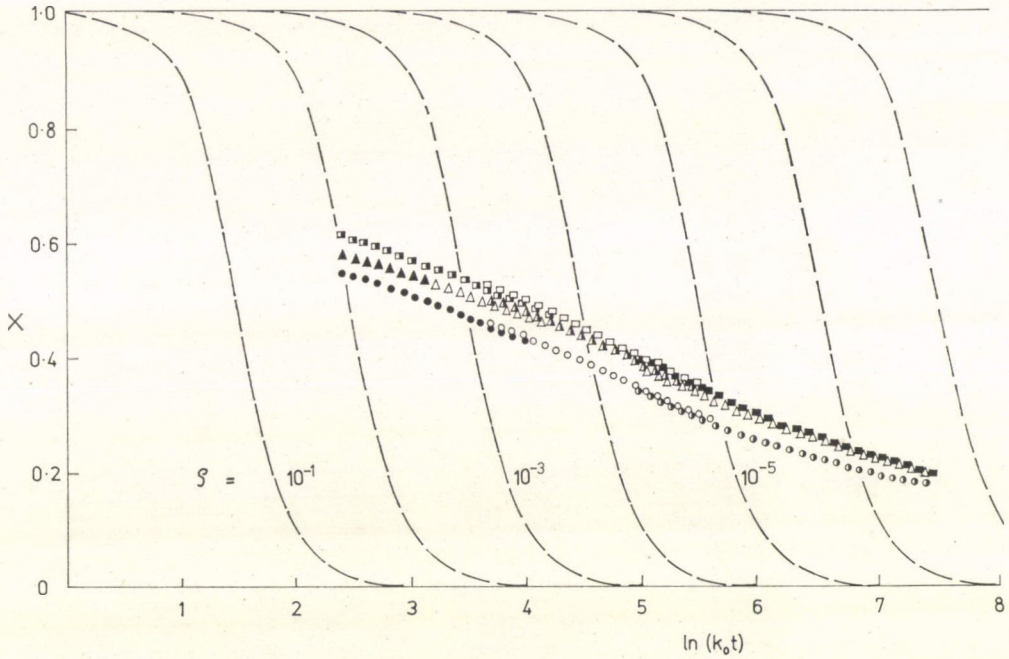
egyensúlyban lévő konformációhalmaz átlagértéke (18, 27, 29, 31). Így e molekulák szerkezetének pontosabb leírásánál a dinamikus tulajdonságokat sem szabad figyelmen kívül hagynunk. E dinamikus tulajdonságok megváltozásának funkcionális hatása lehet jelentős anélkül, hogy az átlagértékek mérhető



15. ábra. Monovalens és bivalens antigének kötődésének hatása az anti SIII poliszaharid IgG girációs sugarára. Az ábrán a szórt röntgen sugárzás intenzitásának logaritmusát ábrázoltuk a szórási szög [16] függvényében, kollimációs korrekció után

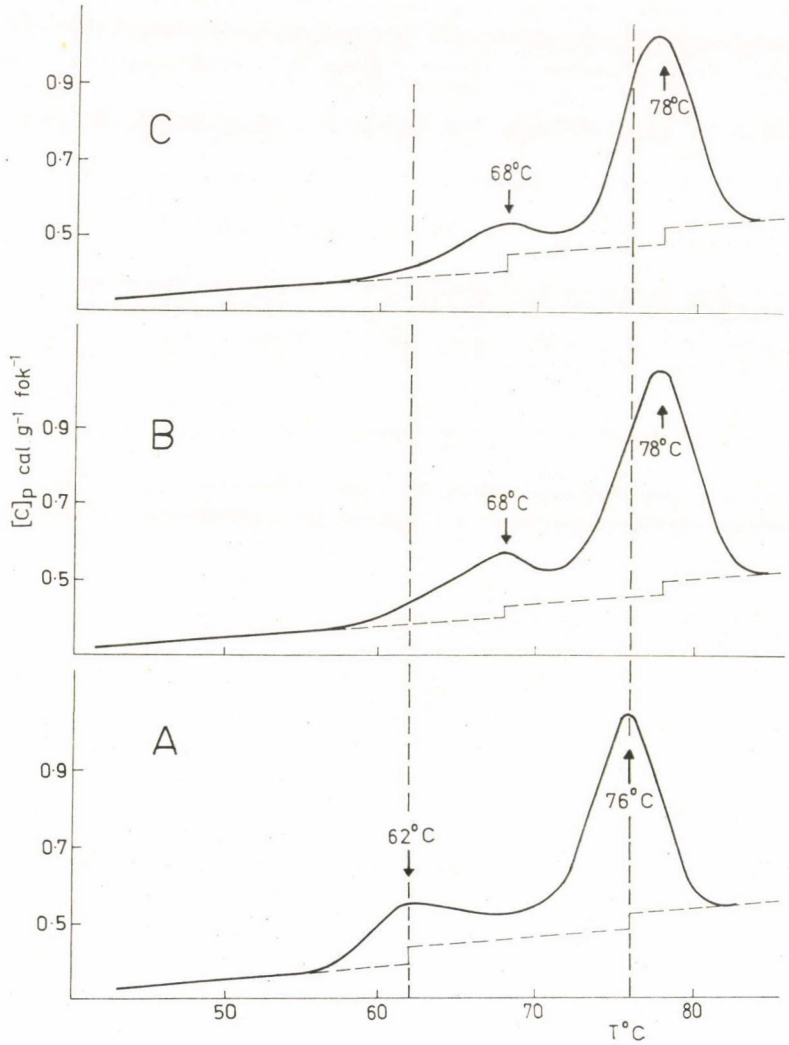
megváltozását okozná. A dinamikus tulajdonságok mérésére és összehasonlítására alkalmas érzékeny módszer a hidrogén-izotóp kicserélődés, amely a molekula belsejében nagy valószínűséggel eltemetett peptid hidrogének expozíciójának valószínűségét méri (14, 32). Másként fogalmazva információt

szolgáltat azoknak a konformációs fluktuációknak az egyensúlyi és sebességi állandóiról, amelyek révén ezek az eltemetett csoportok időnként a felszínre kerülnek. A hidrogén-deutérium kicserélődési kísérletek eredményeit az ún. relaxációs spektrumokban foglalhatjuk össze legszemléletesebben (28, 30). Ezek a relaxációs spektrumok (16. ábra), tulajdonképpen eloszlás-függvények és azt mutatják meg, hogy egy fehérje molekulában, esetünkben az IgG molekulában, a peptid hidrogének mely hányada, milyen valószínűséggel kerül



16. ábra. A monovalens és bivalens antigének kötődésének hatása a nyúl IgG relaxációs spektrumára. A szabad IgG-t körök, az IgG-monovalens antigén komplexet háromszögek, az IgG-bivalens antigén komplexet négyzetek jelölik. A méréseket három pH értéknél végeztük: a teli jelek pH 5.42, az üresek pH 7.25 — a félteli jelölések pH 8.52 értéket jelölnek. A hőmérséklet 298 °K. X a még ki nem cserélődött peptid hidrogének arányát jelöli, k_0 a kicserélődés kémiai sebességi állandója, t a kicserélődés kezdetétől eltelt idő. A szaggatott vonalak olyan hipotetikus polipeptidek kicserélődési görbéi, melyek azonos, ϱ valószínűséggel exponálják peptid hidrogénjeiket az oldószer számára [35]

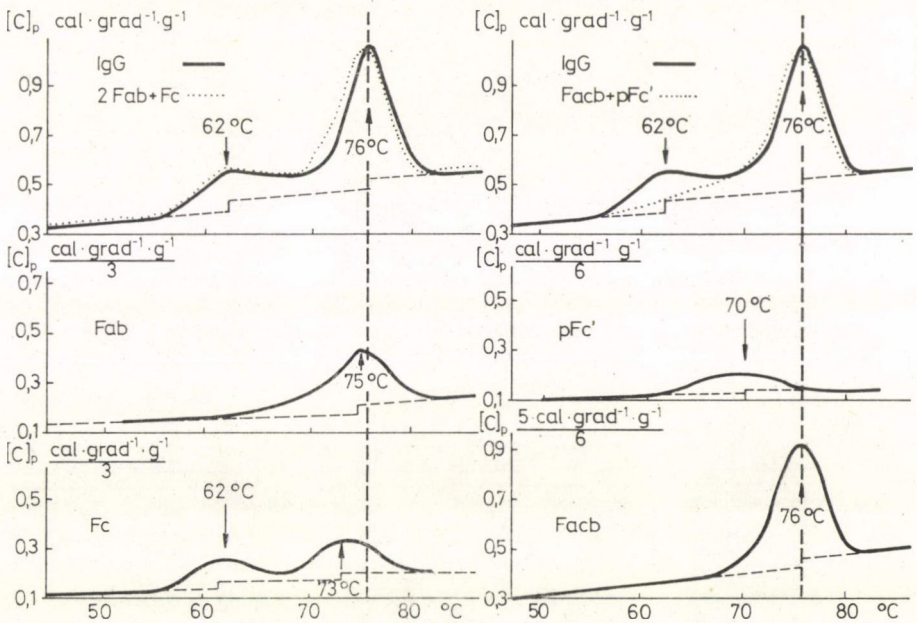
kontaktusba az oldószerrel. Ha egy molekula konformációs motilitása csökken, ill. astabilitása nő, ez az eloszlás-függvény eltolódik a kisebb valószínűségek irányába. A 16. ábrán a szaggatott vonalak hipotetikus polipeptideket jelképeznek, amelyek kooperatív átmenetek útján, az ábrán rendre feltüntetett ϱ valószínűséggel exponálják peptid hidrogénjeiket az oldószer számára. A berajzolt mérési adatok jól mutatják, hogy az IgG molekula peptid hidrogénjeit nem kooperatív lokális fluktuációk útján hozza érintkezésbe az oldó-



17. ábra. A parciális hőkapacitás hőmérsékletfüggése. A) Szabad nyúl immunglobulin, B) Monovalens poliszaharid antigénnel képzett komplex, C) Bivalens poliszaharid antigénnel képzett komplex (monomer frakció [5])

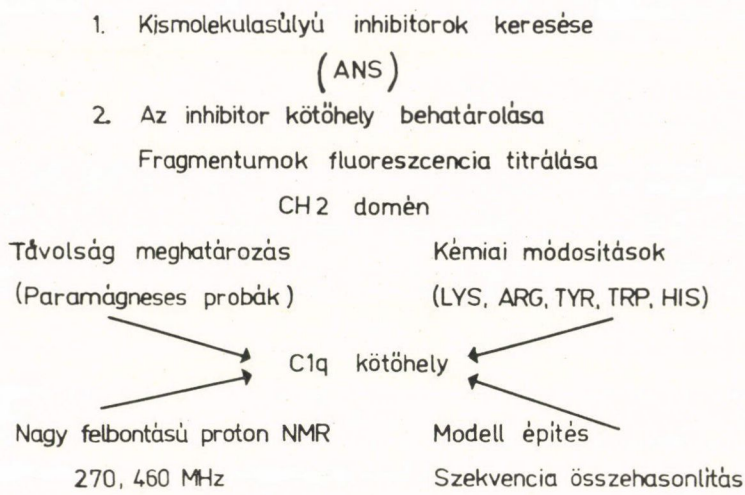
szerrel. Látszik, hogy antigénkötés hatására a molekula konformációs motilitása csökken, s az is, hogy ez a változás az összes, mérhető sebességgel cserélődő, tehát nem felszíni peptid hidrogént érinti. Érthető, hogy a statisztikus módszerekkel nem, vagy csak éppen hogy kimutatható szerkezetváltozások ilyen eklatánsan jelentkeznek a relaxációs spektrumban, hisz ha a valószínűségeket feltüntető skálára nézünk, láthatjuk, hogy kis valószínűnűségű események gyakoriságának viszonylag nagy változásairól van szó.

Az, hogy egy nyitott konformer egy milliomod, vagy tízmilliomod valószínűséggel fordul elő az átlagérték szempontjából legtöbb fizikai mérés pontossága esetén közömbös, a relaxációs spektrumban, vagy valamely a fluktuációkkal összefüggő funkcióban viszont ez már egy nagyságrend változást jelent. Ezért szeretném felhívni a figyelmet a detektált antigén indukálta motilitás változások esetleges funkcionális jelentőségére, és megismételni, hogy ezek a dinamikus tulajdonságbeli változások a IgG molekula egészére kiterjednek (35).



18. ábra. A nyúl IgG és különböző proteolitikus fragmentumai parciális hőkapacitásának hőmérséklet függése

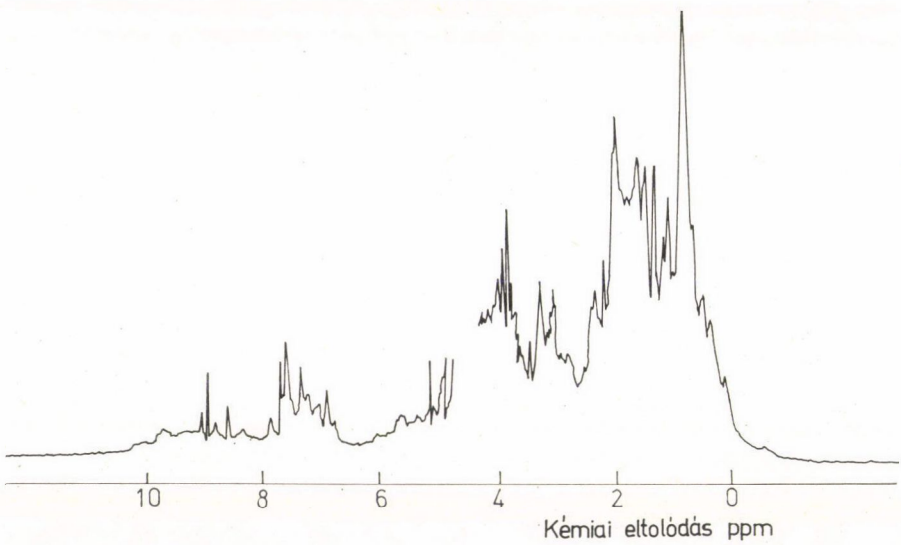
Másik érzékeny indikátora a térszerkezetváltozásoknak a hőkapacitás hőmérsékletfüggésének mérése adiabatikus mikrokaloriméterrel. A H—D kicserélődéssel kimutatott jelenség a hődenaturációs görbéken jelentkező átmeneti hőmérsékletek értékében, vagyis a konformációs stabilitás megváltozásában is tükröződik. Mint látható a 17. ábrából, az antigének hatására elsősorban az alacsonyabb hőmérsékleten mutatkozó átmenet —, amely a CH2—CH3 domének közötti kapcsolat erősödésének felel meg —, tolódik el. Ennek az átmenetnek az azonosítását különböző fragmentumokkal végzett kísérleteink (18. ábra) tették lehetővé (35). Ez az átmenet csak az intakt IgG molekulában és a Fc fragmentumban észlelhető, vagyis ahol megvan a CH2—CH3 kölcsönhatás. Ezek a kísérletek azért jelentősek, mert először demonstrál-



19. ábra. A nyúl IgG komplement kötőhelyének feltérképezésére irányuló munka stratégiája

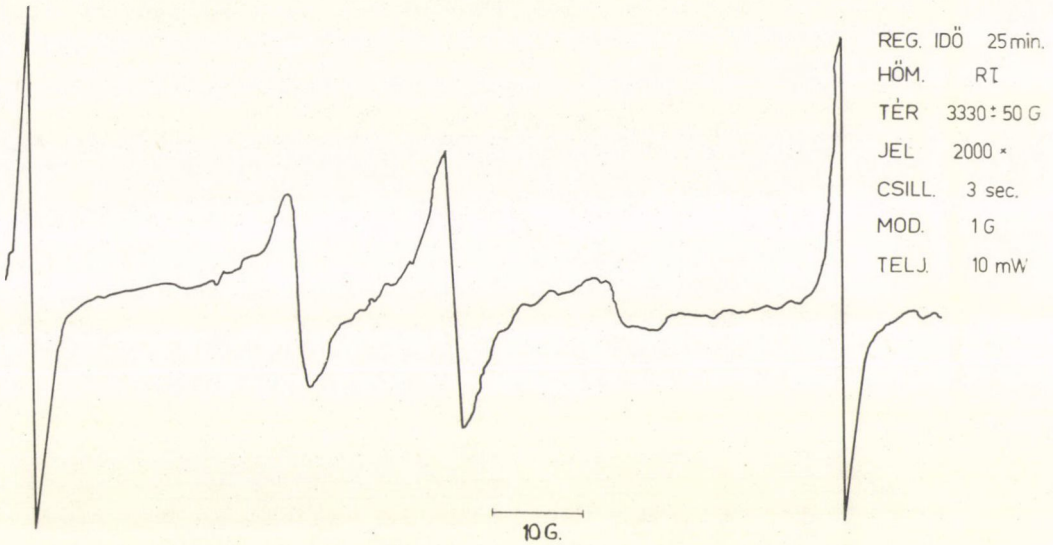
ták egyértelműen és kvantitatív módon a CH2—CH3 cisz kölcsönhatások létét s azt, hogy ezt az antigén kötőhelytől távoli kontaktust az antigén kötődése befolyásolja.

Az antigén hatására bekövetkező funkcionális jelentőségű konformációváltozások kimutatására és a domének közötti információ átadás mechanizmusának felderítésere irányuló vizsgálataink egyik „melléktermé̊ke" volt a komplement kaszkád első elemének, a Clq kötőhelyének a CH2 doménen belüli lokalizálása. E munka stratégiáját a 19. ábra szemlélteti. Kombináltuk



20. ábra. A nyúl IgG Fc fragmentumának 270 MHz proton NMR spektruma [2]

a szekvencia össszehasonlítás, a modell-építés, a kémiai módosítások és a fizikai és affinitás próbák módszerét a kötőhely feltérképezésére. Első lépésben kis molekulasúlyú, Clq kötést gátló vegyületeket kerestünk. Az 1-anilino--naftalén-8-szulfonsav hidrofób fluoreszcens próba ilyen vegyületnek bizonyult. Nagy felbontású NMR titrálással (20. ábra), távolság meghatározásokkal, spin és paramégneses próbák segítségével (21. ábra), affinitás próbával, és kémiai módosításokkal (22. ábra) jutottunk el odáig, hogy a



21. ábra. Spin jelölt nyúl IgG ESR spektruma

kötőhely CH2 doménen belüli helyét (23. ábra) a kötésben résztvevő néhány oldalláncot és a kötés természetét meghatározhattuk.

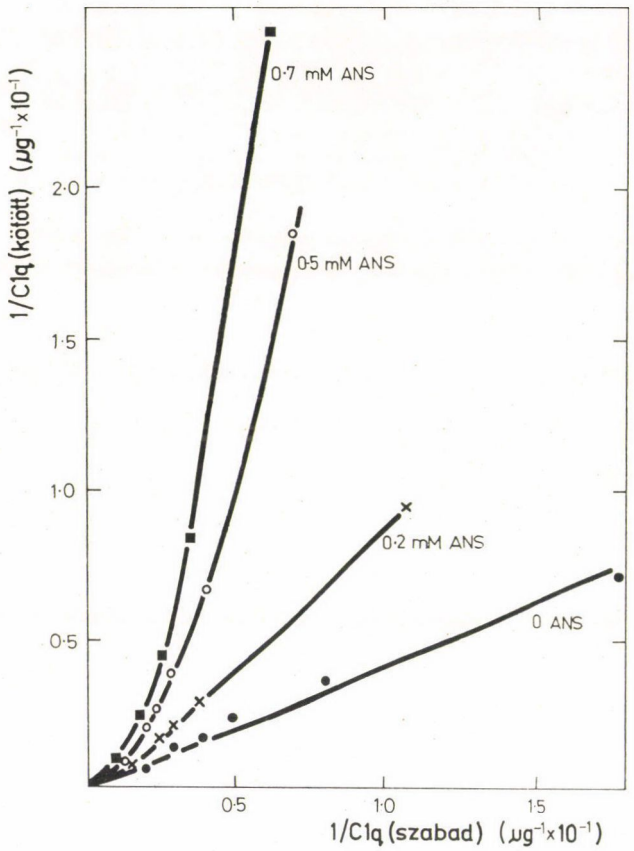
Összefoglalásként azt szeretném mégegyszer kiemelni, hogy az antigén felismerés és a komplement aktiválás között kapcsolatot teremtő bonyolult makromolekulák, az immunglobulinok funkciójával kapcsolatos szerkezetváltozásait fizikai-kémiai szempontból jól jellemezhető oldott állapotú, és a kísérlet típusától függő mértékben leegyszerűsített molekulafragmentumokon és komplexeken vizsgáltuk.

A módszereket úgy választottuk meg, hogy egymást kiegészítő információt szolgáltassanak. Szemléletünket az jellemezte, hogy funkcionális kölcsönhatások vizsgálatánál szem előtt tartottuk a makromolekulák flexibilitását és dinamikus tulajdonságait.

A Clq kötőhely feltérképezése mellett kimutattuk, hogy az antigén stabilizáló hatása a molekula Fc részére is kiterjed, vagyis a komplement kötőhelyet tartalmazó domén mintegy „érzékeli" az antigén jelenlétét. Lehet-

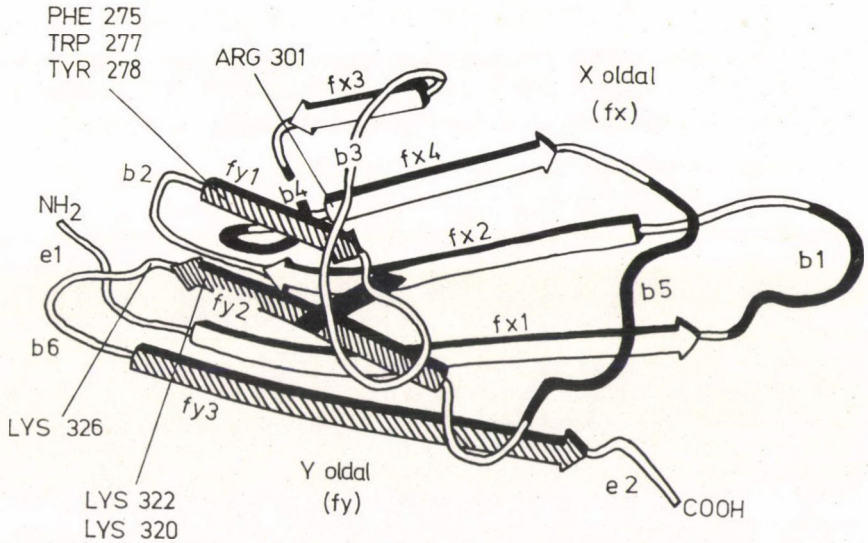
ségesnek tűnik, hogy a szerkezet dinamikus tulajdonságaiban észlelt változás része a komplement kötőhely aktiválásának.

E komplex munka bemutatásával az volt a célom, hogy szemléltessem miként lehet a fizika elveinek és módszereinek alkalmazásával közelebb jutni bonyolult biológiai rendszerek működésének megértéséhez.



22. ábra. Az 1-anilino-naftalén-8-szulfonsav fluoreszcens inhibitor hatása a ^{125}I radioaktív izotóppal jelölt C1q antigén-antitest aggregátumokhoz való kötődésére

Szeretném végezetül megemlíteni, hogy ez a közös munka Rodney R. Porter, Straub F. Bruno és Gergely János professzorok bátorítására indult és a kivitelezésben résztvettek Medgyesi György, Rajnavölgyi Éva, Kilár Ferenc, Török Judit, Neubauer József; Raymond A. Dwek, Simon Easterbrook-Smith, Jonathan Boyd (Oxford); Szergej Yu. Venyaminov (Puscsino) és Jean-Claude Jaton (Genf).



23. ábra. A valószínűsített Clq kötőhely elhelyezkedése a CH2 doménen belül és a kötőhely felépítésében résztvevő aminosav oldalláncok

IRODALOM

1. Beale, D. és Feinstein, A.: Q. Rev. Biophys. **9,** 135 (1976).
2. Boyd, J., Easterbrook-Smith, S. B., Závodszky, P., Mountford-Wright, C. és Dwek, R. A.: Mol. Immunology **16,** 851 (1979).
3. Cohen, S. és Milstein, C.: Adv. Immunol. **7,** 1 (1967).
4. Davies, D. R., Padlan, E. A. és Segal, D. M.: Cont. Top. Mol. Immunol. **4,** 127 (1975).
5. Dwek, R. A., Wain-Hobson, S., Dower, S., Gettins, P., Sutton, B., Perkins, S. J. és Givol, D.: Nature **266,** 31 (1977).
6. Easterbrook-Smith, S. B., Závodszky P., Willan, K. J., Gettins, P. és Dwek, R. A.: Biochemical Society Transactions 57th Meeting, Oxford **6,** 1126 (1978).
7. Edmundson, A. B., Ábola, E. E., Ely, K. R., Firca, J. R., Panagiotopoulos, N. C., Schiffer, M. és Westholm, F. A.: in Haber E. and Krause R. (eds): Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Raven Press, New York 135 (1979).
8. Feinstein, A. és Beale, D.: in Glynn, L. E. és Stewards, M. W.: (eds): Immunochemistry; An Advanced Text-Book, John Wiley, Chirchester 263 (1977).
9. Fischer, C. H. és Press, E. M.: Biochem. J. **139,** 135 (1974).
10. Gergely, J.: Immunbiológia, Medicina, Budapest (1979).
11. Givol, D.: in Lennox, E. S. (ed): Defense and Recognition, Structural Aspects, International Review of Biochemistry University Park Press, Baltimore **23,** 71 (1979).
12. Goetzl, E. J. és Metzger, H.: Biochemistry **11,** 3647 (1970).
13. Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P. M., Matsushima, M. és Palm, W.: in Melchers, F. and Rajewsky, K. (eds): The Immune System, Colloquium Mosbach, Springer-Verlag, Berlin **27,** 26 (1977).
14. Hvidt, Aa. és Nielsen, S. O.: Adv. Protein. Chem. **21,** 287 (1966).
15. Kabat, E. A.: Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry Ed. 2. Holt, Reinhart and Winston, New York (1976).
16. Kimball, J. V., Pappenheimer, A. N. és Jaton, J. C.: J. Immunol. **106,** 1177 (1971).
17. Knobel, H. R., Villeger, W. és Isliker, H.: Eur. J. Immunol. **5,** 78 (1975).
18. Linderström-Lang, K. M. és Schellman, J. A.: in Boyer, P. D., Lardy, H. and Myback, K. (eds): Protein Structure and Enzyme Activity, The Enzymes, II. ed., Academic Press, New York **1,** 443 (1959).
19. Metzger, H.: Recent Studies in Contemporary Topics of Mol. Immunol. **8,** 119 (1978).
20. Padlan, E. A., Davis, D. R., Rudikoff, S. és Potter, M.: Immunochemistry **13,** 945 (1976).

21. Poljak, R. J.: Adv. Immunol. **21,** 1 (1975).
22. Poljak, R. J.: CRC Critical Revievs in Biochemistry **5,** 45 (1978).
23. Porter, R. R.: in Lennox, E. S. (ed): Defense and Recognition, Structural Aspects, International Review of Biochemistry, University Park Press, Baltimore **23,** 177 (1979).
24. Secher, D. S.: International Review of Biochemistry, University Park Press, Baltimore **23,** 1 (1979).
25. Segal, D. M., Padlan, E. A., Cohen, G. A., Rudikoff, S., Potter, M. és Davies, D. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71,** 4298 (1974).
26. Silverton, E. W., Nania, H. A. és Davies, D. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74,** 5140 (1977).
27. Straub, F. B.: Adv. Enzymol. **26,** 89 (1964).
28. Venyaminov, S. Yu., Rajnavölgyi, É., Medgyesi, Gy. A., Gergely, J. és Závodszky, P.: Eur. J. Biochem. **67,** 81 (1976).
29. Villiams, R. P. J.: Angew. Chem. Int. Ed. **16,** 766 (1977).
30. Willumsen, L.: Biochem. Biophys. Acta **126,** 382 (1966).
31. Závodszky P., Abaturov, L. H. és Varshavsky, Y. M.: Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. **1,** 389 (1966).
32. Závodszky, P., Johansen, J. T. és Hvidt, Aa.: Eur. J. Biochem. **56,** 67 (1975).
33. Závodszky, P., Boyd, J., Eastedbrook-Smith, S. B. és Dwek, R. A.: Triggering of Phagocitic Cells, Proc. of Joint Meeting of the Biochemical Immunology Group of the British Biochemical Society and the British Society for Immunology With the Austria Society for Allergology and Immunol. and the Hungarian Soc. for Immunol., Székesfehérvár 40 (1979).
34. Závodszky, P., Easterbrook-Smith, S. B. és Dwek, R. A.: Mol. Immunol. **16,** 899 (1979).
35. Závodszky P., Jaton, J. C., Venyaminov, S. Yu. és Medgyesi, Gy. A.: Increase of Conformational Stability of Homogenious Rabbit Immunoglobulin G after Antigen Binding, Mol. Immunol. **18** 39 (1981).

AZ IMMUNGLOBULINOK KONFORMÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

CSER LÁSZLÓ

MTA Központi Fizikai Kutató Intézete, Budapest

Bevezetés

A magasabbrendű szervezetek a számukra idegen anyagok ellen többfajta módon védekeznek. A védekezés egyik eszköze az immunglobulinoknak nevezett fehérjevegyület család. Az ellenanyagok mintegy 75%-a IgG típusú immunglobulin. A továbbiakban csak ennek a típusnak vizsgálatára fogunk szorítkozni. Az immunglobulinok „feladata" — felismerni, megkötni az idegen anyagot (antigént), továbbá kiváltani a megkötött ellenanyag eltávolításának folyamatát.

A fenti bonyolult funkció megértéséhez ismerni kell az immunglobulinok szerkezetét.

Szerkezetmeghatározási módszerek és az általuk nyert eredmények

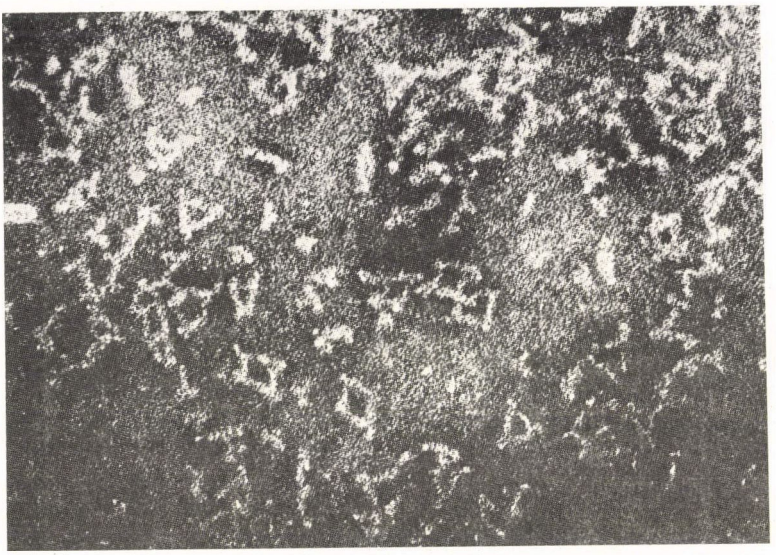
I. Biokémiai módszerek

— 1959-ben PORTER kimutatta, hogy az IgG molekula cisztein jelenlétében papainnal három fragmentumra bontható szét (két Fab és egy Fc fragmentum), amelyek közül a Fab elnevezésűek megtartják az antigénnel való kapcsolódás tulajdonságát (PORTER 1959).

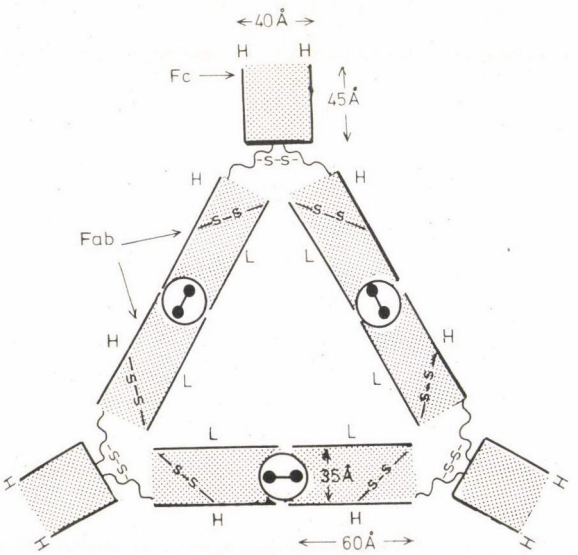
— Ugyancsak 1959-ben EDELMAN ismerteti eredményeit, miszerint az IgG-molekula felépítésében két ún. könnyű és két nehéz lánc vesz részt (EDELMAN 1973). 1970-ben EDELMAN megállapítja egy humán eredetű IgG láncainak aminosav-sorrendjét (EDELMAN 1973). Megválaszolatlan marad a kérdés a fragmentumok, illetve láncok térbeli elhelyezkedését illetően.

II.

Az elektronmikroszkóppal kapott felvételek egyike (lásd 1. ábrát), amelyet VALENTINE és GREEN készített (VALENTINE 1967) háromszögletű és négyt szögletű alakzatokat tartalmaz. A szerzők ezen alakzatokat úgy értelmezték, hogy azok bivalens, kis molekulasúlyú antigének által összekötött IgG-molekulák trimér, illetve tetramér konglomerációi. A második ábra mutatja be ezt az interpretációt, s ugyanott vannak feltüntetve a molekulák főbb méretei is. A molekulák alakját Y betűhöz hasonlíthatjuk.



1. ábra. Bivalens antigénekkel összekötött IgG molekulák elektronmikroszkóp felvétele



2. ábra. Az elektronmikroszkóp felvételen látható háromszögletű alakzatok interpretációjának sematikus ábrája

III.

A molekulák atomjainak helyzetét a *röntgen-diffrakció* módszerével lehet megállapítani, amennyiben a vizsgálandó anyag kristályos alakban előállítható. SARMA és munkatársai 1971-ben elvégezték a Dob IgG röntgendiffrakciós vizsgálatát (SARMA 1971). A harmadik ábrán látható a kérdéses molekula balsafa modelljének fényképe. A mintegy 10 nm magas T-alakú molekula törzse az Fc fragmentumnak a 18,5 nm „fesztávolságú" felső szár a két Fab fragmentumnak felel meg.

3. ábra. A Dob IgG modellje. (Az ábrán látható skála hossza 3 nm)

Látható a bemutatott példákból, hogy a két módszer az IgG molekulát más alakúnak és különböző méretűnek látja. Megjegyzendő, hogy az előbbi két módszer alkalmazásához előkészített mintákban a molekulák nincsenek természetes körülmények között, s ez felveti annak a kérdésnek megválaszolását, hogy természetesebb közegben, pl. fiziológiás oldatban vajon milyen alakú az IgG molekula és milyen méretekkel rendelkezik.

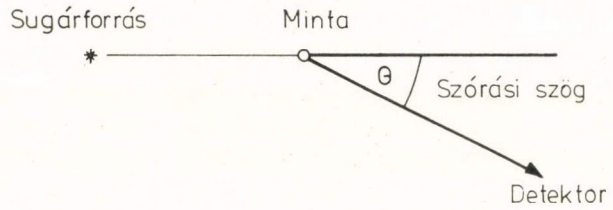
IV.

A szóródási kísérletekben használt röntgen vagy neutronsugárzás tipikus hullámhossza néhány tized nanométer. A szórási szög nagyságrendjét a hullámhossz (λ) és a részecske globális méretének aránya szabja meg:

$$\Theta \sim \frac{\lambda}{l} \ll 1 \qquad (1)$$

A fenti feltételből következik, hogy makromolekulák (így az IgG) esetében a szórási szög értéke általában kicsi. (Ezért szokás a módszert *kisszögű szórásnak* nevezni.

A kísérleti elrendezést az alábbi sematikus ábrán érzékeltetjük (4. ábra).



4. ábra. A kisszögű szórásvizsgálat mérésösszeállításának sematikus ábrája

Az egységes leírás kedvéért bevezetjük a szórási vektor abszolútértékének ($\varkappa$) fogalmát.

$$\varkappa = \frac{2\pi}{\lambda}\Theta \tag{2}$$

s a szórt intenzitást e paraméter függvényének fogjuk tekinteni.

Oldatban lebegő részecskék természetesen véletlenszerűen orientáltak, s emiatt a kisszögű szórás mérésből nem nyerhető teljes információ a részecskék szerkezetét és alakját illetően. E rendezetlenség az oka annak, hogy a szórt intenzitást elegendő, mint a $\vec{\varkappa}$ abszolút értéke függvényeként kezelni.

A teljességre való törekvés nélkül felsorolunk néhány alapvető információt, amelyet a kisszögű szórás segítségével nyerhetünk. (Lásd pl. JACROT összefoglaló cikkét (JACROT, 1976)).

Homogén monodiszperz részecskék oldata esetében a szórt intenzitás a

$$I(\varkappa) = I_0 \cdot c \cdot v^2 \left[\frac{\Sigma a_i}{v} - \varrho_s\right]^2 \cdot |F(\varkappa)|^2 \tag{3}$$

kifejezéssel adható meg.

Itt c — a koncentráció, v — a részecske térfogata, a_i — az oldott molekula atomjainak szórási amplitúdója, ϱ_s — az oldószer szórási amplitúdó sűrűsége.

$|F(\varkappa)^2|$ — a részecske alakját, méretét jellemző form-faktor.

1. Kis $\varkappa$ esetén

$$|F(\varkappa)|^2 = e^{-1/3\varkappa^2 R_g^2}$$

ahol

$$R_g^2 = \frac{\int_v (\varrho(\bar{r}))\bar{r}^2 d\bar{r}}{\int_v \varrho(\bar{r}) d\bar{r}} \tag{4}$$

az ún. girációs sugár négyzete s a részecske globális méretét, sűrűség eloszlását jellemző mennyiség.

2. Fontos a vékony hosszú rúd alakú molekula esete, ekkor

$$|F(\varkappa)|^2 = \frac{1}{\varkappa} e^{-1/2\varkappa^2 R_q^2} \tag{5}$$

ahol Rq — az ún. keresztmetszet girációs sugara.

A form-faktor előtti zárójel tüzetesebb vizsgálata adja meg a választ arra a kérdésre, hogy miért célszerű a drága és relative kis intenzitású neutron nyalábokkal végzett kisszögű szórásvizsgálat?

a) A biológiai anyagokban rendkívül nagy mennyiségben jelenlevő hidrogént a neutron ugyanolyan jól érzékeli mint a többi atommagot, míg a röntgensugárzás számára a hidrogénatom szinte láthatatlan.

b) A hidrogén szórási amplitúdója $a_H = -0{,}34 \cdot 10^{-12}$ cm, míg a nehézhidrogén (deuterium) szórási amplitúdója $a_D = 0{,}67 \cdot 10^{-12}$ cm, mint látjuk különböző előjelű. A víz és nehézvíz keverékének szórási amplitúdó sűrűsége ezért széles határok között mozog s igaz, hogy

$$\underset{-0{,}6 \cdot 10^{14}\ cm/Å^3}{\varrho_{H_2O}} < \underset{}{\bar{\varrho}\ \text{fehérje}} < \underset{6{,}4 \cdot 10^{14}\ cm/Å^3}{\varrho_{D_2O}}. \tag{6}$$

Így ϱ_s megfelelő módon megválasztható s elérhető például a

$$\frac{\Sigma a_i}{V} = \varrho_s \tag{7}$$

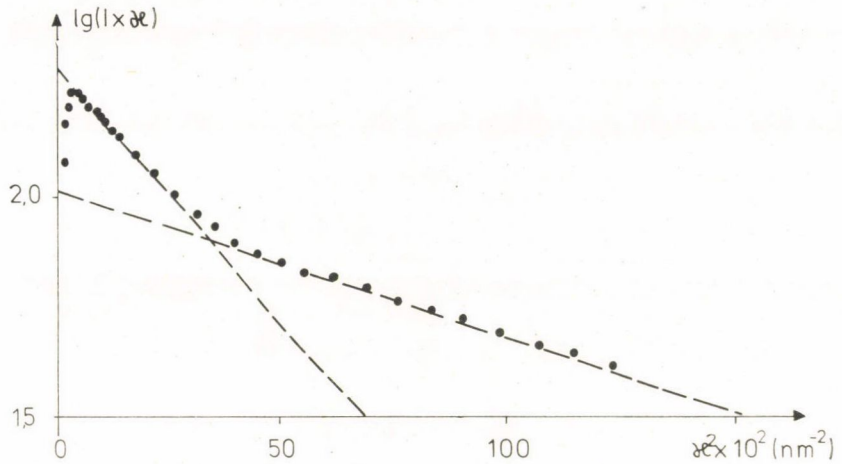
egyenlőség, ahonnan a molekula térfogata meghatározható.

Az oldószer szórási amplitúdó sűrűségének változtatását „kontraszt variáció" módszerének szokás nevezni, s a módszer különös jelentőséggel bír az inhomogén molekulák szerkezetének felderítése során.

S most példaként tekintsünk három olyan kérdést, amelyre a kisszögű szórás módszerével kaptunk választ.

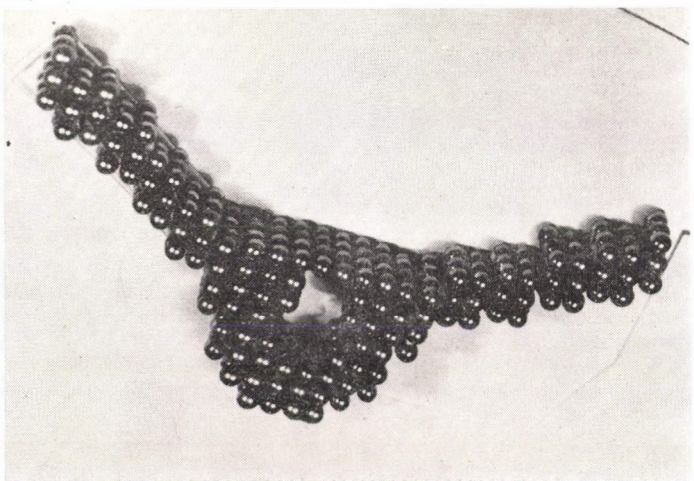
1. Milyen az IgG molekulát alkotó három fragmentum relatív térbeli helyzete, ha a molekula oldatban — természetes közegben — van?

A kisszögű szórás módszerével mért intenzitás eloszlást az ún. „keresztmetszet" koordinátákban, azaz a $\lg (I(\varkappa) \times \varkappa)$ görbét a $\varkappa^2$ függvényében ábrázolva az 5. ábrán látható, s az IgG molekulára jellemző, szórási intenzitás eloszlást kapjuk (Cser). Mivel a szórási intenzitás és a molekula alakja, valamint szerkezete között nincs egyértelmű megfeleltetés, így a kísérleti eredmények révén csak szétválaszthatjuk a lehetséges molekula alakokat a nem lehetségesektől. Ezt a következő módon tehetjük meg.

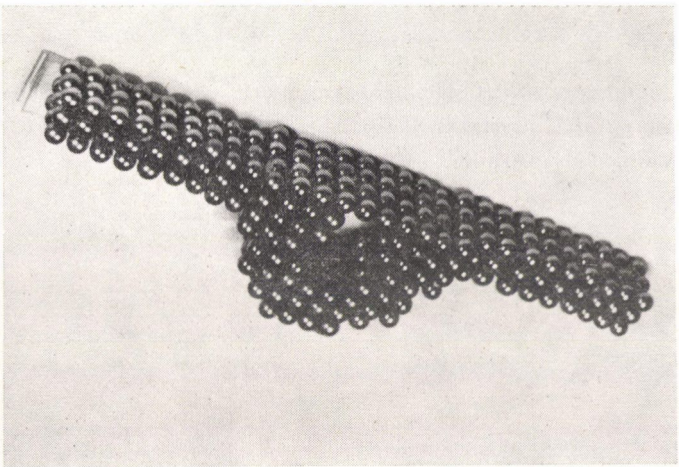


5. ábra. Az IgG molekulák jellegzetes kisszögű szórási intenzitás eloszlási görbéje. lg $(I \times \varkappa)$, $\varkappa^2$ koordináta rendszerben

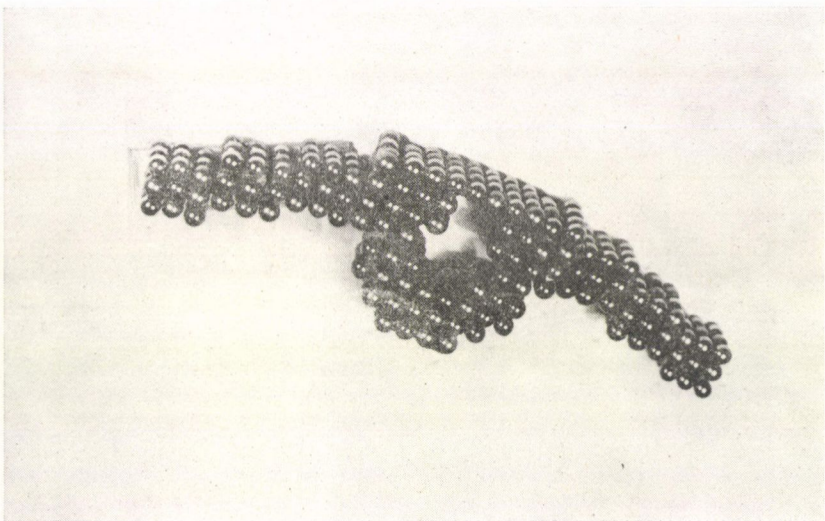
Az elektronmikroszkópia, a kristályszerkezet, valamint más információk alapján megszerkesztjük a molekula valószínű modelljeit és megfelelő számítástechnikai eljárással kiszámítjuk a modelleknek megfelelő szórási intenzitás görbéket, majd azokat összehasonlítjuk a mérési eredményekkel. A 6. ábrán az elektron mikroszkópsugallta Y modell (6a. ábra) és a röntgendiffrakció alapján kapott T-modell (6b. ábra) láthatók. Az F_{ab} „karok" további lefelé hajlításával egy harmadik modellt is előállítottunk (6.c. ábra), hogy a Fab fragmensek különböző helyzetének a számított szórási intenzitás eloszlásra kifejtett hatását tanulmányozzuk.



6. ábra. a)



b)



c)

6. ábra. Az IgG molekula három jellegzetes modellje. a) Y — alakú, b) T — alakú, c) lefelé hajló karú

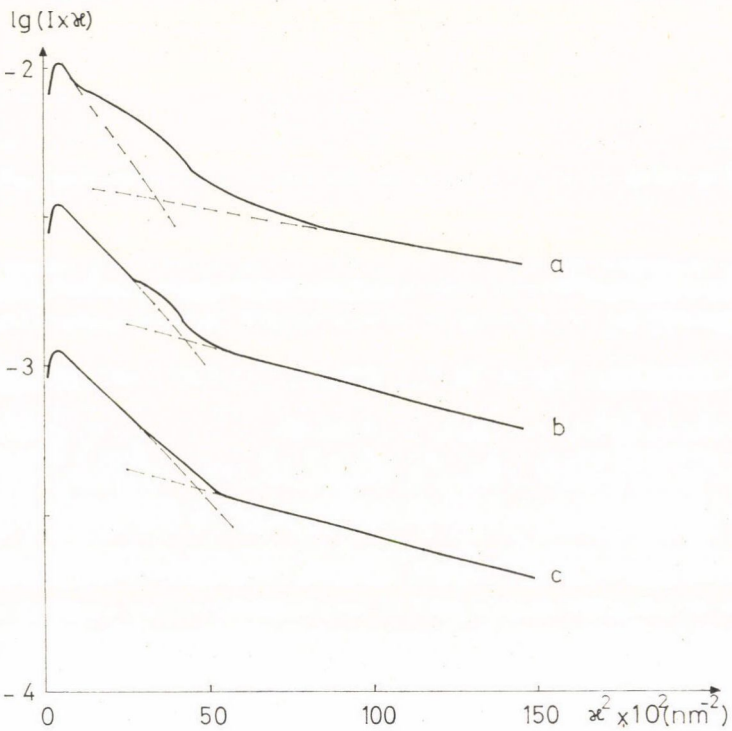
A számított és mért szórási intenzitás görbék összehasonlításából arra a következtetésre jutottunk, hogy az Y-alak kizárható a lehetséges modellek közül, mivel a vizsgált $\varkappa$ tartományban a számított görbe alakja erősen eltér a mért görbe alakjától (7a. ábra).

A T, valamint a lefelé hajló „karú" modellek eltekintve a $\varkappa^2$ tartomány közepén látható kisebb domború kitüremkedéstől a mért intenzitás eloszlást jól közelítő számított intenzitás eloszlásra vezettek (7b és 7c ábrák).

Következésképpen az IgG molekulák alakja oldott állapotban nem lehet Y-alakú, de a T vagy a lefelé hajló karalak lehetséges.

2. Az IgG molekula méretei közül ragadjunk ki egyet, nevezetesen a két Fab fragmentum együttes hosszát, amelyet jelöljünk l-lel. Az elektronmikroszkópiai felvételből

$$l = 12 \text{ nm, míg a röntgendiffrakció}$$
$$l = 18{,}5 \text{ nm értéket adott.}$$



7. *ábra.* A 6. ábrán látható modelleknek megfelelő számított szórási intenzitás eloszlási görbék a) Y — alakú modell, b) T — alakú modell, c) lefelé hajló karú modell (A szaggatott vonal a mért görbe menetét jelzi)

Ezt a mennyiséget a kisszögű neutronszórás segítségével a következő módon határoztuk meg. Készítettünk olyan monovalens antigéneket, amelyeknek a szórási amplitúdósűrűsége különbözött az IgG molekula átlagos szórási amplitúdó sűrűségtől. Az oldószer összetételét nehéz és normál víz keverésével úgy választottuk meg, hogy annak szórási amplitúdósűrűsége viszont megegyezzen az IgG molekula szórási amplitúdó sűrűségével (zérus kontraszt esete). A neutronok csak az IgG molekulák által megkötött antigéneket (esetünkben 40 000 d molekulasúlyú dextrán

molekulákat) érzékeljék. A szórási intenzitás eloszlás ekkor egy oszcilláló tagot tartalmaz.

$$I(\varkappa) = I_0(\varkappa) + A\frac{\sin \varkappa l'}{\varkappa l'} \tag{8}$$

amelynek argumentumában a két antigén súlypontjának l' távolsága szerepel. Az oszcilláló tag maximum és minimum helyeiből l' jól meghatározható, amelyből ha levonjuk az antigének más mérésekből ismert átmérőjét a kívánt l — (Fab—Fab) „fesztávolságot" kapjuk meg. A fenti eljárás segítségével két különböző, sertés IgG fenti jellemzőjét határoztuk meg. Ezekre $l_1 = 26{,}7 \pm 1{,}2$ nm és $l_2 = 20{,}8 \pm 1{,}4$ nm értékeket kaptunk (CSER 1978, 1980). Összevetve eredményeinket az elektronmikroszkópia, a röntgendiffrakció adataival, megállapíthatjuk, hogy oldatban az IgG molekulák nyúlánkabbak, mint kristályos közegben vagy az elektronmikroszkóp számára preparált állapotban. A két általunk kapott érték különbözőségéből pedig az egyes IgG-k méretbeli különbözőségére is következtethettünk. Ez a következtetés jó összhangban van más mérések (pl. girációs sugár mérései) eredményeiből levont hasonló tapasztalatokkal (CSER 1977).

3. Nem érdektelen kérdés pl. az IgG molekulák effektor funkciójának megértése szempontjából, hogy miként viselkedik a molekula antigén befogása során?

   Ha igen kisméretű, néhány száz dalton molekulasúlyú antigéneket reagáltatunk az immunoglobulinokkal, akkor a kapott IgG-antigén$_2$ komplex méretei az IgG méreteivel lesznek azonosak.

   Az előbb említett sertés IgG egyikét dinitrofenil-csoportot tartalmazó monovalens antigénekkel reagáltattuk. Az IgG-(Dnp antigén)$_2$ komplex szórási intenzitás eloszlását összehasonlítva az intakt IgG molekula szórási intenzitás eloszlási görbéjével (8. ábra) azt tapasztaltuk, hogy a két görbe alakja erősen hasonlít egymáshoz, de az egyenes szakaszokat jellemző $R_{q1,2}$-keresztmetszeti sugarak, valamint a girációs sugár (R_g) értékei azonos mértékben megváltoztak, mégpedig úgy, hogy az intakt molekulát jellemző paraméterek értéke volt a nagyobb.

$$\frac{\Delta Rg}{Rg} \simeq \frac{\Delta Rq_1}{Rq_1} \simeq \frac{\Delta Rq_2}{Rq_2} \simeq -7\%. \tag{9}$$

Durván szólva ez a következőket jelenti,

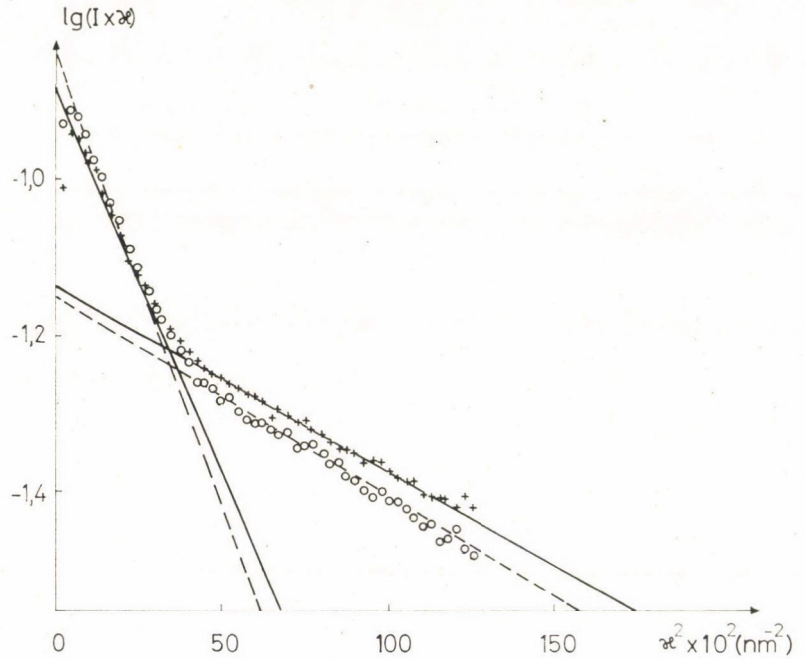
— a molekula egésze reagál az antigén megkötésére, azaz mind az Fab, mind az F_C fragmens méretei csökkennek.

— a molekula alakja viszont lényegében nem változik meg.

A fentiek alapján feltételezhetjük, hogy az antigének megkötése után fellépő konformációs változás, amely végig fut az egész molekulán az Fab

fragmensektől az F_C fragmensig, lehetővé teszi a komplement-rendszer aktiválódását.

Az itt elmondott három példa, amelyeket saját munkáinkból emeltünk ki, csak kiragadott reprezentánsa mindazoknak a lehetőségeknek, amelyekkel a kisszögű neutron és röntgenszórás rendelkezik, s amelyek természetesen nem szorítkoznak kizárólagosan az immunglobulinok szerkezetének felderítésére, hanem a legkülönbözőbb biológiai makromolekulák szerkezetének megismeréséhez nyújtanak egyedülálló segítséget.



8. ábra. Sertés anti-Dnp IgG molekula kisszögű szórási intenzitás eloszlás görbéje
○ — intakt IgG
\+ — IgG-(Dnp-antigén)$_2$ komplex

IRODALOM

Cser, L., Franek, F., Gladkih, I. A., Nezlin, R. S., Novotny, J. and Ostanevich, Yu. M.: FEBS Letters **80,** 329 (1977).

Cser, L., Franek, F., Gladkih, I. A., Nezlin, R. S., Novotny, J. and Ostanevich, Yu. M.: FEBS Letters **93,** 312 (1978).

Cser, L., Franek, F., Gladkih, I. A., Novotny, J. and Ostanevich, Yu. M.: Immunology Letters **1,** 185 (1980).

Cser, L., Franek, F., Gladkih, I. A., Kunchenko, A. B. and Ostanevich, Yu. M.: Eur. J. Biochem. Közlés alatt.

Edelman, G. M.: Science **180,** 830 (1973).

Jacrot, B.: Rev. Progr. Phys. **39,** 911 (1976).

Porter, R. R.: Biochem. J. **73,** 119 (1959).

Sarma, V. R., Davies, D. R., Lalaw, L. W., Silverton, E. W. and Terry, W. O.: Cold Spring Harbor Symp. Biol. **36,** 413 (1971).

Valentine, R. C. and Green, N. M.: J. Mol. Biol. **27,** 615 (1967).

FEHÉRJE MATRIX DINAMIKÁJA ÉS AZ ENZIMFUNKCIÓ KÖZÖTTI KAPCSOLAT

DAMJANOVICH SÁNDOR, SOMOGYI BÉLA és TRÓN LAJOS

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete

Bevezetés

A különböző fehérjefunkciók (katalitikus, receptor stb. tulajdonságok) megértéséhez nyilvánvaló feltétel a struktúra tisztázása. A tudomány fejlődésének, az adott funkcionális tulajdonságokról felhalmozódó ismereteknek ugyanakkor az a következménye, hogy időről-időre változik a kutatásban a különböző strukturális tulajdonságok súlyozása.

Jól felismerhető ez a tendencia az enzimfehérjék katalitikus sajátságainak vizsgálatát célzó kutatásokban is. Az enzimek katalizáló képességét leíró első elméletek csaknem kizárólag az enzimek aktív centrumában lezajló jelenségeket vizsgálták (l. pl. LAIDLER 1965), míg az enzim további részeit úgy tekintették, mint amelyek az aktív centrum atomcsoportjainak megfelelő konformációs állapotáért felelősek. Ezt a rigid-enzim képet látszottak alátámasztani a fehérjék és más makromolekulák kristályos szerkezetéről számot adó adatok, amelyek többek között Bernal, Perutz és Kendrew munkásságának köszönhetők.

Az enzim funkcionális struktúrájának plasztikusabb képe akkor kezdett formálódni, amikor LINDERSTRØM-LANG a fehérjékben a H—D kicserélődés kinetikáját tanulmányozva azt találta, hogy annak sebességét a fehérjestruktúra plaszticitása, motilitása határozza meg, s ez a motilitás konformáció-érzékeny (LINDERSTRØM-LANG, SCHELLMAN 1959).

Tekintve, hogy a klasszikus elméletek szinte mindegyike az enzimek aktív centrumára lokalizálta az enzimek katalitikus hatását, érthető, hogy kezdetben a flexibilisebb enzimstruktúrát feltételező elméletek is az enzimek ligandkötő centrumát, vagy annak környezetét vizsgálták. Ilyen volt KOSHLAND „induced fit" elmélete, amely feltételezte, hogy az enzimhez kötődő szubsztrát deformálja az enzim „plasztikus" kötőcentrumát (KOSHLAND 1958). A MONOD és mtsai (1965) allosztéria elmélete, valamint a STRAUB és SZABOLCSI (1964) által megfogalmazott, az enzimek ligandkötését leíró ún. „fluktuációs fit" elmélet már túllépett ezen a szemléleten is, amennyiben az enzimmolekulákat úgy tekintette, mint amelyek sok, szabadenergia-szintben egymáshoz közelálló konformációs állapotot is felvehetnek. Ezen konformációs állapotok egy része alkalmas egy adott szubsztrát megkötésére, míg mások nem. Az enzimmolekulák tehát konformációs fluktuációt végeznek, és a

ligandok az alkalmas konformációs állapotú molekulához kötődve stabilizálják az adott állapotot, eltolva ilymódon a konformációs egyensúlyt.

Ezek, a bizonyos mértékig önkényesen kiragadott példák is illusztrálják, hogy az enzimek katalitikus tulajdonságának vizsgálata során hogyan került fokozatosan előtérbe az enzimmolekulák struktúrájának dinamizmusa.

A fehérje matrix dinamikájának elméleti és kísérletes vizsgálati lehetőségei

Arra a kérdésre, hogy a fehérje matrix struktúrájának dinamizmusa milyen szerepet játszik az enzimek katalitikus képességében, igen nehéz minden részletében alapos választ adni. Ennek oka részben az, hogy a fehérje, mint makromolekula dinamikájának atomi szintű leírása tulajdonképpen a klasszikus soktest-problémákba ütközik. Tovább bonyolítja a képet, hogy már a többé-kevésbé részletes leíráshoz is figyelembe kell venni, hogy a fehérjemolekulák a környezetükkel intenzív, és a dinamikus sajátságokra nézve legalábbis részben meghatározó energetikai kapcsolatban vannak. Tekintve, hogy az enzimek fiziológiás környezete vizes oldat, s a víz mint folyadék dinamikai szempontból önmagában is problematikus, a vizes oldatban lévő fehérjékben lezajló transzportfolyamatok explicit, részletes leírása — legalábbis jelenleg — nem valósítható meg.

A valóság eme pesszimista képe ellenére a hetvenes évek eleje óta egyre gyarapodnak azon elméleti és kísérletes vizsgálatok, amelyek a teljes enzimmolekula dinamikájának, fluktuációs karakterének, s ezek katalitikus aktivitásban játszott szerepének tisztázását célozzák.

Tekintve, hogy célunk főként az e tárgykörbe eső saját vizsgálataink összefoglalása, az elméleti vizsgálatokat illetően itt csak megemlítjük a GREEN és JI (1973) által kidolgozott elektro-mechano-kémiai elméletet, CASERTA és CERVIGNI (1974) piezoelektromos elméletét, valamint KRAMER 1940-ből származó elméletének GAVISH és WERBER (1979) által történő feleleventését és átdolgozását mint olyan elméleteket, amelyek az enzimmolekula egészét mint fluktuáló, energiatranszfer folyamatokban aktívan résztvevő, a környezetével energetikai egységet képező katalitikus egységet kezelik.

Hasonló szemléletű enzimmodelt dolgoztunk ki intézetünkben 1971-től kezdődően (SOMOGYI, DAMJANOVICH 1971, 1975; DAMJANOVICH, SOMOGYI 1973, 1978).

Vizsgálatainkban a legegyszerűbb, Michaelis-féle enzimreakciót tárgyaltuk:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P. \qquad (1)$$

Bár a valóságos enzimreakciók ennél jóval bonyolultabbak, a k_1, k_{-1} és k_2 sebességi állandókkal jellemzett folyamatok univerzálisak, amennyiben

valamennyi enzimreakció bármely részlépése ezen sebességi állandók valamelyikével leírható folyamatként kezelhető.

Az ES komplex aktiválását eredményező folyamatokat illetően feltételezzük, hogy a komplex a környezetével állandó energiacserében állva, a környezettől felvett energia egy részét fordítja az ES, ill. EP állapotokat elválasztó energiagát leküzdésére. A különböző típusú energiaforgalmat megvizsgálva azt találtuk, hogy a katalízisben az ún. T → V átmenetek játszanak meghatározó szerepet, vagyis azon folyamatok, amikor a környezet különböző molekulái (puffer, különböző nagyságú víz-asszociátumok stb.) a komplex felületére ütközve transzlációs energiájuk egy részét átadják az ES komplexnek úgy, hogy a felületi atomcsoportok vibrációs szintjeit gerjesztik. Ezen energiák egy része eljuthat egészen a komplex belsejébe is, más része azonban visszacsatolódik a környezethez. A komplexet a fehérjestruktúra által meghatározott speciális csatolású oszcillátorrendszerrel modellezve belátható, hogy a felületi csoportok vibrációs energiája a struktúra által meghatározott „energiautakon" az enzim aktív centrumába kerülhet. Feltételezzük, hogy a komplex aktiválásához annak kitüntetett felületi pontjain megfelelő időrendben energiát kell felvennie, vagyis az aktiváláshoz egy megfelelő „ütközési minta" szükséges. Nyilvánvaló, hogy a statisztikusan előforduló ütközések között a megfelelő ütközési minta előfordulási valószínűsége az enzimre specifikus, amennyiben az enzimre jellemző kitüntetett felületi pontok számától, helyétől, s az ugyancsak enzimfüggő időrendtől függ. Ez a valószínűség függ továbbá — a T → V átmenetekre fennálló kvantumfizikai megkötések miatt — a környező molekulák tömegeloszlásától is (STRETTON 1969).

A kinetikai konstansokat fizikai paraméterekre bontva, a fent bemutatott feltételeket egy, a folyadékokra kidolgozott egyszerű rácsmodell (SOMOGYI 1971) segítségével vettük figyelembe a k_2 és k_{-1} konstansokat felépítő paraméterek további felbontására.

A matematikai tárgyalás végeredménye:

$$k_{-1} = P_s \frac{kT}{\pi\lambda^2\eta\varrho}\left[e^{-\frac{E_d}{kT}} - \xi e^{-\frac{E_p}{kT}}\right] \tag{2}$$

ill.

$$k_2 = P_s \frac{\xi kT}{\pi\lambda^2\eta\varrho} e^{-\frac{E_p}{kT}}, \tag{3}$$

ahol

$$e^{-E_d/kT} = \prod_{i=1}^{k'} \frac{\sum_{j=}^{J_i} c_j V_j \exp\left(-\frac{m_j}{2kT} v\right)}{\sum_{j=1}^{J_i} c_j V_j} \tag{4}$$

és

$$e^{-E_p/kT} = \prod_{i=1}^{k'} \frac{\sum_{j=1}^{J_i} c_i V_j \exp\left(-\frac{m_j}{2kT}(w_i^2 - v_i^2)\right)}{\sum_{j=1}^{J_i} c_j V_j} . \qquad (5)$$

A (2)—(5) egyenletekben szereplő minden egyes paraméter az ES komplex vagy környezetének molekuláris szintű jellemzője (Somogyi, Damjanovich 1975). Modellünk először írta le többé-kevésbé explicit, kvantitatív módon az enzimatikus reakciók kinetikai konstansait úgy, hogy megadta azok molekuláris paraméterekre való felbontását, s alapfeltevésként abból indul ki, hogy a komplex aktiválási folyamatában az enzim és környezete által együttesen meghatározott fluktuációs folyamatok — az ES komplexen belüli energiavándorlási és szuperpozíciós folyamatok — lényeges szerepet játszanak.

A tárgyalásmód egyenes következménye, hogy a modell egy új enzimszabályozási módot jósol meg, azt ugyanis, hogy a környezet tömegeloszlásának megváltozása — minden más paraméter változatlan értéke mellett is — a k_2 és k_{-1} értékének az enzimre specifikus megváltozását eredményezi.

Azon kérdés kísérletes megközelítése, hogy az enzimfehérjék dinamikus jellemzői milyen szerepet játszanak az enzimatikus tulajdonságok meghatározásában — az elméleti jellegű vizsgálatokhoz hasonlóan —, számos nehézség leküzdését kívánja meg.

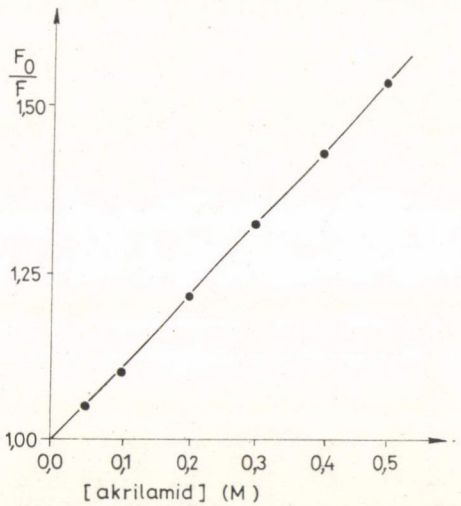
A fehérjeszerkezet belső dinamikájának, fluktuációs karakterének jellemzésére Lakovicz és Weber (1973) a triptofán fluoreszcenciájának oxigén segítségével történő kioltását használták. Később Eftink és Ghiron (1975, 1976a, 1976b, 1977) hasonló vizsgálatokat végeztek akrilamid segítségével. Mindkét kioltó csak úgy juthat be a fehérje belsejébe, hogy a fehérje matrix szerkezeti fluktuációjának eredményeképpen formálódó tranziens csatornák, lyukak képződnek, és ezek teszik lehetővé a fehérjén belüli diffúziót. A dinamikus karakterű kioltási folyamat detektálása révén tehát a kioltók fehérjén belüli diffúziójáról nyerhetünk információt.

Kísérletes vizsgálataink célja az volt, hogy foszforiláz b esetén a triptofán csoportok fluoreszcenciájának akrilamid kioltását megpróbáljuk összefüggésbe hozni az enzim katalitikus vagy regulatorikus tulajdonságaival. Úgy véljük, hogy egy ilyen korreláció ugyan nem közvetlen bizonyítéka a fluktuációs mozgások enzimatikus folyamatokban betöltött szerepének, azonban a jelenlegi kísérletes módszerek segítségével többet állító konklúzióra jutni igen nehéz lenne.

Vizsgálataink során az alábbi eredményeket kaptuk: akrilamid hatására a foszforiláz b triptofánjainak fluoreszcencia intenzitása csökkent. Ezt szemlélteti az 1. ábra, ami a mérési adatoknak a Stern—Volmer-egyenlet (1919)

szerinti ábrázolását mutatja. A fluoreszcencia kioltás értékére jellemző F_0/F hányados 0,5 M akrilamidkoncentráció értékig lineárisan nő, ami arra utal, hogy a kioltás mechanizmusát tekintve dinamikus. Ezt a fluoreszcencia élettartam méréseink is igazolták.

A módosított STERN—VOLMER-egyenlet alkalmas annak eldöntésére, hogy az összes triptofánmennyiség hányad része hozzáférhető a kioltó számára. Ennek vizsgálatát az tette szükségessé, hogy a foszforiláz triptofán fluoresz-



1. ábra. A foszforiláz b saját fluoreszcenciájának az akrilamid koncentrációtól való függése STERN—VOLMER ábrázolásmódban. A méréseket 30 °C-on végeztük, a fluoreszcenciát 295 nm hullámhosszú fénnyel gerjesztettük, az emisszót 333 nm hullámhossznál detektáltuk. A minták abszorpciója a gerjesztési hullámhosszon 0,05 volt. F_0 az akrilamidot nem tartalmazó minta fluoreszcencia intenzitása

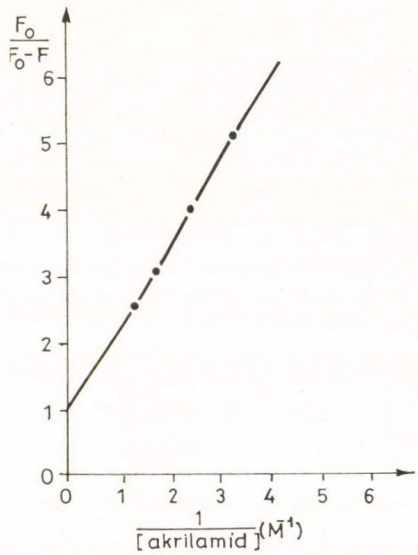
cencia káliumjodid segítségével történő kioltásának analízise arra utalt, hogy a molekulánkénti 12 triptofán közül 3 a felülethez közel, míg 9 az enzimmolekula belsejében helyezkedik el.

A 2. ábra a mérési adatok módosított STERN—VOLMER-egyenletnek megfelelő ábrázolását mutatja. Az ordináta metszet értéke azt mutatja, hogy az akrilamid végtelen nagy koncentrációban az összes triptofánt képes kioltani, azaz a foszforiláz minden triptofán csoportját eléri, tehát valóban bejut az enzimmolekula belsejébe.

Az enzim fluoreszcenciás vizsgálataival párhuzamosan enzimaktivitásmérések is történtek. Ezen vizsgálatok azt mutatták, hogy az akrilamid csökkenti az enzim maximális sebességét, de a szubsztrátkötő képességét nem befolyásolja. Ezt mutatja a 3. ábra, ami különböző glükóz-1-foszfát (G-1-P) és akrilamid-koncentráció mellett végzett aktivitásmérési adatok

Lineweaver—Burk szerinti ábrázolása. A foszforiláz többi ligandjára (glikogén, AMP) is hasonló eredményeket nyertünk.

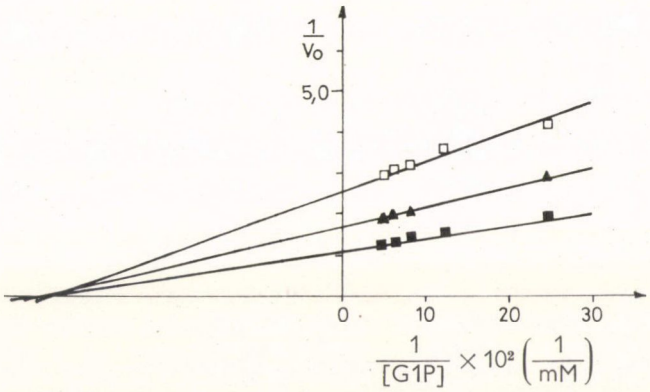
Az akrilamid denaturáló, vagy durva konformáció-változtató hatása ellen szól az a tapasztalatunk, hogy 0,5 M akrilamid-koncentrációig az enzim egyrészt kb. négy órán át változatlan aktivitást mutat, másrészt a triptofán csoportjainak fluoreszcenciás spektruma sem változik. Megvizsgálva az akrilamid hatásának reverzibilitását azt tapasztaltuk, hogy mind a triptofán fluoreszcenciára, mind az enzim aktivitására gyakorolt hatás tökéletesen



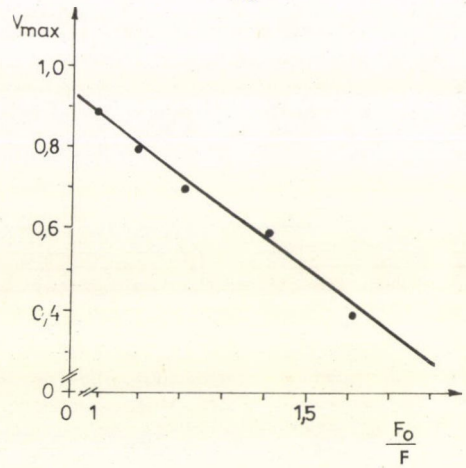
2. ábra. A foszforiláz b saját fluoreszcenciájának az akrilamid koncentrációtól való függése módosított STERN—VOLMER ábrázolásmódban. A mérések feltételei azonosak az 1. ábra szövegében megadottakkal

reverzibilis. Az akrilamid fluoreszcencia kioltó- és aktiválásCsökkentő hatásának korrelációját illetően a 4. ábra nyújt felvilágosítást.

Az ábra tanúsága szerint a korreláció meglepően erős. Eszerint, s a fenti megállapítások alapján eredményeink úgy interpretálhatók, hogy a két hatást kiváltó ok közös: az akrilamidnak az enzimmolekulában való jelenléte, egyrészt a triptofán csoportokkal ütközve azok fluoreszcenciájának ütközéses kioltását, másrészt a molekula atomcsoportjainak mozgási szabadságát (fluktuációját) korlátozva az enzim aktivitásának csökkenését okozza. Interpretációnkat alátámasztja, hogy az akrilamid nem befolyásolja az enzim funkcionális ligandjainak (aktivátor, szubsztrátok) kötődését, ami ellene szól annak, hogy a hatást az akrilamidnak a kötőcentrum konformációját megváltoztató specifikus kötődése produkálná.



3. ábra. A glikogénszintézis kezdeti sebességének a G-1-P koncentrációtól való függése kettős reciprok ábrázolásban. A méréseket 50 mM TRIS, 1,5 mM EDTA, 10 mM MEA pufferben (pH = 6,8) végeztük 30 °C-on. Koncentrációk: [Glikogén] = 1% (w/v); [AMP] = 1 mM; [akrilamid] = 0 (■); 0,4 M (▲); 0,8 M (□). A reakció sebességét önkényes egységekben adtuk meg



4. ábra. A foszforiláz b által katalizált reakció különböző akrilamid-koncentráció mellett mért maximális sebessége és a relatív fluoreszcencia intenzitás reciproka közötti összefüggés

A vizsgálatok felhasználási lehetőségei

Bár alapszintű kutatások esetén nem hálás dolog az értékmegállapítás, talán nem érdektelen még az előzőekben bemutatott, erősen alapkutatási probléma esetében sem legalább megkísérelni, hogy a gyakorlati vonatkozásokra is utaljunk. A fehérjék fluktuációja — amennyiben valóban nem csupán egy attributum, de funkcionális jelentése is van — szerepet játszhat a fehérje-fehérje kölcsönhatás során, úgy, hogy az összekapcsolódott fehérje „konglomerátum" már eleve más jellegű funkcionális egységet képezhet, mint az azt felépítő elemek puszta addíciója. Ennek a multienzim komplexek működésének megértésében igen fontos szerepe lehet.

A sejtmembrán glikoproteidjeinek mozgása, amely immunológiai és még sok egyéb citológiai szempontból is alapvető fontosságú, közvetlen kapcsolatba hozható a fehérje-rész saját fluktuációjával. A közelmúltban kimutatták, hogy a főleg glikoproteidekből felépülő membrán receptorok laterális és rotációs diffúziója szinte kizárólag a fehérje-fehérje kölcsönhatástól függ (NIGG, CHERRY 1979, SCHINDLER és mtsai 1980). A receptorok laterális és rotációs mozgása (amit a fluktuáció befolyásol) a ligand-receptor kapcsolódására is kihathat. Ez utóbbi közvetlen immunológiai, onkológiai, farmakokinetikai jelentősége pedig vitathatatlan. Így túlzás nélkül állíthatjuk, hogy a teljesen elvontnak tűnő fehérjefluktuáció-kutatás némi adaptálás után közvetlen gyakorlati jelentőségre tehet szert.

IRODALOM

1. CASERTA, G., CERVIGNI, T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71,** 4421 (1974).
2. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: J. Theoret. Biol. **41,** 567 (1973).
3. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B.: Symposia Biologica Hungarica **21,** 159 (1978).
4. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72,** 3290 (1975).
5. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: J. Phys. Chem. **80,** 486 (1976a).
6. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: Biochemistry **15,** 672 (1976b).
7. EFTINK, M. R., GHIRON, C. A.: Biochemistry **16,** 5546 (1977).
8. GAVISH, B., WERBER, M. M.: Biochemistry **18,** 1269 (1979).
9. GREEN, D. E., Ji, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69,** 726 (1972).
10. KOSHLAND, D. E. Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **44,** 98 (1958).
11. LAIDLER, K. J.: Chemical Kinetics 2nd Edition, McGraw-Hill, London (1965).
12. LAKOVICZ, J., WEBER, G.: Biochemistry **12,** 4171 (1973).
13. LINDERSTRØM-LANG, K. U., SCHELLMAN, J.: in: The Enzymes Vol. 1. p. 443 (Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K. Eds) Acad. Press, New York (1959).
14. MONOD, J., WYMAN, J., CANGEAUX, J. P.: J. Mol. Biol. **12,** 88 (1965).
15. NIGG, E. A., CHERRY, R. J.: Biochemistry **18,** 3457 (1979).
16. SCHINDLER, M., KOPPEL, D. E., SHEETZ, M. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77,** 1457 (1980).
17. SOMOGYI, B.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **6,** 289 (1971).
18. SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **6,** 353 (1971).
19. SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: J. Theoret. Biol. **51,** 393 (1975).
20. STERN, O., VOLMER, M.: Z. Physik **20,** 183 (1919).
21. STRAUB, F. B., SZABOLCSI, G.: Molekularnaja Biologia, Nauka, Moscow (1964).
22. STRETTON, J. L.: in: Transfer and Storage of Energy by Molecules (Burnett, G. M., North, A. M. Eds) Vol. **2,** p. 59. Wiley, London (1969).

GÉNMŰKÖDÉS ÉS NUKLEINSAVSZERKEZET

VENETIANER PÁL

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete

A DNS szerkezeti modelljének megalkotása (26), a gén és az általa kódolt fehérje kolinearitásának bizonyítása (27), valamint a genetikai kód megfejtése (12, 16, 17) szilárdan megalapozták mai elképzeléseinket arról, hogy *általában* hogyan határozza meg a DNS nukleotidsorrendje az általa kódolt fehérjék szerkezetét. Azt is tudjuk, hogy a fehérjekódoló funkciót betöltő DNS-en kívül vannak a DNS-nek olyan szakaszai, amelyek szabályozó szerepet játszanak, mintegy utasításokat adnak a leolvasó rendszernek a működés megkezdésére, leállítására, a működés igények szerinti fokozására vagy csökkentésére. Mivel a DNS-szerkezet (nukleotidsorrend) vizsgálata a közelmúltig lehetetlen volt, e szabályozó funkció vizsgálatára csak indirekt, genetikai módszerek álltak rendelkezésünkre. A molekuláris genetika teljesítőképességének gyönyörű bizonyítéka, hogy így is sikerült a génműködés szabályozásának olyan modelljét megkonstruálni (8), amely a későbbi közvetlen szerkezeti vizsgálatok fényében lényegében helytállónak bizonyult.

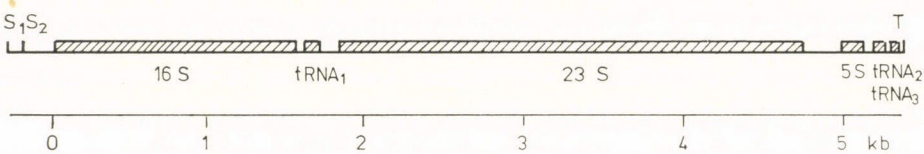
A hetvenes évek szenzációs eredményei: a DNS-t meghatározott nukleotidsorrendű helyeken bontó restrikciós endonukleáz enzimek felfedezése (21), a génsebészet (in vitro DNS rekombináció, DNS klónozás) technikájának kialakulása (2, 7), valamint a gyors DNS szekvencia-meghatározási módszerek kidolgozása (13, 20) lehetővé tették elvben bármely kiszemelt DNS-szakasz izolálását és teljes szerkezetének megállapítását. Így esetről esetre, teljes egyéni bonyolultságában tanulmányozható a génműködés, szabályozás és a nukleinsavszerkezet közötti összefüggés. Természetesen a feladat általános elvi megoldhatósága nem jelenti azt, hogy könnyű és gyors válaszokat kaphatunk a feltett kérdésekre. Az eddig analizált esetek száma még kevés, nem elegendő a széles körű általánosításhoz. Minden új kísérleti rendszer új, sokszor meglepő vonásokkal gazdagítja az eddig még elég hiányos képet.

A következőkben a bevezetőkben mondottakat saját kísérleti munkánk eredményeinek ismertetésével szeretném alátámasztani.

A munkacsoportunkban évek óta vizsgált kísérleti rendszer: a bakteriális riboszomális RNS-t kódoló gének, három ok miatt látszottak különösen vonzó objektumnak az ilyen típusú vizsgálat számára.

1. Ezek a bakteriális genom legaktívabban működő, legnagyobb frekvenciával átírt génjei, amelyek működése többirányú bonyolult szabályozás alatt áll.
2. A szabályozás kizárólag génszinten történhet, mert az átírási termék, az RNS, nem íródik át fehérjévé, transzláció nincs.
3. Mivel az rRNS-t kódoló gének redundánsak (több példányban fordulnak elő a genomban) és működésük létfontosságú, genetikai eszközökkel egyáltalán nem vizsgálhatók.

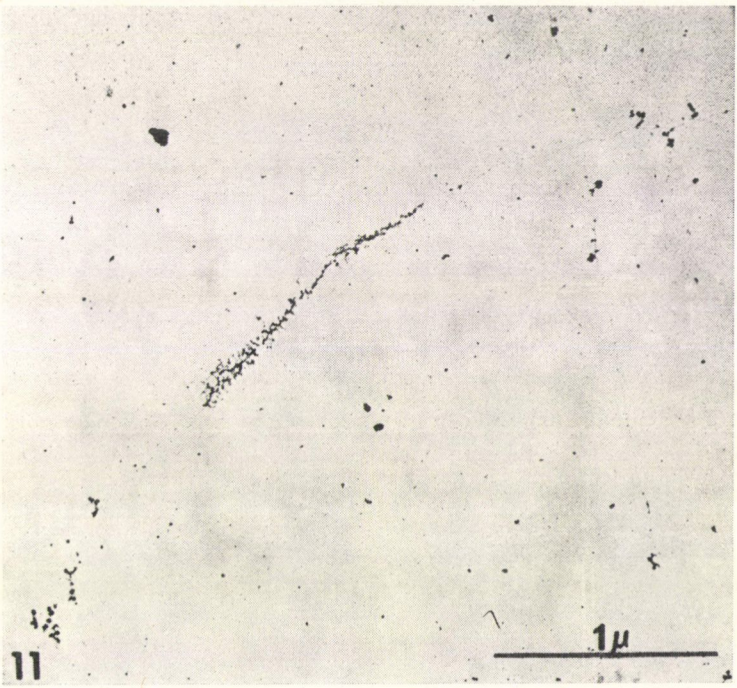
Fenti okok miatt úgy véltük, hogy e rendszer elemzése az új technikák által kínált lehetőségek teljes kihasználásával, új vonásokkal gazdagíthatja a nukleinsavszerkezet és génműködés összefüggéseiről kialakuló képet.



1. ábra. Az rRNS-t kódoló gén (operon). Satírozva az érett rRNS és tRNS molekulákat kódoló szakaszok

Munkánk indulásakor tudtuk, hogy a három különböző riboszomális RNS-t egy nagy gén (egyes szerzők szerint operon) kódolja, az átírás elsődleges terméke egy 30 S ülepedési állandójú, több mint 5 kilobázis hosszúságú RNS, amely számos közbenső lépésen keresztül, többszörös lánchasítással alakul át érett, 16S (kb. 1500 nukleotid), 23S (kb. 3000 nukleotid) és 5S (120 nukleotid) rRNS molekulákká (15). Mivel az érési reakciók már az átírás közben megkezdődnek, normális körülmények között a teljes hosszúságú prekurzor nem fordul elő a sejtben. Egy rRNS gén (operon) sematikus szerkezetét mutatja az 1. ábra, a kép figyelembe veszi azt a nemrég megismert tényt, hogy a három riboszomális RNS-en kívül a prekurzor tartalmaz 2—4 transzfer RNS molekulát is (14). Már említettük, hogy az ismertetett szerkezetű rRNS gén redundáns, több, egymáshoz hasonló vagy azonos kópiában fordul elő a genomban. E gének egymástól izoláltan helyezkednek el, számukat 5—10 közötti értékre becsülték (22). Az átírás intenzitását elsősorban a növekedési ráta szabályozza. Exponenciálisan növekvő sejtben a genom nem egészen 1 %-át kitevő rRNS géneken folyik az összes transzkripció 50—70 %-a (18). Kiszámítható, hogy maximális növekedési sebességnél a riboszómaszintézis igényeinek fedezésére az rRNS géneknek a fizikailag egyáltalán lehetséges maximális kapacitással kell működniük. Ez annyit jelent, hogy — mint a 2. ábrán látható elektronmikroszkópos felvétel mutatja — a polimeráz molekulák sűrűn egymás után követik egymást a transzkripció közben, jóval sűrűbben mint más, fehérjéket kódoló géneken.

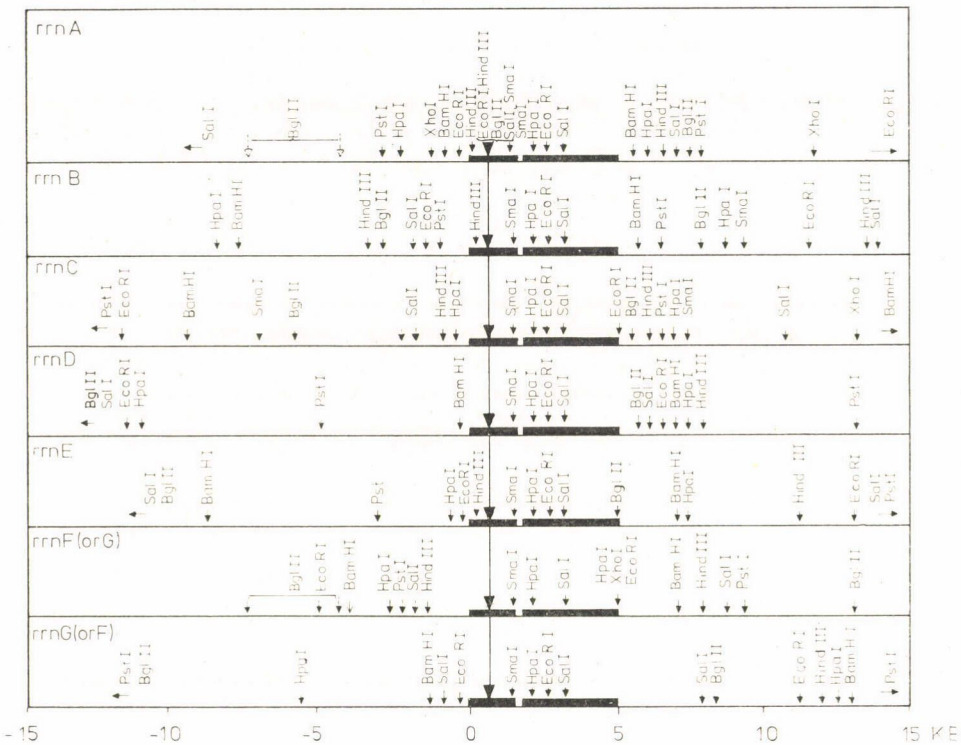
Kiinduló pontunk tehát az az alapkérdés volt: a szabályozó régió (promoter) milyen sajátságai magyarázzák az rRNS gének extrém magas átírási intenzitását. Munkánk első fázisában, lényegében hagyományos módszerekkel vizsgáltuk teljes bakteriális DNS-en az rRNS gének transzkripcióját, illetve az RNS-polimeráz enzim kötődését e génekhez (23, 24, 25). Eredményeink magyarázatára azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy az rRNS gének promoter régiói összetett struktúrák, amelyek génenként 4—5 RNS-polimeráz molekulát tudnak megkötni rajtkész állapotban. Ez a raktározó kapacitás



2. ábra. A működő rRNS gén elektronmikroszkópos képe (HAMAKALO és MILLER nyomán)

biztosítja, hogy az átírás folyamatos legyen; amint egy polimeráz molekula továbbhaladt, helyét a startponton azonnal elfoglalhatja az ugrásra készen álló következő. Azt is feltételeztük, hogy a raktározott polimeráz molekulák közül egynek — valószínűleg az elsőnek — különösen erős a kötése és ez az erősen kötött polimeráz mintegy védi az egész régiót. Bár ez a modell jól egyezett összes megfigyeléseinkkel és az irodalmi adatok döntő többségével, közvetlen igazolását (vagy cáfolatát) csak az új technikák felhasználásával remélhettük. Célul tűztük ki tehát egy vagy több ilyen DNS-szakasz klónozását, teljes nukleotidsorrendjének meghatározását és a kötési helyek pontos megállapítását elektronmikroszkópos vizsgálatokkal. Ennek előfeltétele az

volt, hogy megállapítsuk az rRNS gének pontos számát, elhelyezkedését és közvetlen környezetük fizikai térképét. A restrikciós endonukleázok egy újszerű felhasználásával megállapítottuk, hogy az *Escherichia coli* genomjában *hét* rRNS gén van, majd e technika továbbfejlesztésével sikerült feltérképez-

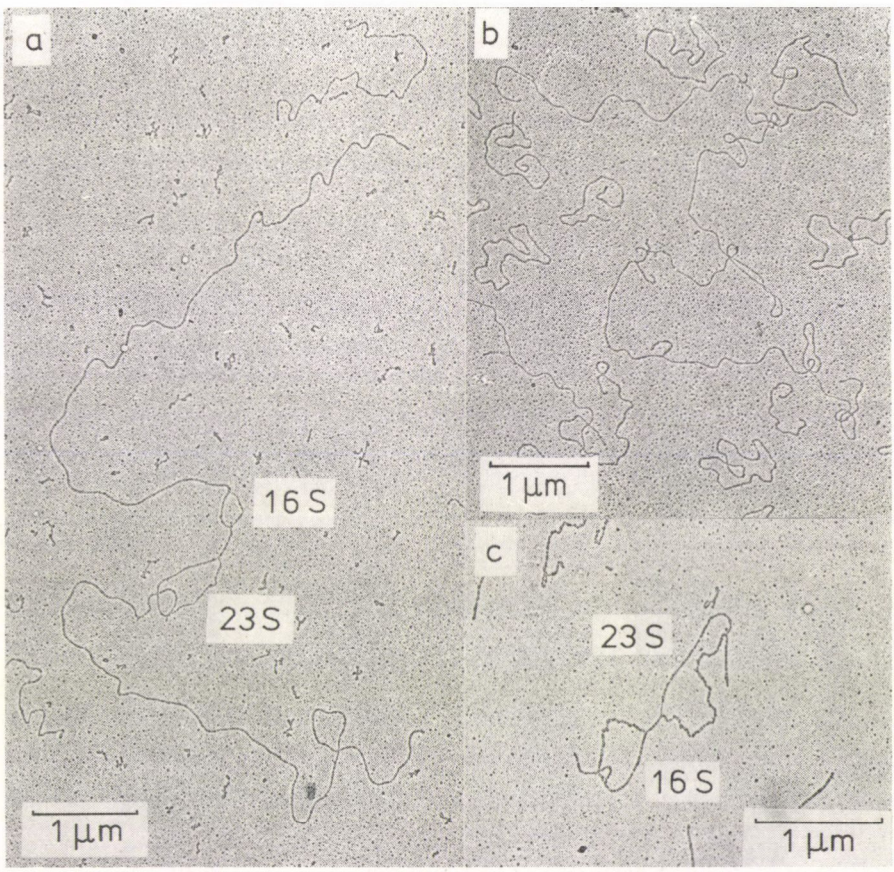


3. ábra. A hét rRNS gén és közvetlen környezetük fizikai térképe. A vastag fekete vonal az érett 16S és 23S rRNS-t kódoló szakasz. A nyilak az egyes restrikciós enzimek hasítóhelyeit jelzik, a föléjük írt szimbólumok az enzimek konvencionális rövidítései. A középső függőleges vonal egy olyan — mind a hét génben előforduló — rövid szakaszt jelez, ahol a jelzett öt enzimnek van hasítóhelye

nünk mind a hét rRNS gént és közvetlen környezetét (1, 10). A térkép, amely a 3. ábrán látható, biztos tájékozódási pontot kínált a részletesebb szerkezeti és funkcionális vizsgálat számára.

Mint ismeretes, a DNS-klónozási technika (génsebészet) segítségével egy adott DNS-szakasz áthelyezhető egy másik replikálódó DNS-molekulába (vektorba), amely megfelelő gazdasejtben nagy mennyiségben szaporítható. Ilymódon a vizsgálandó DNS-szakasz tisztán előállítható milligrammos nagyságrendű mennyiségben. E módszer felhasználásával sikerült az egyik rRNS

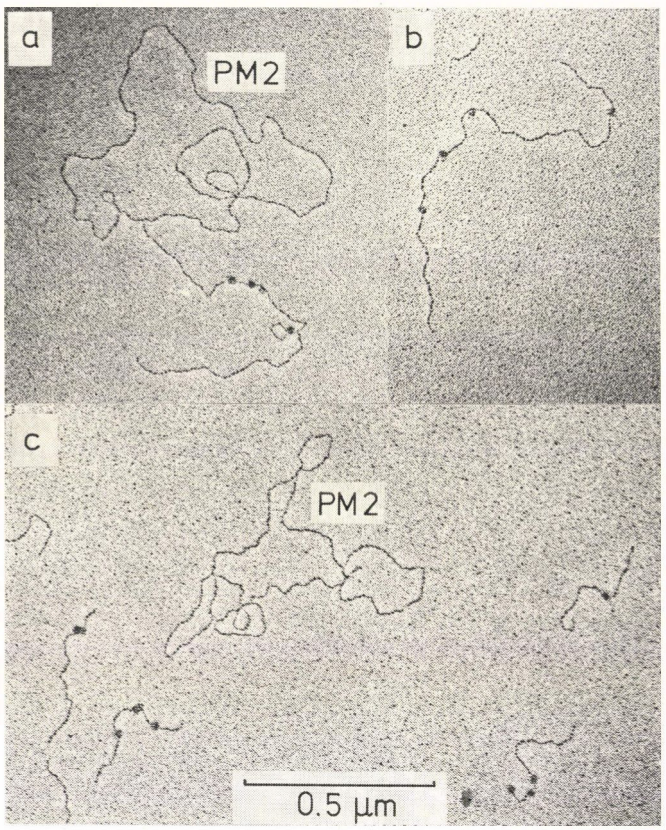
gént (rrnB) először egy transzdukáló fágból kiindulva (9), majd ugyanezt a gént a bakteriális genomból kiindulva klónoznunk (1). A klónozott gént és környezetét tovább térképeztük más restrickiós enzimek felhasználásával, egészen addig a felbontásig, amely a teljes nukleotidsorrend megállapítását lehetővé teszi.



4. ábra. rRNS géneket tartalmazó DNS fragmentumok elektronmikroszkópos vizsgálata. a) és c) rRNS—DNS heteroduplexek (úgynevezett R-loopok) b) rRNS transzkripció

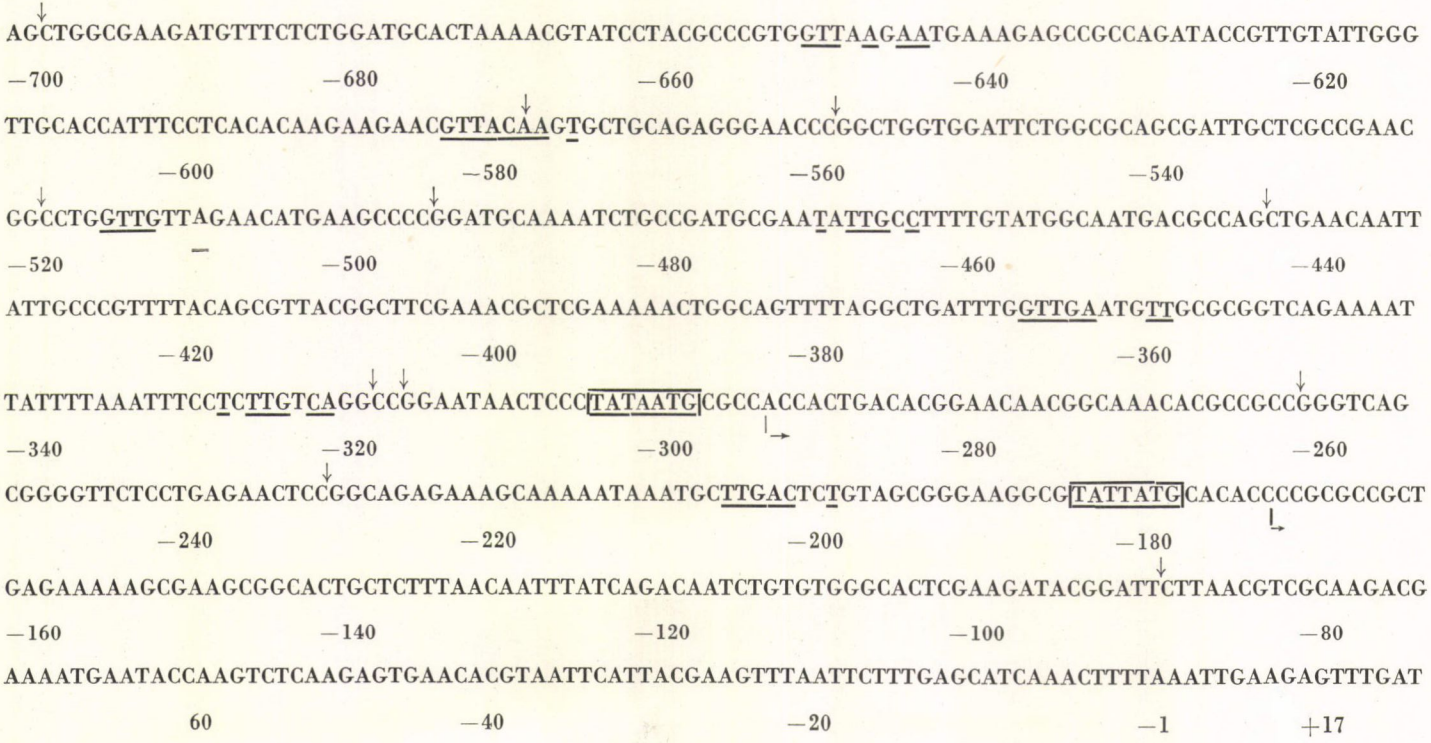
A klónozott DNS szakaszon elektronmikroszkópos módszerrel pontosan lokalizáltuk az érett rRNS molekuláknak megfelelő szakaszok helyét, feltérképeztük a transzkripció startpontjait és megállapítottuk az RNS-polimeráz kötési helyeit (4. és 5. ábra). Ezeket a vizsgálatokat kiegészítettük biokémiai vizsgálatokkal, kisebb DNS-fragmentumok RNS-polimerázkötő képességének meghatározásával (11). Végül a MAXAM—GILBERT-féle módszerrel

meghatároztuk a promoter régió nukleotidsorrendjét (3). Az érett 16S molekulát kódoló génszakaszt megelőző promoter régió 700 bázispárnyi részének szekvenciáját a 6. ábra mutatja. Az ezt megelőző kb. 600 bázispárnyi szakasz szekvenciameghatározása jelenleg még nem fejeződött be.

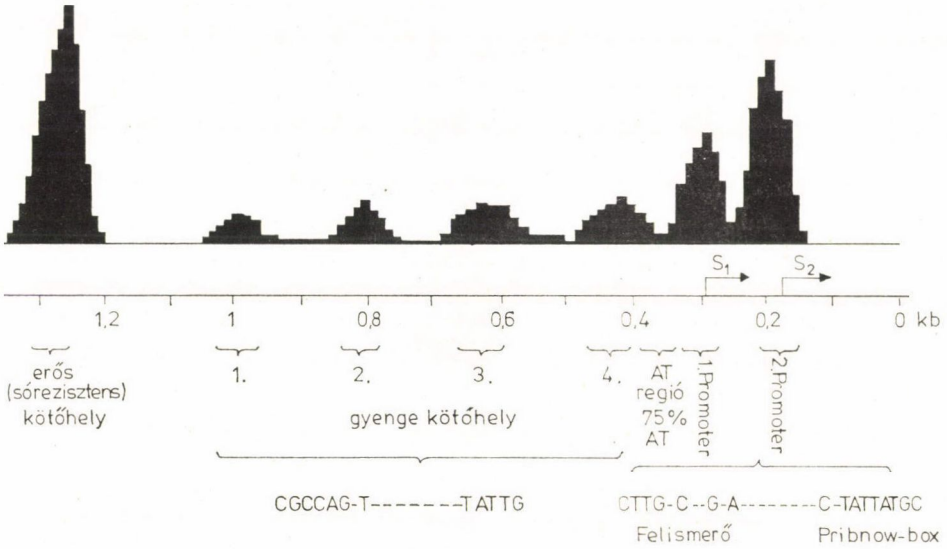


5. ábra. RNS-polimeráz kötése az rRNS géneket tartalmazó DNS fragmentumokhoz. A PM2 fág a DNS molsúlykalibrációhoz szükséges. Mindhárom képen látható a többszörös polimerázkötés

Mindezen vizsgálatok alapján a következő kép bontakozik ki a klónozott rrnB gén szabályozó régiójáról (7. ábra). Ha az érett 16S rRNS molekulát kódoló szakasz kezdetét tekintjük vonatkoztatási alapnak, akkor e pontnál kb. 200, illetve 300 bázispárral előbb találjuk azt a két helyet, ahol az átírás megkezdődik. A génnek két iniciációs pontja van, egymástól kb. 100 bázispárnyi távolságra, az átírás primér terméke tehát két különböző hosszúságú molekula. Az elsődleges átírási termék további feldolgozása során ez a különbség természetesen eltűnik. Mindkét iniciációs pont előtt olyan szekvenciák



6. ábra. Az rrnB gén promoter régiójának nukleotidsorrendje. A nukleotidok számozásának kiindulópontja az érett 16S rRNS-t kódoló szakasz kezdete. A nyilak a szekvenciameghatározáskor felhasznált enzimek hasítóhelyeit jelzik. A két megtört nyíl az rRNS lánc iniciációs pontját. A promoterekre jellemző úgynevezett „Pribnow-box" be van keretezve



7. ábra. Az rrnB gén promoterrégiójának sematikus rajza. Legfelül látható a nagyszámú elektronmikroszkópos felvétel kiértékelésével nyert hisztogram a polimeráz-kötésről, alatta a szekvencia releváns elemei

találhatók, amelyek általában jellemzőek az ismert szerkezetű promoterekre (19), tehát kb. 10 bp-vel az iniciációs pont előtt az úgynevezett Pribnow-box (TATAATG, illetve TATTATG) kb. 35 bp-ral előbb pedig az ún. felismerő szekvencia (TTGTCA, illetve TTGACT). E két promotert más szerzők is felismerték, egyéb rrn géneknél is (5, 6, 28). A két promoter előtt egy 60—70 bp hosszúságú erősen AT-gazdag régió foglal helyet (kb. 70 % AT). Ez előtt kb. 200 bp-nyi intervallumokban négy gyenge, de elektronmikroszkóposan jól kimutatható polimerázkötőhely található. Ezeken transzkripciót nem indul, közülük eddig kettőnek határoztuk meg a szekvenciáját. Ezek egymáshoz hasonlítanak, de különböznek a valódi promoterektől. Végül: kb. 1300 bázispárral megelőzve a 0 pontot, találunk egy rendkívül erős polimerázkötőhelyet. Itt szintén nem indul transzkripció, de a kötés erősebb mint az „igazi" promotereken.

Ezek az eredmények tehát lényegében megerősítik a kiinduló munkahipotézist, sőt még bonyolultabbá teszik a képet. A két valódi, iniciációra képes promoter előtt van 4 gyenge és egy erős kötőhely. Ezek képesek polimerázt raktározni, és az itt felsorakozó polimeráz molekulák biztosítják, hogy a valódi promoterek (amelyek a szokásos kritériumok szerint tulajdonképpen gyengék), állandóan telítve legyenek és maximális kapacitással dolgozzanak.

Hadd ismételjem el összefoglalásképpen, hogyan született ez a modell. Az in vivo észlelt jelenségek (extrém magas transzkripciós ráta) megértése

céljából in vitro rendszerben végeztünk transzkripciós és kötési kísérleteket, majd az itt nyert eredmények magyarázatára konstruáltunk egy hipotetikus modellt. A korszerű szerkezetvizsgálat módszereivel megállapítottuk a régió szerkezetét, és az egyes in vitro vizsgálható részfunkciókat hozzárendeltük a struktúrához. A megismerési folyamat befejező láncszeme azonban hiányzik: annak igazolása, hogy valóban ezek a struktúrák felelősek az in vivo funkcióért. Ez a bizonyítás rendkívül nehéz, de nem lehetetlen. A következőkben azt tervezzük, hogy a vizsgált régió irányított módosításával, kémiai, illetve biokémiai eszközökkel előállított pontosan definiált mutációkkal olyan új rekombináns klónokat állítunk elő, amelyek működését összehasonlítva a vadtípussal, funkcionális bizonyítékokat nyerhetünk az egyes szerkezeti elemek szerepére vonatkozóan.

Befejezésül szeretném felsorolni azoknak a munkatársaimnak a nevét, akiknek sokéves kemény munkája áll az itt vázlatosan összefoglalt eredmények mögött: Boros Imre, Csordás-Tóth Éva, Kiss Antal, Kiss Ibolya, Sain Béla, Sümegi János és Udvardy Andor.

IRODALOM

1. Boros, I., Kiss, A. és Venetianer, P.: Nucleic Acids Res. **6,** 1817 (1979).
2. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. és Helling, R. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **70,** 3240 (1973).
3. Csordás-Tóth, É., Boros, I. és Venetianer, P.: Nucleic Acids Res. **7,** 2189 (1979).
4. deBoer, H. A., Gilbert, S. F. és Nomura, M.: Cell **17,** 201 (1979).
5. Gilbert, S. F., deBoer, H. A. és Nomura, M.: Cell **17,** 211 (1979).
6. Glaser, G. és Cashel, M.: Cell **16,** 111 (1979).
7. Jackson, D. A., Symons, R. H. és Berg, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **69,** 2904 (1972).
8. Jacob, F. és Monod, J.: J. Mol. Biol. **3,** 318 (1961).
9. Kiss, A., Sain, B., Kiss, I., Boros, I., Udvardy, A. és Venetianer P.: Gene. **4,** 137 (1978).
10. Kiss, A., Sain, B. és Venetianer, P.: FEBS Let. **79,** 77 (1977).
11. Kiss, I., Boros, I., Udvardy, A., Venetianer, P. és Delius, H.: Biochim. Biophys. Acta, 609, 435 (1980).
12. Leder, P. és Nirenberg, M. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **52,** 420 (1964).
13. Maxam, A. és Gilbert, W.: Proc Natl. Acad. Sci. U. S. **74,** 560 (1977).
14. Morgan, E. A., Ikemura, T. és Nomura, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **74,** 2710 (1977).
15. Nikolaev, N., Silengo, L. és Schlessinger, D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **70,** 3361 (1973).
16. Nirenberg, M. W. és Matthäi, J. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **47,** 1588 (1961).;
17. Nishimura, S., Jones, D. S. és Khorana, H. G.: J. Mol. Biol. **13,** 302 (1965).
18. Pettijohn, D. E., Clarkson, K., Kossman, C. R. és Stonington, O. G.: J. Mol. Biol. **52,** 281 (1970).
19. Rosenberg, M. és Court, D.: Anna. Rev. Gen. **13,** 319 (1979).
20. Sanger, F. és Coulson, A. R.: J. Mol. Biol. **94,** 445 (1975).
21. Smith, H. O. és Wilcox, K. W.: J. Mol. Biol. **51,** 379 (1970).
22. Spadari, S. és Ritossa, F.: J. Mol. Biol. **53,** 357 (1970).
23. Sümegi, J., Udvardy, A. és Venetianer, P.: Molec. gen. Genet. **151,** 305 (1977).
24. Udvardy, A, Sümegi, J. és Venetianer, P.: Nature **249,** 548 (1974).
25. Venetianer, P., Sümegi, J. és Udvardy, A.: „Control of ribosome synthesis" Munkasgaard, Copenhagen. 1976. (szerk: Maaloe, O. és Kjeldgaard, N. O.)
26. Watson, J. D. és Crick, F. H. C.: Nature **177,** 964 (1953).
27. Yanofsky, C., Drapeau, G. R., Guest, J. R. és Carlton, B. C.: Proc Natl. Acad. Sci. U. S. **57,** 296 (1967).
28. Young, R. A. és Steitz, J. A.: Cell **17,** 225 (1979).

PONTSZERŰ SÉRÜLÉSEK FÁGOKBAN

RONTÓ GYÖRGYI

Semmelweis OTE, Biofizikai Intézet, Budapest

A jelen beszámoló azoknak az eredményeknek egy részét tartalmazza, amelyeket a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézetében nyertünk — részben együttműködésben — bakteriofágok 254 nm-es *ultraibolya-fény* (UV) és *alkilező szerek* által okozott sérülések vizsgálatában. A kétféle károsító hatás szempontjából bizonyos közös vonásokat szeretnék kiemelni:

a) Mindkét károsodás az emberiség technikai fejlődésével felerősödött kemizáció következményének tekinthető. Az alkilező szerek ui. az élő rendszerek *közvetlen kémiai* károsodását okozzák. A napfény rövidebb hullámhosszúságú komponensei pedig azért jelentenek veszélyt a földi élet számára, mert a légkör kémiai szennyeződése következtében ózontartalom-csökkenés lép fel, tehát az UV-sérülés *közvetett kémiai ártalomként* is jelentkezik (7).

b) Mindkét károsodás kialakulásában fontos szerepet játszik a sejtek genetikus anyaga.

c) Mindkét esetben a strukturális sérülés kis kiterjedésű, legfeljebb néhány nukleotid bázist érint. Ezért nevezzük e sérüléseket a fizikából adaptált névvel „*pontszerű*"-eknek.

Az említett pontszerű sérülések tanulmányozására egyszerű rendszereket, bakteriofágokat alkalmaztunk, amelyek az adott esetben a sejtek, ill. a sejtkromoszómák modelljeiként foghatók föl. Vizsgálataink során főként arra kívánunk választ kapni, hogy a nukleinsavak primér- és magasabbrendű szerkezete milyen hatással van azok sérülékenységére.

A struktúra ismerete tehát problémáink szempontjából döntő. Az 1. táblázat az általunk vizsgált bakteriofágok struktúráját jellemző adatokat mutatja be. A táblázatból kitűnik, hogy választásunk mind a struktúra, mind a funkció szempontjából célzott volt. Egyrészt kis fágokat vizsgáltunk, amelyek esetében mindegyik gén funkciója szükséges a fág aktiválásához, másrészt olyan fágokat, amelyeknek a nukleinsavai a különböző struktúrájuk folytán bizonyos összevetésekre adnak lehetőséget.

A) Részletesebben a T7 fág szupramolekuláris szerkezetével foglalkozom, amelynek felderítésében elért saját legújabb eredményeinket mutatom be (1, 8, 9, 16). A struktúrára vonatkozó információkat sok oldalról igyekeztünk

1. táblázat

Az általunk vizsgált fágok néhány strukturális jellemzője

	MS2	*ΦX174*	*T7*
Átmérő	~ 26 nm	~ 30 nm	~ 61 nm
Alak	gömb	ikozaéder	ikozaéder
Nukleinsav	egyszálú-RNS	egyszálú-DNS	kétszálú-DNS
Nukl.sav-tartalom	~ 30%	~ 25%	~ 50%
Nukl.sav-mólsúly	$\sim 1 \cdot 10^6$	$\sim 1{,}6 \cdot 10^6$	$\sim 26 \cdot 10^6$
Nukl.sav-bázisszám	~ 3600	~ 5400	~ 40 000 pár
Nukl.sav-szekvencia	ismert (1976)	ismert (1977)	részben ismert
Nukl.sav *H-híddal stabilizált:*	*70—80%*	*< 1%*	*100%*
Gének száma	3	9	25—30
Sérthető hely:			
s_d	240	1530	24 000
s_h	140	—	—
s_{hd}	820	—	—

megszerezni. A szerkezeti analízisnél általunk használt módszereket foglalja össze a 2. táblázat. Az 1. ábrán a T7 fág morfológiájára vonatkozó, kisszögű röntgenszórással nyert adataink láthatók.

A 2. ábrán egy lehetséges modellt mutatunk be a T7 fág szupramolekuláris szerveződésére vonatkozólag, amely az összes, a T7 struktúrájára vonatkozó eredményünket és a rendelkezésre álló irodalmi adatokat is felhasználja. A fág belsejében vastag vonal reprezentálja a fág-nukleinsav szuperhelikális elrendeződését. Tapasztalataink szerint a nukleinsavnak a fágfejen belüli állapota kis mértékben eltér az oldatban szokásos *B* konformációtól, és a *B*, valamint a *C* forma között helyezkedik el. A fágfej belsejében lévő sötétebb, gömbalakú tartomány létezését kisszögű neutron-szórás segítségével mutattuk ki, éspedig kontrasztvariációs módszer alkalmazásával, amikor a fehérjék szórása kioltódik. (Az oldatban lévő víz 41 %-át nehézvíz képezte.) Az ábrán jelzett tartományt tehát vagy víz, vagy fehérje tölti ki.

2. táblázat

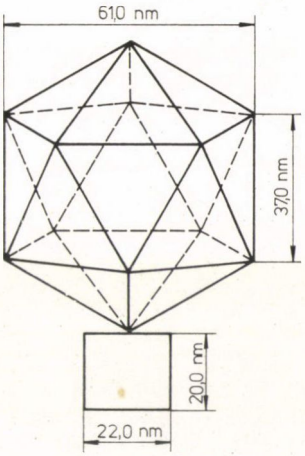
A T7 fág szupramolekuláris szerkezetének vizsgálatára általunk alkalmazott módszerek

OPTIKAI SPEKTROSZKÓPIA:
ultraibolya-abszorpciós,
UV-differencia-,
cirk. dikroizmus*

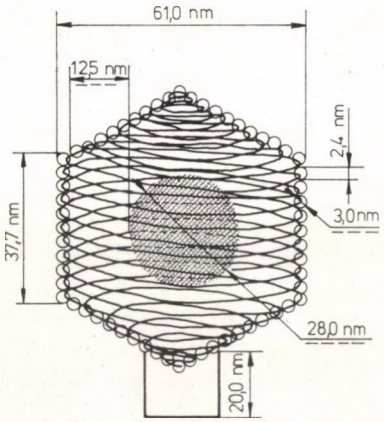
MELTING PROFIL MEGHATÁROZÁS:
ultraibolya-abszorpció,
mikrokalorimetria*
cirk. dikroizmus*

DIFFRAKCIÓS MÓDSZEREK:
kisszögű röntgen-szórás*
kisszögű neutron-

* Együttműködésben alkalmazott módszerek

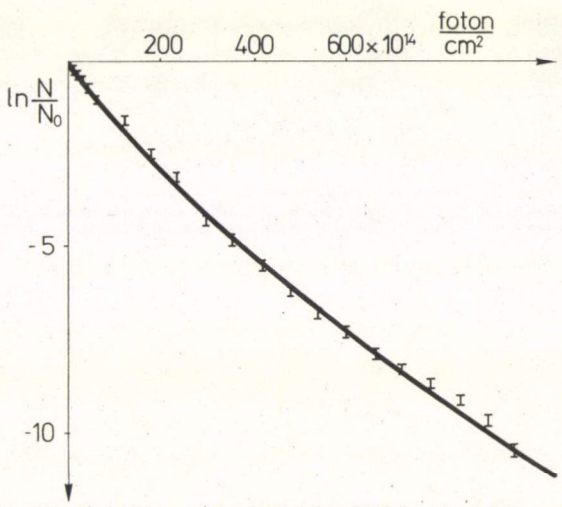


1. ábra. A T7 fág geometriája. Kisszögű röntgenszórással nyert adatok, a mérési hiba kb. 1%



2. ábra. A T7 fág szupramolekuláris szerkezetének egy lehetséges modellje. A folytonosan aláhúzott adatok hibája ~1%, a szaggatottan aláhúzottaké ~10%. (Ez utóbbiak kisszögű neutronszórással nyert adatok)

B) Az UV-inaktivációval kapcsolatos eredményeink esetében mindig a biológiai aktivitás csökkenését követtük, és dózishatásgörbéket határoztunk meg (13, 14, 18). Példaként az MS2 fág UV-inaktivációs dózishatásgörbéjét mutatja be a 3. ábra. A vízszintes tengelyen az 1 cm^2 felületre beeső fotonszámot, a függőlegesre pedig az ún. túlélési hányados természetes logarit-



3. ábra. Az MS2 fág UV ($\lambda = 254$ nm) inaktivációs dózishatásgörbéje, a tarfoltképzés inaktivációját *E. coli* C 3000 gazdasejteken határoztuk meg; egy-egy mérési pont átlagosan 10—10 ezer leszámlált tarfolt átlagából adódik

musát mértük fel. A bemutatott görbe a fotonok által hátrahagyott sérülési állapotokat tükrözi, ui. a rendszerben semmiféle enzimatikus reaktiváció nincs. — Hasonló dózishatásgörbét a többi vizsgált fág esetében is meghatároztunk, ezek minden esetben a biológiai inaktiváció kinetikáját jellemzik.

C) A dózishatásgörbék értelmezésére az irodalomban rendelkezésre álló fotokémiai (fotofizikai) adatok (23) és bizonyos racionális feltevések segítségével sugárkinetikai modellt szerkesztettünk. A modellalkotással kapcsolatban megemlítem, hogy a radiokémiai (fotokémiai) eredményeket néhány kJ/m²-től néhányszor 10 kJ/m² beeső dózis esetén szokás nyerni, ezzel szemben az ún. biológiailag érdekes tartomány, amelyben inaktivációs görbéinket meghatároztuk, ennél kb. két nagyságrenddel kisebb dózisokat jelent. A sugárkinetikai modell megkonstruálásánál ezért különösen szem előtt kellett tartanunk a lényeges folyamatokat, azaz ki kellett választanunk a legvalószínűbb fotoproduktumokat. Az adott esetben elegendő volt csupán a nukleinsavak sérülését tekintetbe venni, és azokban az egyik fajta nukleotid bázisból, a pirimidinekből keletkezett produktumok, a hidrátok és dimérek keletkezését követtük. A nukleinsavakban ún. sérthető helyeket különböztettünk meg, amelyeket — tekintettel a kis beeső dózisra — egymástól függetleneknek tekintettünk. A lehetséges sérthető helyek típusait és azok sérüléseit a 4. ábra mutatja (21). Az *a* típusú sérthető hely csak irreverzibilis, a *b* típusú csak reverzibilis, a *c* típusú pedig mindkét fajta sérülést szenvedhet. Az irreverzibilis sérülésnek a hidrát-, a reverzibilis sérülésnek pedig a dimérképződés felel meg, tehát az utóbbi típus tükrözi azt a tapasztalatot, hogy a dimér UV-foton hatására vissza is alakulhat. Az *a* típusú sérthető hely sérülési kinetikáját az alábbi egyszerű differenciálegyenlet jellemzi:

$$d\pi_h = -\sigma_h \pi_h \Phi \, dt, \tag{1}$$

ahol az időtől (t) függő π_h annak a valószínűsége, hogy egy hidratálható hely a t időpontban ép. E valószínűség a Φ beeső fotonfluxus hatására $d\pi_h$-val változik meg a dt idő alatt. Az arányossági tényező σ_h.

A *b* típusú, azaz reverzibilis sérthető hely esetén a sérülési kinetika az alábbiakban adható meg:

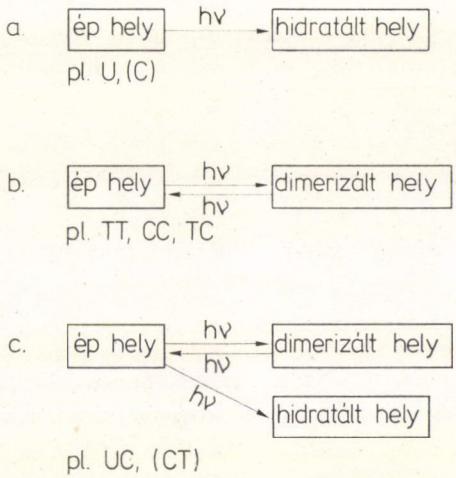
$$d\pi_d = -\sigma_d \Phi \, dt + \sigma_r (1-\pi_d) \Phi \, dt, \tag{2}$$

ahol π_d annak a valószínűsége, hogy egy dimerizálható hely a t időpontban ép. Az összefüggés jobb oldalán lévő negatív tag azt fejezi ki, hogy e valószínűség a dt idő alatt a Φ fotonfluxus hatására csökken, míg a pozitív tag a reverzió hatását veszi tekintetbe. A σ_d, ill. σ_r a dimerizációs, ill. reverziós hatáskeresztmetszetek.

A 4. ábrán *c* típusúnak jelölt sérthető hely sérülési kinetikája az alábbiakban jellemezhető.

$$d\pi_{hd} = [-\sigma_h \pi_{hd} - \sigma_d \pi_{hd} + \sigma_r(1 - \pi_{hd} - \sigma_h \int_0^t \pi_{hd} \Phi \, dt)] \, \Phi \, dt \, . \qquad (3)$$

Itt a π_{hd} annak a valószínűségét jelöli, hogy egy ilyen, mindkét módon sérülhető hely a t időpontban ép. E helyek sérülése dimerizáció és hidratáció révén lehetséges: ezt veszi tekintetbe a jobb oldal két negatív előjelű tagja. A pozitív tag pedig a reverzibilis sérülés reverziójára vonatkozik.



4. ábra. A nukleinsavak UV-fénnyel sérthető helyeinek lehetséges típusai. *a)* irreverzibilisen *b)* reverzibilisen, *c)* mindkét módon sérthető hely

A σ_d, σ_r és σ_h mennyiségekkel kapcsolatban megjegyzem a következőket: ezek egyetlen sérthető hely dimerizációs, reverziós, ill. hidratációs hatáskeresztmetszeteit jelölik, és azt mutatják, hogy egy sérthető hely mekkora felületet mutat egyetlen beeső foton felé a kérdéses fotokémiai átalakulás szempontjából. A hatáskeresztmetszet a fizikában használatos fogalom, de úgy véljük, eredményesen alkalmazható a nukleinsavak sérülésének, pontosabban ezeken belül egyetlen sérthető hely sérülésének jellemzésében is.

Kérdés, hogy a fenti sérülési lehetőségeket figyelembe véve hogyan változik a beeső dózis függvényében a fotokémiailag ép nukleinsav-molekulák száma.

Az általános eset az, hogy egy fágban mindhárom fajta sérthető hely előfordul. Ha a hidratáció által sérthető helyek száma s_h, a dimerizáció által sérthetőké s_d, a mindkét módon sérthető helyeké pedig s_{hd}, akkor a kérdésre a választ, azaz annak a valószínűségét, hogy egy fágban Φ fotonfluxus t ideig tartó hatása után minden sérthető hely ép, a következő összefüggés adja:

$$\frac{N}{N_0} = \pi_h^{s_h} \cdot \pi_d^{s_d} \cdot \pi_{hd}^{s_{hd}} \, . \qquad (4)$$

Dózishatásgörbéink viszont arra nézve adnak tapasztalati összefüggést, hogy a beeső dózis függvényében hogyan változik a biológiailag aktív fágok száma. Ha feltételezzük, hogy egyetlen fotokémiai sérülés inaktivációt okoz, akkor a (4) elméleti összefüggésnek egyúttal a dózishatásgörbéket is le kell írnia. A kifejezés bal oldala annak a valószínűsége, hogy egy fág aktív állapotban van.

A (4) összefüggésben ismeretlenként az s és a σ paraméterek szerepelnek. Az s értékekkel kapcsolatban azonban jó helyzetben vagyunk, mivel azokat az MS2 és ΦX174 fágok esetében közvetlenül le tudjuk számolni, míg a T7 esetében számukat ésszerű feltevés segítségével becsülhetjük meg. Ezeket a primér struktúrával összefüggő adatokat az 1. táblázat utolsó részében tüntettük fel. A σ hatáskeresztmetszetek értékét a tapasztalati görbéhez való illesztés révén határoztuk meg. A nyert eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

D) A táblázattal kapcsolatban néhány eredményre hívom fel a figyelmet:

1. Az egy sérthető helyre vonatkozó hatáskeresztmetszetek olyan átlagértékek, amelyek sem a nukleinsav primér szerkezetétől, sem méretétől nem függnek, hanem a magasabbrendű struktúrával kapcsolatosak. Így lehetővé teszik az objektumok sugárérzékenységének összehasonlítását, tehát segítséget nyújtanak a nukleinsav szerkezete és a szerkezet sérülékenysége közti kapcsolat vizsgálatában. Sőt, az összehasonlítás nukleotid báziskristályra is kiterjeszthető. Ilyen adatokat is meghatároztunk (6, 11, 12), ezeket ugyancsak tartalmazza a 3. táblázat.

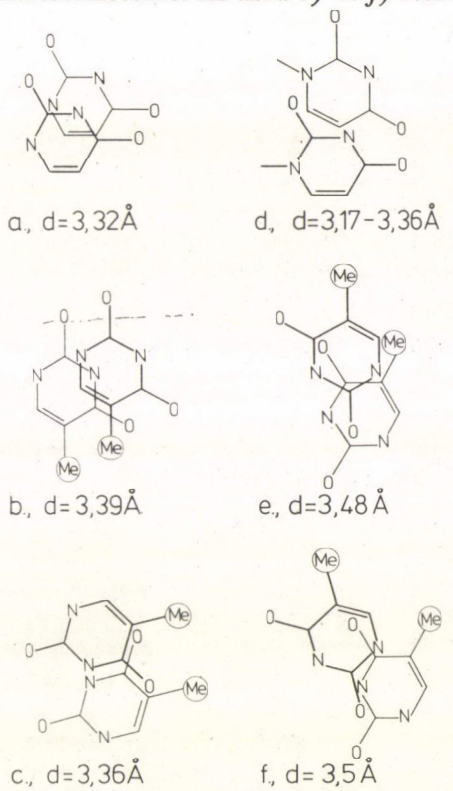
2. Vessük össze a dimerizációs hatáskeresztmetszeteket. A táblázatból kitűnik, hogy a kettős helikális struktúrába rendezett T7 és MS2 fág közel azonos, a ΦX174 ennél 10-szer érzékenyebb, és az uracil, valamint 5-amino-uracil kristály még ennél is érzékenyebb az UV-fényre. (E helyen említem meg, hogy egy pirimidgyűrű geometriai keresztmetszete 10^{-15} cm^2.) A magya-

3. táblázat

Vizsgálati objektumainkban lezajló radiokémiai folyamatokat jellemző hatáskeresztmetszetek

Vizsgált objektum	σ_h (cm^2)	σ_d (cm^2)	σ_r (cm^2)
fágok:			
T7	—	$\sim 10^{-19}$	$\sim 10^{-16}$
MS2	$\sim 10^{-19}$	$\sim 10^{-19}$	$\sim 10^{-17}$
ΦX174	—	$\sim 10^{-18}$	$\sim 10^{-16}$
kristályok:			
uracil	—	$\sim 10^{-17}$	$\sim 10^{-17}$
timin-anhidrát	—	$\sim 10^{-19}$	—
6-metil-uracil	—	$\sim 10^{-18}$	—
5-amino-uracil	—	$\sim 10^{-17}$	—
citozin-anhidrát	—	$\sim 10^{-20}$	—

rázat érdekében tekintsük meg az 5. ábrát. Az *a)* részlet az uracil-kristályt, a *d)* az RNS-nek két egymás fölött elhelyezkedő uracilt tartalmazó részletét szemlélteti. Bár a bázisok közti távolság kb. azonos, (ezt adják a d-értékek), a kettős vonallal jelölt sérülékeny kötések pozíciója más. Nyilván ezzel függ össze az eltérő hatáskeresztmetszet. Az ábra *e)* és *f)* részei a DNS B és C kon-



5. ábra. Pirimidin-báziskristályok és különféle nukleinsavak sérülékeny struktúrái: *a)* uracil-kristály, *b)* timin-monohidrát, *c)* timin-anhidrát kristály geometriai elrendeződése, *d)* RNS-molekulában levő két uracil, *e)* B-konformációjú és *f)* C-konformációjú DNS-ben levő timin-bázisok geometriai elrendeződése. (A sérülékeny 5—6-os kötéseket kettős vonal jelzi)

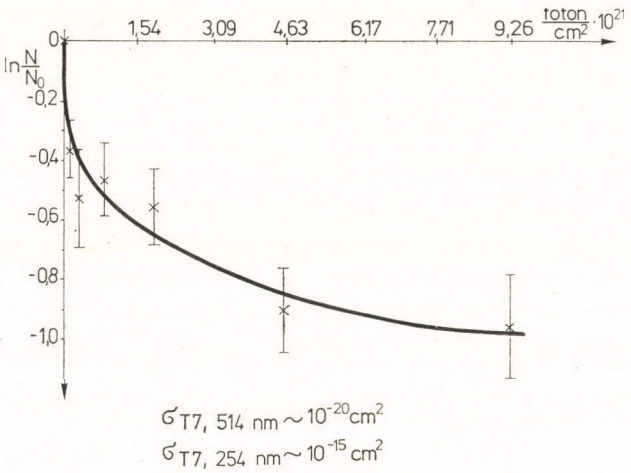
formációjában mutatják a pirimidinek (timinek) helyzetét; e két forma között áll a T7 fágban a DNS konformációja, és ehhez a helyzethez hasonlítható a timinanhidrát *(c)* kristályszerkezete. Ezt tükrözik a hatáskeresztmetszetek is.

3. Az MS2 esetében a hidratációs és dimerizációs hatáskeresztmetszetek kb. azonosak, ami azt mutatja, hogy a kétféle sérthető hely egyformán sérülékeny (15).

4. A hatáskeresztmetszetek segítségével ugyancsak összehasonlíthatók az irodalomban található radiokémiai adatok (2, 4, 5, 17, 22) és a saját funkcionális úton nyert adataink. E hatáskeresztmetszetek azonos nagyságrendűek, ami azt mutatja, hogy modellalkotásunk során helyesen jártunk el, amikor

feltételeztük, hogy az UV-fény hatására létrejövő minden egyes strukturális sérülés funkcionális sérülést okoz. E megállapításból következik, hogy T7 fág esetében a fentiek szerint 40 ezer bázispárban egyetlen pontszerű sérülés (amely két bázist érint) módszerünk segítségével már detektálható. A T7 fág inaktivációs kinetikájának meghatározása ezáltal olyan eljárást jelent kezünkben, amely a fágban keletkezett sérülések érzékeny indikátora.

Ultraibolya fénnyel nyert tapasztalatainkat felhasználtuk más fotonenergiák által kiváltott sérülések vizsgálatában is (10). A 6. ábrán a T7 fág



6. ábra. A T7 fág látható ($\lambda = 514$ nm) fény által okozott inaktivációs dózishatásgörbéje. Az egységnyi felületre beeső fotonszám függvényében ábrázoltuk a túlélők hányadának logaritmusát. Az aktívan maradt fágok számát *E. coli* B/r (vagy a bemutatott inaktivációval egyező eredményt adó *E. coli* B uvrA) gazdasejteken határoztuk meg. Egy-egy mérési pont 5000 leszámlált tarfolt átlagából adódik

zöld ($\lambda = 514$ nm) fény hatására létrejövő inaktivációját mutatjuk be. Mindennapi körülmények között a zöld fényt a T7 fág mérhető mértékben nem nyeli el. A jelen esetben azonban nagy teljesítménysűrűséget emittáló fényforrást, argonionlézert használtunk. Ennek megfelelően a vízszintes tengelyen feltüntetett beeső fotonszám 5—7 nagyságrenddel nagyobb, mint az UV dózishatásgörbék esetén. Ekkora fotonsűrűség a T7 fág esetében már megfigyelhető inaktivációt okoz. Megjegyzem, hogy a teljes fágra vonatkozó sérülési hatáskeresztmetszet ebben az esetben 5 nagyságrenddel kisebb, mint az ultraibolyasérülés esetében. (A 6. ábrán ezeket az értékeket is feltüntettük.) E tapasztalatunk egyébként felhívja a figyelmet a lézerfelhasználás munka-egészségügyi vonatkozásaira is.

E) A közvetlen kémiai ártalmak közül részletesebben a nitrozometilureával (NMU) foglalkoztunk (19). Az NMU esetében is arra törekedtünk, hogy a tapasztalati eredményt értelmezzük, éspedig úgy, hogy az értelmezés lehetővé tegye az inaktivációs dózishatásgörbe kvantitatív leírását.

Az NMU sérüléssel kapcsolatban néhány gondolatot emelek ki, amiket részben a modellalkotásnál vettünk figyelembe, részben pedig a modell alapján mint következményeket nyertünk.

1. Az NMU-sérülésben a guanin 7 N-jének reakcióját vettük figyelembe mint major produktumot.

2. A sérülés — mechanizmusát tekintve — bonyolultabb mint az UV-sérülés, mivel a sérthető hely és a kémiai anyag közti kölcsönhatás első lépése után a sérülés spontán tovább mélyül.

3. Modellünk alapján arra a konzekvenciára jutottunk (20, 21), hogy a sérthető helyek a kémiai reakció szempontjából azonosak, de a biológiai következmény tekintetében egymástól eltérnek: a sérthető helyeknek ui. csupán 10—30%-a olyan, amelyiknél már a kémiai reakció első lépése, az alkilezés okozza a fág inaktivációját, míg a további helyek esetében a mélyebb károsodás vezet fáginaktivációhoz.

4. Az ultraibolya és az NMU-sérüléssel kapcsolatban vázolt tapasztalataink összekapcsolása révén kidolgoztunk egy in vitro szűrőtesztet kémiai anyagok károsító hatásának kvantitatív jellemzésére, ami gyakorlati szempontból is érdekes lehet (21). A teszt segítségével lehetőség nyilik arra, hogy a kemikáliákat mutációt okozó hatásuk erőssége alapján sorba állítsuk, és ennek segítségével bármely újabb kemikáliának a sorban elfoglalt helye alapján következtethessünk az alkalmazásából származó kockázat mértékére is.

IRODALOM

1. Agamalian, M. M., Drabkin, G. M., Dobzsikov, Yu. M. Ljvov, Rontó, Gy.: Izd. Lijaf. **538,** 1—14 (1979).
2. Bräutigam, A. R., Sauerbier, W.: J. Virology **13,** 1110—1117 (1974).
3. Caillet-Fauquet, P., Defais, M., Radman, M.: J. Mol. Biol. **117,** 95—112 (1977).
4. Cerutti, P. E., Miller, N., Pleiss, M. G., Remsen, J. F., Ramsay, W. J.: Proc. Natl. Acad, Sci. **64,** 731—738 (1969).
5. Cornelis, J. J.: J. Mol. Biol. **117,** 111—112 (1977).
6. Dobos, S., Fidy, J., Laczkó, Z.: J. Mol. Struct **61,** 251—254 (1980).
7. Fabian, P.: Naturwiss. **67,** 109—120 (1980).
8. Fejgin, L. A., Rontó, Gy. et al.: Dokl. Akad. Nauk in press.
9. Fekete, A., Rontó, Gy.: Studia biophys. in prep.
10. Fenyő, M., Rontó, Gy., Kertész, I.: Laser u. Elektrooptik **12,** 27—28 (1980.)
11. Fidy, J., Gáspár, S., Raksányi, K.: Acta Biochim. Biophys. Hung. in press.
12. Fidy, J., Raksányi, K.: Studia biophys. **71,** 137—138 (1978).
13. Karczag, A., Rontó, Gy., Tarján, I.: Acta Biochim. Biophys. Hung. **7,** 173—177 (1972).
14. Karczag, A., Rontó, Gy., Tarján I.: Studia biophys **33,** 120—130 (1972).
15. Karczag, A., Rontó, Gy., Tarján, I.: Acta Biochim. Biophys. Hung. **8,** 281—286 (1973).
16. Monaselidze, D. R., Chanchalasvili, Z. I., Mgeladze, G. N., Madjagaladze, G. V., Fekete, A., Rontó, Gy.: Studia biophys. **70,** 213—220 (1978).
17. Remsen, J. F., Mattern, M., Miller, N., Cerutti, P. A.: Biochemistry **10,** 524—529 (1971).
18. Rontó, Gy., Sarkadi, K., Tarján, I.: Strahlentherapie **134,** 151—157 (1967).
19. Rontó, Gy., Smotryaeva, M., Kruglyakova, K., Emanuel, N., Tarján, I.: Acta Biochim. Biophys. Hung. **10,** 115—122 (1975).
20. Rontó, Gy., Sugár, I., Tarján I.: Proc 14 Ann. Meeting of ESRB., Jülich (1978).
21. Rontó, Gy.: Bakteriofágok és részrendszereik pontszerű sérülése. Doktori értekezés (1979).
22. Rosen, Ph.: Biophys. Journ. **15,** 194 (1975).
23. Wang, S. Y. (ed. by): Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids Vol I—II. Acad. Press. New York, London (1976).

MEMBRÁNHOZ KÖTÖTT FEHÉRJÉK MŰKÖDÉSE

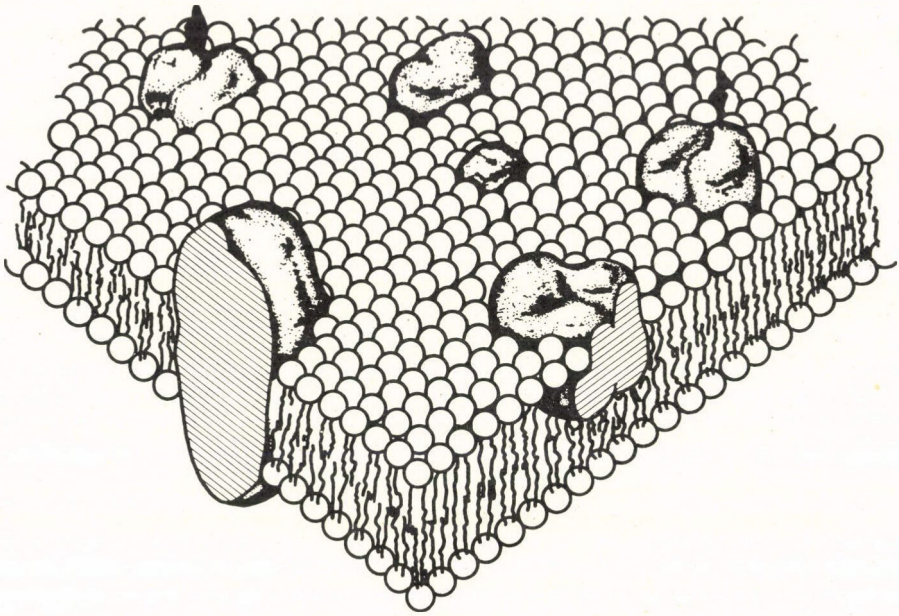
KESZTHELYI LAJOS

Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet és Központi Fizikai Kutató Intézet, Budapest

1. Bevezetés

A sejtek életjelenségeiben különlegesen fontos szerepet töltenek be a sejteket bezáró és a sejtek belső alkotórészeit határoló membránok. Egyes vélemények szerint (pl. LURIA [11]), a gének és a génműködés tanulmányozásán túlmenően nincsen olyan biológiai probléma, amely nagyobb kihívást jelentene a kutatók számára, mint a membránok különböző és titokzatosnak látszó tulajdonságainak a megfejtése. Elég itt utalnunk arra, hogy a sejteket határoló membránok teszik lehetővé, hogy a sejtben a gének megfelelő, többé-kevésbé zárt környezetben működhessenek. A sejt a membránon keresztül érintkezik környezetével, az anyagcserében résztvevő anyagok a membránon áramolnak be és ki. A membránok lényeges szerepet játszanak a sejtek közötti információ cserében. Membránokon történik a fényenergia átalakítása az élőszervezetek számára nélkülözhetetlen kémiai energiává, és a fotoszintézisből nyert táplálék molekulákban felhalmozott energiát is membránhoz kapcsolódóan működő rendszerek dolgozzák fel ATP molekulákká. Membránok fogják fel az izmok mozgatásához érkező jelzéseket és alakítják át olyan paranccsá, amelyre az izmok munkát végeznek.

A membránok a sokféle feladatot megfelelő specializálódás révén képesek ellátni. Szerkezetükről mai képünk a következő ún. fluid mozaik modell [34], (1. ábra): lipid kettős rétegbe különböző fehérjék (enzimek) vannak beágyazva, amelyek átérhetnek mindkét oldalra, vagy csak a belső, vagy csak külső oldalon közelíthetők meg, további fehérjék tapadhatnak a külső, vagy belső oldalhoz. A fehérjék a lipidvázban, amelyet 10—50 cpoise viszkozitású folyékony közegnek tekinthetünk, rotációs és laterális diffúziós mozgást végezhetnek [4]. A sokféle feladat ellátása ezért lehetséges, mert a lipid váz összetétele, mind a beépült, illetve társult fehérjék (enzimek) fajtája membránról membránra különböző. Egy-egy meghatározott funkció ellátásában pontosan meghatározott enzimrendszerek vesznek részt. A meghatározottság az enzimek típusára és többé-kevésbé a lipidvázhoz vonatkoztatott térbeli elhelyezkedésükre vonatkozik. A továbbiakban egyetlen típusú membránrendszerrel, az energia átalakító membránrendszerekkel foglalkozunk csupán.



1. ábra. A Singer—Nicolson-féle fluid mozaik membrán modell. A membrán vázát lipidmolekulákból álló kettős réteg alkotja. Ebbe ágyazódnak a fehérjék

2. Energia átalakító membránrendszerek

Két fő típust különböztetünk meg:

a) a fényenergiát átalakító rendszerek (fotoszintetikus membránrendszerek),

b) táplálékban lévő energiát átalakító membránrendszerek (oxidatív foszforiláció).

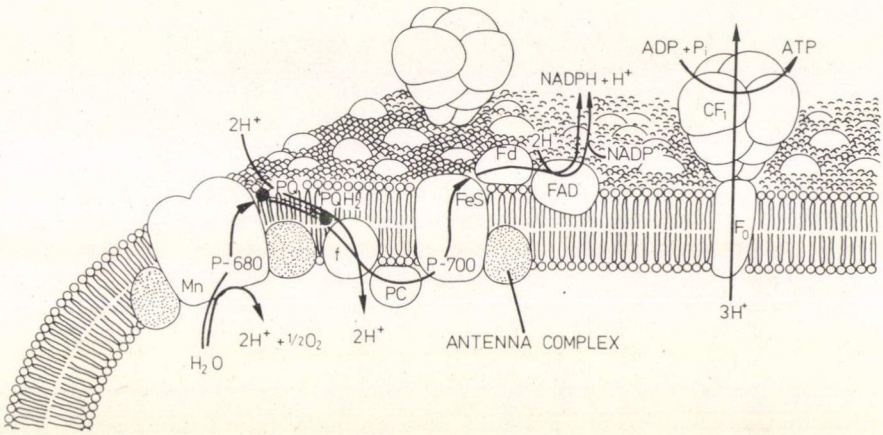
A fotoszintézis — mint ismeretes — algákban, baktériumokban és magasabb rendű növényekben a napfény fotonjaiban lévő energiát felhasználva termel szerves anyagokat. Közbenső lépésként — a sejtek fenntartásához és a szerves anyagok termeléséhez szükséges — nagy energiatartalmú — ATP molekulák szintetizálódnak.

Az oxidatív foszforiláció az aerob élőlényekben valósul meg. Különböző táplálék molekulák energiáját alakítják át a résztvevő membránrendszerek ATP molekulák energiájává. Magasabbrendű élőlényekben ez a szerkezet a mitokondriumban helyezkedik el.

Nagyon fontos eredménynek kell tartanunk azt a tényt, hogy az utóbbi két évtizedben megismertük, hogy a két különböző rendszer elvben azonos módon alakítja át a rendelkezésre álló energiát ATP molekulák energiájává.

2a) *Fotoszintetikus membránrendszerek*

A 2. ábrán látható a fotoszintetizáló membrán (tilakoid) vázlata. Hosszú és fáradságos munka alapján alakult ki ez a modell a membrán szerkezetére. Sikerült a működés egyes elemeit a szerkezetet alkotó molekulákhoz hozzárendelni. A fényt a membránba rendezett módon beépülő klorofill molekulák abszorbeálják, és az elnyelt energiát nagyon gyorsan (10^{-10} s) továbbítják az ún. reakció centrumokhoz [38]. A magasabbrendű fotoszintetizáló rendszerekben két reakció centrum van: PSI és PSII. A PSII rendszerhez eljutó foton energiája valószínűleg egy speciális kapcsolatban (pl. fehérjével) levő klorofill



2. ábra. A fotoszintézisben döntő szerepet játszó tilakoid membrán egy részének vázlata A membrán váza a lipid kettős réteg. A PSI centrum abszorpciós sávja 700 nm-nél van, P-700 a jelzése, a PSII centrumnál P-680. Mindkét centrum mellett megtalálható a klorofill molekulákat magába foglaló antenna komplex. A P-680-as reakciócentrumba továbbított foton energiája egyrészt bontja a vizet és egy elektront küld az elektron továbbító láncon (redox láncon, amelynek tagjai a PQ plasztokinon, f citokrom és PC plasztocianin molekulák) a P-700-as centrumban. E közben a felszabaduló energia kívülről protont pumpál a tilakoid belsejébe. Az elektron redukálja a függetlenül abszorbeált második foton hatására oxidált P-700-as centrumot. Az elektron továbbhalad a FeS—Fd—FAD fehérjéből álló redox láncon és a $NADP^+$ molekulákat redukálja protonokkal együtt $NADPH + H^+$ energiadús molekulákká. Az átpumpált protonok az ATP-áz molekulán (F_0, F_1 részek) visszajutva ATP-t szintetizálnak

molekula elektronját gerjesztett állapotba emeli. Az elektront további molekulák (plasztokinon és citokrom típusú fehérjék) sorban egymás után átveszik [15]. Az egyes lépések energiacsökkenéssel járnak. A rendszer a felszabaduló energia ellenében protonokat pumpál a tilakoid membrán belsejébe, amelynek hatására a membránon elektromos feszültség lép fel és a belső tartomány pH-ja lecsökken. Az elektromos feszültség és a pH különbség energiatároló, amelyből a rendszer az ATP — szintetizálásához szükséges energiát meríti. A tilakoid membránban helyezkednek el az ATP-áz molekulák, amelyek az ATP molekulákat ADP + P_i-ből szintetizálják. Ehhez az endoterm reak-

cióhoz az ATP-áz az energiát az átpumpált protonok visszaáramlása során gyűjti össze. A fotoszintetikus rendszerekben bekövetkező ATP-szintézis (fotoszintetikus foszforiláció) általános képe:

fotonok energiája	⟶	Δp	⟶	ATP
proton-pumpáló enzim-rendszer		membrán	ATP-áz $ADP + P_i$	(1)

Itt a fenti sémát 1961-ben megjósoló MITCHELLt [28] követve a

$$\Delta p = \Delta\Psi - \Delta pH \tag{2}$$

jelölést használtuk, ahol Δp jelöli a protonmotoros erőt (ez MITCHELL szóhasználata, a helyes elnevezés az átpumpált protonok elektrokémiai potenciálja), amely a membránon kialakuló $\Delta\Psi$ potenciál-különbség és ΔpH H^+ ionkoncentráció különbség összege.

Továbbhaladásunk szempontjából az ATP képzés fenti modellje a lényeges, ennek ellenére néhány szóval teljesebbé tesszük a fotoszintézis ismertetését. A PSII rendszer további funkciója a vízbontás. 4 foton abszorbeált energiájából egy eléggé ismeretlen enzimrendszer összegyűjt annyi energiát, amely 2 H_2O molekula elbontásához elegendő

$$2\,H_2O \xrightarrow[\text{energia}]{} 4\,H^+ + 4e^- + O_2$$

séma szerint.

Az elektron visszajut a reakciócentrumba és azt redukálja (pótolja a redox láncon elcsorgott elektront). Az O_2 kiszabadul, a 4 H^+ ion egyelőre sorsára vár. Közben a PSI rendszer is abszorbeál egy fotont, a gerjesztett állapotban az elektront további redox enzimek elvonják. A PSI rendszert a PSII-ből érkező elektron redukálja. A PSI-rendszerből származó elektron eljut a NADP reduktáz enzimhez, amely egy $NADP^+$ molekulához elektronokat és protonokat köt a

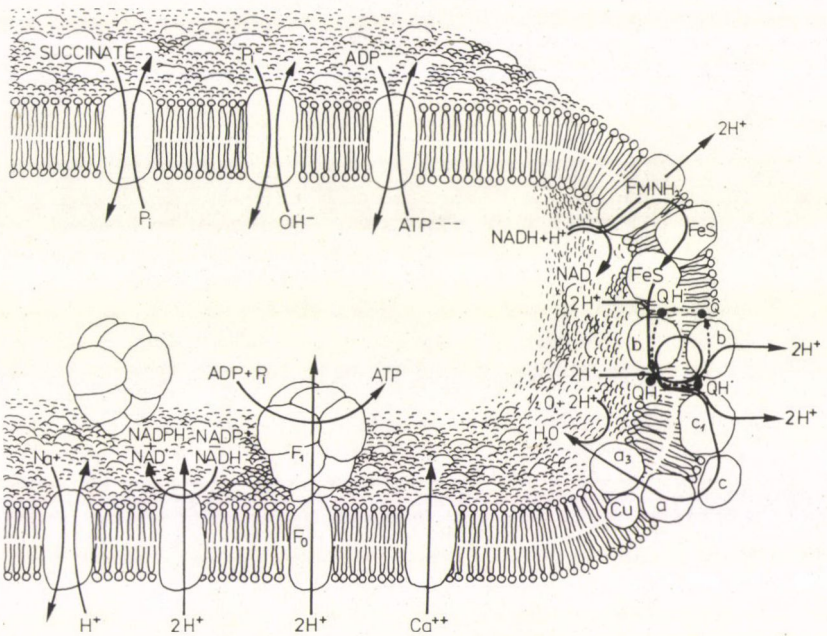
$$NADP^+ + 2\,e^- + 2\,H^+ \xrightarrow[\text{energia}]{} NADPH + H^+ \tag{3}$$

séma szerint. Itt használja fel a fotoszintetizáló rendszer a vízbontásból származó H^+ ionokat. Végső mérlegként 8 foton abszorpciójából (4 a PSII-ben és 4 a PSI-ben) 2 db $NADPH + H^+$ csoportot kapunk, amelyeket a korábban szintetizált ATP molekulával együtt ($\sim$1 molekula/1 foton a PSII rendszer-

ben) a Calvin-ciklus használja fel a cukor molekulák szintetizálására CO_2 és H_2O-ból.

2b) *Oxidativ foszforiláció*

A 3. ábrán feltüntettük az oxidatív foszforiláció színhelyének, a mitokondriális belső membrán szerkezetének sémáját. A táplálék molekulákat (pl. cukrot) a mitokondrium belsejében a Szentgyörgyi—Krebs-ciklus enzimjei dolgozzák fel. Eredményül a NAD^+ molekulákat redukálják és $NADH + H^+$ formában H_2 molekulát kötnek, amelyet a membránban lévő enzimrendszer dolgoz fel. A $NADH + H^+$ csoport kölcsönhatásba lép a redox lánc első tagjával (3. ábra) olyan módon, hogy $2H^+$ ion felszabadul és két elektron a redox láncon — bizonyos szakaszokon egyenként — végighalad, a legvégső enzimkomplexen (citokrom C oxidáz) $2e^-$, $2H^+$ és $^1/_2$ molekula O_2 egy H_2O molekulává egyesül. A redox lánc közvetítésével valójában egy H_2 molekula ég el, oxidálódik vízzé. A körben — az enzimlánc közvetítésével — apró lépésekben fel-



3. ábra. A mitokondriális belső membrán egy részének vázlata. A táplálék energiája a Szentgyörgyi—Krebs ciklusból $NADH + H^+$ energiadús molekulák formájában csatolódik ki. Itt tulajdonképpen egy H_2 molekula kötődik NAD^+ molekulához. A H_2 molekula $2H^+ + 2e^-$ formába jut kölcsönhatásba a membránba beépült fehérjékkel, és végeredményképpen oxigénnel vízzé ég el. A fehérjék redox láncot képeznek, az elektronok áthaladása során protont pumpálnak a külső térbe a belső térből. FMN-flavoprotein, FeS vasszulfid fehérjék (ferredoxinok), b, c_1, c, a, a_3, citokrom fehérjék (a citokrom aa_3 komplex Cu-t is tartalmaz). Az átpumpált protonok az ATP-áz molekulán (F_0, F_1) visszajutva ATP-t szintetizálnak. A membránban további szerkezetek vannak, amelyek anyagok szállítására, cseréjére szolgálnak

szabaduló energia ismét protonokat pumpál — jelen esetben a belső térből kifelé — amely a membránon létrehozza az (1) egyenletnek megfelelő protonmotoros erőt, amely membrán potenciál és pH grádiens formájában jelenik meg. Az oxidáció eredménye tehát a Δp protonmotoros erő. A foszforiláció, az ATP szintézis, a membránban lévő ATP-áz molekulákon valósul meg (ezek a belső oldalon helyezkednek el). Az oxidatív foszforiláció általános képe (3)-hoz hasonló:

táplálék	⟶	Δp	⟶	ATP
energiája	proton-		ATP-áz	
$NADH + H^+$	pumpáló		$ADP + P_i$	
	enzim-	membrán		(4)
	rendszer			
	(redoxlánc)			

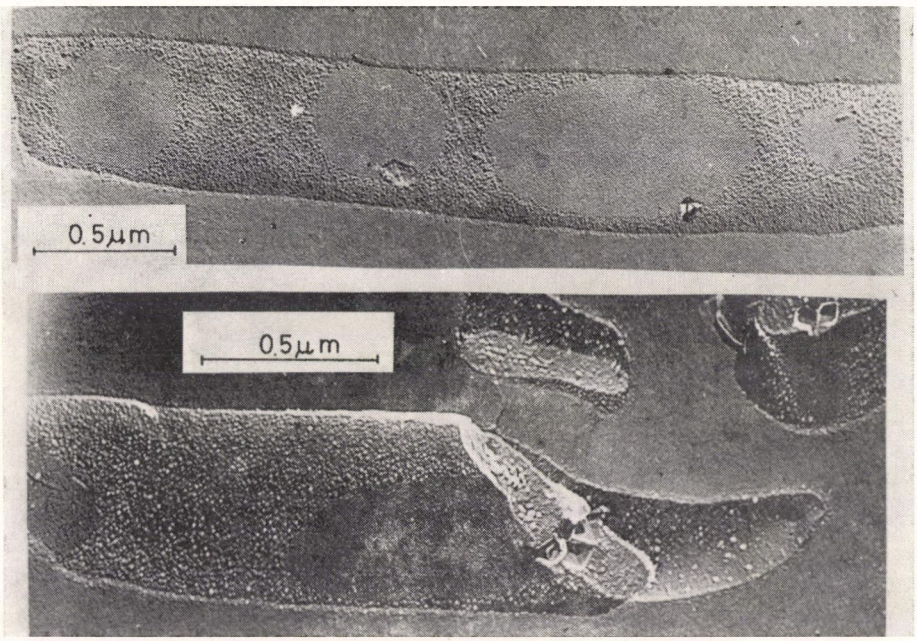
Az (1) és (4) séma csaknem teljes mértékben hasonló. Az ATP szintézisnél az energia akár fény, akár táplálék formájában kerül a rendszerbe, protonmotoros erő keletkezik, amely protonokat pumpál a membránon keresztül. Az energia membrán potenciál és pH különbség formájában áll az ATP-áz molekulák rendelkezésére. Az oxidatív folyamatokat a membránrendszer csatolja a foszforilációs folyamatokhoz.

Az energia átalakítás fent vázolt képe ma már általánosan elfogadott [3], elnevezése Mitchell-féle kemiozmotikus hipotézis. Kemiozmozis ebben az elnevezésben azt jelenti, hogy kémiai energiák hatására a membránon keresztül irányított, vektoriális mozgás jön létre, a vektoriálisan mozgó részecske a proton. A Mitchell-féle elmélet nagyon keveset mond a proton pumpa molekuláris mechanizmusáról.

(Itt jegyezzük meg, hogy az élőszervezetekben jónéhány más pumpa, pl. Na-pumpa, Ca-pumpa stb. is működik, amelyek rendkívül fontos életjelenségekhez kapcsolódnak. Ezek molekuláris mechanizmusa sem ismeretes).

2c) *Halobacterium halobium*

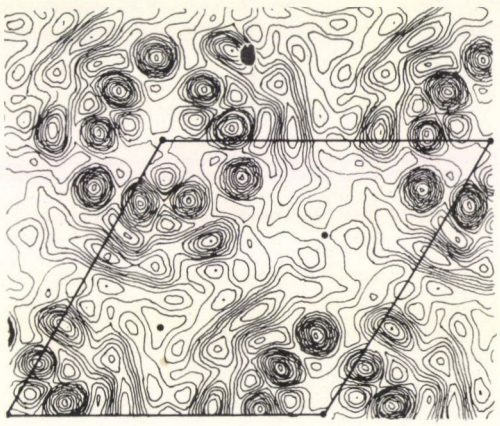
A 70-es évek elején egy a fentiektől különböző energiaátalakító rendszert fedeztek fel [29]. A *Halobacterium halobium* erősen sós vizekben szaporodik. Sejtfalában fényérzékeny anyagok, ún. bakteriorodopszin (BR) molekulák találhatók, amelyek nagyon hasonlítanak a látásért felelős rodopszin molekulákhoz. Kb. 26 000 dalton molekulasúlyú fehérjéhez fényérzékeny molekula, a retinál csatlakozik. Nagyon fontos tény, hogy a BR molekulák $\sim$ 500 nm átmérőjű membrán szigetben, ún. bíbormembránban helyezkednek el, amelyből több (4—10) is van a baktérium felületén (méretek 6 μm hosszúság, 1 μm átmérő 4. ábra). A bíbormembránok a lipiden kívül csak BR molekulákat tartalmaznak, amelyek szigorú, kvázikristályos rendben helyezkednek el (5.



4. ábra. A *Halobacterium halobium* sejt elektronmikroszkópos képe. Jól látható a ~0.5 μm átmérőjú bakteriorodopszint tartalmazó membrán darab. (V. A. BOROVIAGIN (Puscsino) felvétele)

ábra) [35]. A baktérium teljes membránján a bíbormembrán szigeteken kívül még sok más funkcionális egység is van (6. ábra), amelyek közül számunkra az ATP-áz molekula a fontos.

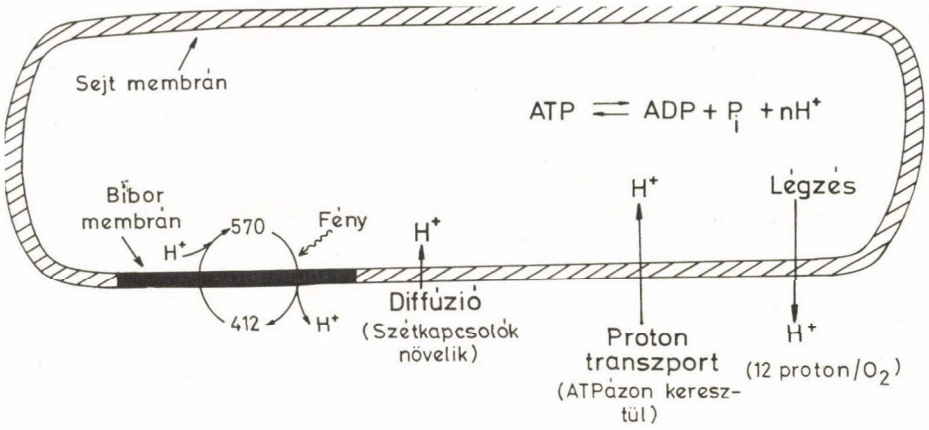
A kísérleti vizsgálatok szerint a BR molekulák az abszorbeált fotonok hatására (az abszorpciós sáv maximuma $\lambda = 570$ nm) protonokat pumpálnak



5. ábra. Elektronmikroszkópos felvételből rekonstruált sűrűség eloszlás a bíbormembránban. A BR molekulák egyenként hét hélixből állnak, amelyek átszelik a membránt. Egy-egy szabályosan 6.1 nm-re elhelyezkedő rácspont körül 3 BR molekula helyezkedik el

a sejt belsejéből a külső térbe, Δp protonmotoros erő keletkezik, amely a protonokat az ATP-ázon keresztül visszaáramoltatva ATP-szintézist eredményez. A fosztorilálás vázlata:

$$\begin{array}{ccccc} \text{fotonok} & & \Delta p & & \text{ATP} \\ \text{energiája} & \longrightarrow & & \longrightarrow & \\ \text{BR} & & & \text{ATP-áz} & \\ \text{proton-} & & \text{membrán} & \text{ADP} + P_i & \\ \text{pumpa} & & & & \end{array} \qquad (5)$$



6. ábra. A *Halobacterium halobium* sejt membránjának a vázlata

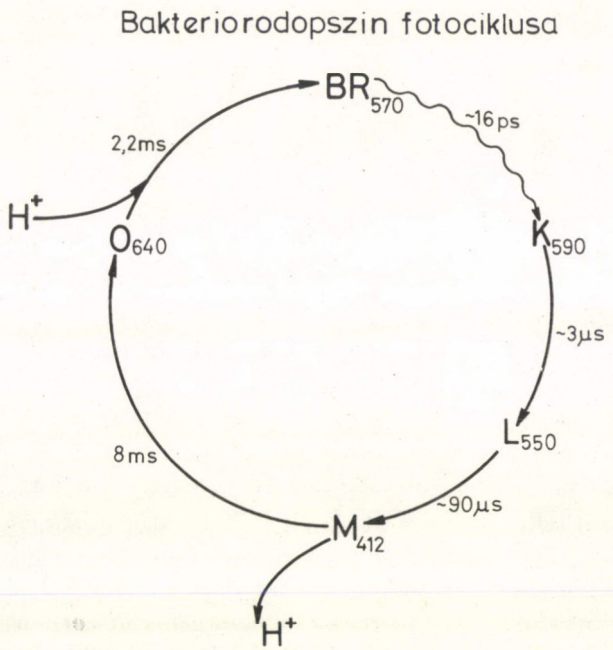
A (1), (4) és (5) séma hasonlósága szembetűnő. Eltérés csak a protonpumpálás módjában van. A (1) és (4) sémákban a protonpumpa bonyolult, biztosan több molekula vesz részt a folyamatban, az (5) sémánál azonban egyetlenegy molekula, a BR molekula végzi a protonpumpálást. Világosnak látszik, hogy a protonpumpa molekuláris mechanizmusának tanulmányozását a bíbormembrán rendszeren kezdjük meg.

3. A bakteriorodopszin fotociklusa

A bíbormembrán szigeteket a sejtekből biokémiai módszerekkel izolálni lehet, a BR molekulák eközben megtartják funkcionális tulajdonságaikat. Mód nyílik tehát egy nagyon egyszerű membrán rendszer — lipid és egyetlen típusú fehérje — működésének in vitro vizsgálatára.

A kapott eredményekből kiemeljük a BR fotociklusára vonatkozó ismereteket. A BR molekulák egy foton abszorpciója után (max = 570 nm) kb. 15 ps alatt egy új állapotba kerülnek, amelynek az abszorpciós maximuma

$\lambda = 590$ nm-nél van [1]. Ez a *K* állapot. Innen termikus gerjesztési cikluson haladva jutnak vissza az alapállapotba. A K → L → M → (N) → O → BR sorozatnál az élettartamuk és az új abszorpciós sáv maximális hullámhosszai a 7. ábrán találhatók. Megjegyezzük, hogy az N állapot léte vitatott [35], mi a következőkben e nélkül tárgyaljuk a fotociklust. A proton az M → O átmenet során lép ki a membrán külső oldalán és a rendszer a belső oldalról az O → BR átmenetben veszi fel a hiányzó protont, így áll helyre a molekula alapállapota.

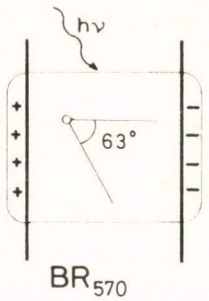


7. *ábra.* A bakteriorodopszin molekula fotociklusa. Az alapállapotban (BR_{570}) fény hatására ~15 ps idő alatt a K_{590}-es állapotba jutnak a molekulák, ahonnan a továbbiakban termikusan gerjesztett átmenetek során a L_{550}, M_{412}, O_{640} állapotokon keresztül visszakerülnek az alapállapotba. Az időállandók szobahőmérsékletre vonatkoznak. A protonok az $M_{412} \rightarrow O_{640}$ átmenet során lépnek ki és az $O_{640} \rightarrow BR_{570}$ átmenetben lépnek be a fehérjékbe

Lézer—Raman-spektroszkópiai vizsgálatokkal bebizonyították, hogy a retinál a fehérje egy lizin aminosavjához kötődik Schiff-bázissal. A Schiff-bázison egy kompenzálatlan proton van alapállapotban. Ez a proton lép ki — valahogy — a fotonok hatására a külső oldalra és erre a helyre lép be egy másik proton belülről. Az is ismeretes, hogy a Schiff-bázis a fehérjékben a belső oldalhoz közelebb van, és a retinál innen kiindulva mintegy 63°-os szöget zár be a membrán normálisával (8. ábra).

A vizsgálatokat élő baktériumokon is elvégezték [35], amelyekből tudjuk, hogy a protonpumpa a fent vázolt ciklus szerint működik in vivo is.

A protonpumpa molekuláris mechanizmusának jobb megértése céljából új módszert vezettünk be a bíbormembránok orientálására [22], majd felismertük, hogy a proton-pumpa működése közben elektromos jel indukálódik, amely a BR fotociklusához társult [23].



8. ábra. A BR molekula elhelyezkedése a membránban. A retinál ≃63°-os szöget zár be a membrán normálisával

4. A bíbormembránok orientálása

Jólismert jelenség az, hogy makromolekulák (fehérjék, DNS, . . .) vizes oldatban elektromos térben orientálhatók [11]. Nagyobb sejtrészecskéket — pl. kloroplasztiszokat — kezdetben mágneses térrel [13], később váltakozó elektromos térrel (50 Hz) orientáltak [12]. A bíbormembránok orientálásáról is volt irodalmi utalás: nagyfeszültségű impulzusokkal sikerült nagyon rövid időre orientálni bíbormembránokat vizes szuszpenzióban [32] és kb. 100 V/cm erősségű sztatikus elektromos térrel különleges gél rendszerben [9].

Részletes vizsgálataink során kiderült, hogy kb. 20 V/cm tér elegendő arra, hogy a bíbormembránokat praktikus szempontból 100%-osan orientáljuk.

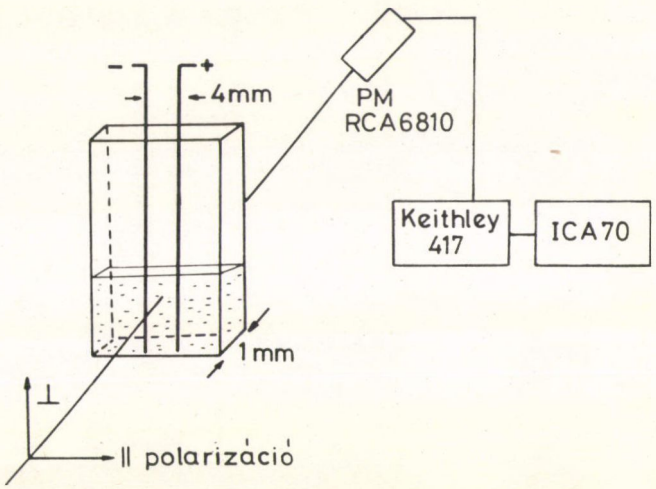
A mérő rendszer vázlatát a 9. ábrán mutatjuk be. Az 1 mm vastag küvettában bíbormembrán szuszpenziót öntöttünk. A Pt elektródák 4 mm távolságban voltak, a 4—5 mm magas oszlop ellenállása $\simeq 2 \cdot 10^4\ \Omega$, az oldat optikai sűrűsége 1,8 volt.

Részecskék orientálásának mérésére a lineáris dikroizmus jelensége használható [11]: az orientált mintán áthaladó lineárisan polarizált fény abszorpciója (A) megváltozik (ΔA) a következő egyenletek szerint:

$$\frac{\Delta A_{\perp}}{A} = -\frac{1}{A}\log\left(1+\frac{I_{\perp}}{I}\right) = \Phi(E)\left(\frac{3}{2}\sin^2\Theta - 1\right) \qquad (6a)$$

$$\frac{\Delta A_{\parallel}}{A} = -\frac{1}{A}\log\left(1+\frac{I_{\parallel}}{I}\right) = \Phi(E)(3\cos^2\Theta - 1) \qquad (6b)$$

ahol $\perp$ és $\|$ jelenti az eredményeket abban az esetben, ha a fény polarizációs síkja merőleges, illetve párhuzamos az orientáló elektromos tér irányával. I_0 fényből a mintán I fény jut keresztül $\left(A = \log \frac{I_0}{I}\right)$, $I_\perp$ és $I_\|$ a mért fényintenzitás változás az orientálás hatására. $\Phi(E)$ az E elektromos térerősségtől függő orientációs függvény. Telítésnél $\Phi(E) \to 1$. A molekulában lévő fényabszorbeáló egység, a retinál átmeneti momentum vektora és a térerősség iránya



9. ábra. Mérőrendszer az orientálás tanulmányozására

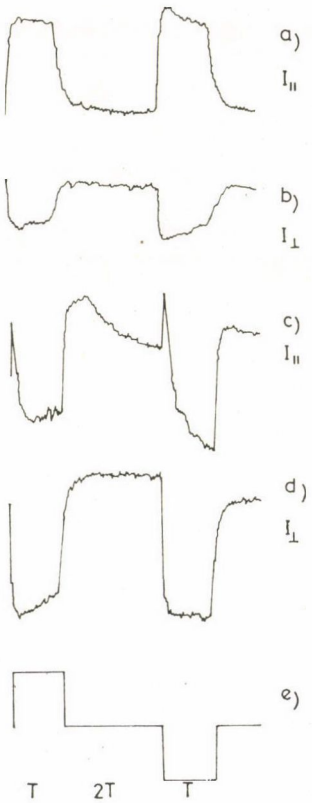
közötti szög Θ. Minthogy azt várjuk, hogy a membrándarabok, mint 500 nm átmérőjű és kb. 5 nm vastagságú korongok az elektromos tér irányára merőlegesen állnak be (a korongok normálisa párhuzamos az elektromos tér irányával), Θ az átmeneti momentum vektor és a normális közötti szög (lásd 8. ábra). Az elektromos tér iránya körül hengerszimmetria van, tehát a vektorok egy Θ nyílásszögű kúpon foglalnak helyet. Előző vizsgálatokból ismeretes volt, hogy $\Theta \simeq 60-70°$ [17,24], ezért $\frac{\Delta A_\perp}{A} > 0$, $\frac{\Delta A_\|}{A} < 0$ értéket várunk, amelyből 6a, b egyenletek alapján következik, hogy $I_\perp <$, $I_\| > 0$. 6a és 6b egyenletekből az is következik, hogy

$$\frac{\Delta A_\perp}{A} = -\frac{1}{2}\frac{\Delta A_\|}{A} \tag{7}$$

Θ-tól és $\Phi(E)$-től függetlenül.

A fényintenzitás változásokat az elektromos térerősség függvényében mértük $\lambda = 562$ nm-nél. Minthogy a bíbormembránok elektromos térben elektroforetikus mozgást is végeznek, a 10e. ábrán látható módon T ideig pozitív, 2T ideig nulla, majd T ideig negatív térerősséget alkalmaztunk, T

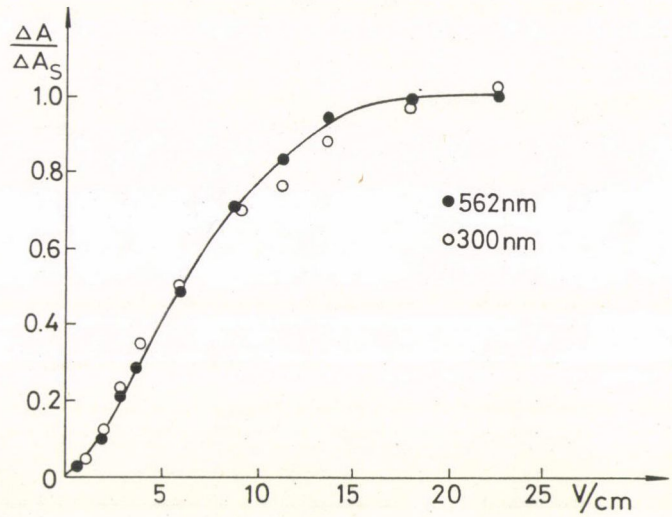
általában 3 s volt. A (7) egyenlet $\simeq 4$ V/cm térerősségnél teljesült (10a, b ábra), de magasabb térerősségnél (18 V/cm, 10c, d ábra) $I_{||}$ kezdeti pozitív tartományból gyorsan átcsapott negatív tartományba, $I_{\perp}$ viselkedése „normális" volt, vagyis $\frac{\Delta A_{\perp}}{A}$ a térerősség növekedésével telítést mutatott (11. ábra). Az $I_{||}$ anomáliát azzal magyarázzuk, hogy az elektroforetikus mozgás



10. ábra. A fényintenzitás változások időfüggése abszorbeáló bíbormembránok esetén. $\lambda = 562$ nm. (a) az elektromos tér irányával párhuzamosan polarizált fény (I_{II}), térerősség $E = 4$ V/cm; (b) merőlegesen polarizált fény ($I_{\perp}$), $E = 4$ V/cm; (c) I_{II}, $E = 18$ V/cm; (d) $I_{\perp}$, $E = 18$ V/cm; (e) az alkalmazott térerősség időfüggése $T = 3$ s

során a bíbormembrán korongok elfordulnak [22]. A magyarázatot további vizsgálatokkal megerősítettük, amikor az orientálást pH függvényében mértük [7]. Ismeretes, hogy a bíbormembránok töltését pH-csökkenéssel kompenzálni lehet, ennek következtében csökken az elektroforézis sebessége, tehát a fellépő elfordulásnak is csökkenie kell. A mérések szerint kisebb pH-nál a görbék jobban megközelítették a 7. egyenlet követelményeit.

A mérési adatok analíziséből sok értékes információt nyerhetünk. A tér kikapcsolása után az orientáció a részecskék rotációs diffúziója következtében összeomlik. A mérésekben két időállandót is találtunk $\tau_1 = 250$ ms, és $\tau_2 = 1{,}7$ s (az elektroforézis miatt bekövetkező elfordulás időállandója $\tau_3 \simeq 420$ ms volt). A két időállandó különböző méretű részecskékre vall. Minthogy a rotációs diffúzió miatt bekövetkező relaxáció időállandója $\tau \simeq r^3$, ahol r a részecske sugara, τ_2 időállandójú részecske sugara $r_2 = \sqrt[3]{\tau_i/\tau_1} \cdot r_1 \simeq 2r_1$.



11. ábra. $\Delta A/A$ mennyiség függése az elektromos térerősségtől. Az adatokat a telítési értékre $(\Delta A/A)_S$ normáltuk. $\lambda = 562$ nm és 300 nm

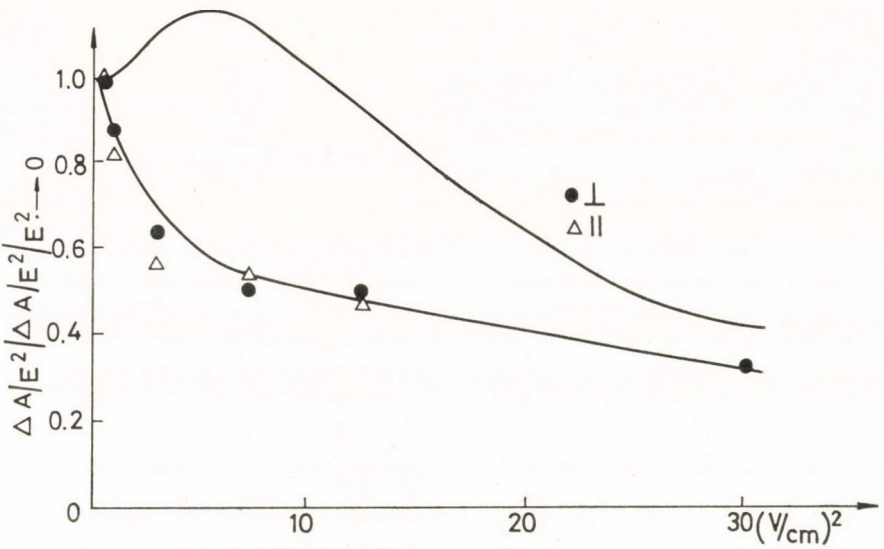
A nagyobb részecskék intenzitása kb. $\simeq 15\%$. A további analízisnél a nagyobb részecskék hatását elhanyagoljuk.

A következő fontos ismeretet a 11. ábrán közölt telítési görbe alapján nyerhetjük. Telítésnél $\Phi(E) \simeq 1$, tehát $\frac{\Delta A_\perp}{A} = 0{,}11 \pm 0{,}02$ értékből $\Theta = 59 \pm 1^0$ számítható ki a 6a egyenlet alapján. Az orientáció az adott rendszerben elektromos dipólmomentum alapján valósul meg, azt mondhatjuk, hogy a dipólmomentum és az átmeneti momentum vektor közötti szög 59° méréseink alapján. Az újabb vizsgálatokban sikerült $\Theta = 63°$-ot is mérni [7]. Állíthatjuk tehát, hogy Θ jó közelítéssel egyezik az egyéb módon (főleg szedimentálás utáni szárítással) előállított rétegek esetén mért szöggel [17, 24], amely azt mutatja, hogy az orientálásban résztvevő dipólmomentum nagyon jó közelítéssel párhuzamos a bíbormembrán normálisával.

Megjegyezzük, hogy az elektromos úton létrehozott irányítás valódi orientálás (azaz minden membránnak azonos oldala, jelen esetben a belső

oldala fordul a pozitív elektróda felé) míg szedimentálással, vagy mágneses térrel csupán párhuzamosítani lehet (alignement) a membránfragmentumokat.

Részecskék elektromos térben akkor orientálhatók, ha vagy permanens, vagy a térrel indukálható elektromos dipólnyomatékkal rendelkeznek. A telítési görbe megfelelő analíziséből eldönthettük, hogy a bíbormembránok permanens dipólnyomaték révén orientálódnak. A 12. ábrán a $(\Delta A/E^2)/$



12. ábra. A $(\Delta A/E^2)/(\Delta A/E^2)\, E^2 \to 0$ mennyiség ábrázolása. A mérési pontokon áthaladó elméleti görbe a permanens, a másik az indukált dipólmomentumokat írja le

$(\Delta A/E^2)_{E^2 \to 0}$ mennyiséget ábrázoltuk E^2 függvényében. A mérési pontokon áthúzott görbe a permanens, a másik az indukált dipólmomentumok esetére vonatkozó elméleti görbe [11].

Permanens dipólnyomatékok esetén az orientációs függvény

$$\Phi(E) = \Phi(\beta) = 1 - 3\ (\coth \beta - 1/\beta)/\beta \qquad (8)$$

ahol $\beta = \mu BE/kT$, μ a részecske dipólnyomatéka, $B = E_{int}/E$ egy belső tér függvény, amely azt fejezi ki, hogy a belső tér a dipólnyomaték helyén különbözik az alkalmazott E értől, k a Boltzmann állandó, T a hőmérséklet K fokban. A 11. ábra adataiból $\mu B = (6 + 1) \cdot 10^{-23}$ Cm számítható ki. Ezt az óriás dipólnyomatékot a bíbormembránon lévő individuális dipólnyomatékok

összegeként foghatjuk fel. Tegyük fel, hogy az egyes dipólnyomatékok a BR molekulák és B = 1, akkor mivel egy 500 nm átmérőjű bíbormembránban mintegy $1{,}8 \cdot 10^4$ BR molekula van.

$$\frac{\mu_{BR}}{e} = n_e d = 18 \text{ nm},$$

ahol e az elemi töltés, n_e azok száma **d** távolságban. Ha d = 4,5 nm (a membrán vastagsága, a fehérje két oldalának távolsága), akkor $n_e = 4$. Ez a számítás természetesen közelítés, de érzékelteti, hogy a BR molekulát úgy foghatjuk fel, hogy a belső, illetve külső oldalon membránból kiérő részén pozitív, illetve negatív töltések vannak, és ezek alkotják a permanens dipólnyomatékot. A fenti kísérletekből nem dönthető el, hogy a negatív oldal a belső oldal, ezt a következő részben tárgyalt vizsgálatok alapján állítjuk. Természetesen további kísérletekkel kell azt a feltevést is igazolni, hogy a dipólnyomatékok a fehérjék sajátjai és nem esetleg a lipidek töltései okozzák.

5. A bakteriorodopszin fotociklusához társult elektromos jel

A bíbormembránok a fenti kísérletekben kellően hosszú ideig ($\simeq$ 3—4 s) vannak orientált állapotban ahhoz, hogy további kísérleteket lehessen rajtuk végezni. A rendszer ebben a „kvázistacionér" orientálási állapotban felfogható mint egy óriás membrán, amelyben a szokásosnál lényegesen több BR molekula van. Ezért várható volt, hogy a viszonylag nagy mennyiségű anyagon tiszta kísérleteket, kvantitatív értékelésre alkalmas méréseket végezhetünk.

Vizsgálataink megkezdése előtt gyors, bifázisos elektromos jelet figyeltek meg két nem túl jól definiált, többé-kevésbé orientált BR rendszeren [37, 19, 8].

A jel rövid fényimpulzus hatására jelent meg. A vizsgálatokat a szerzők nem tudták kvantitatívvá tenni a BR rendszer indefinit volta miatt és nem sikerült kapcsolatot találni az elektromos jelek és a BR fotociklus között.

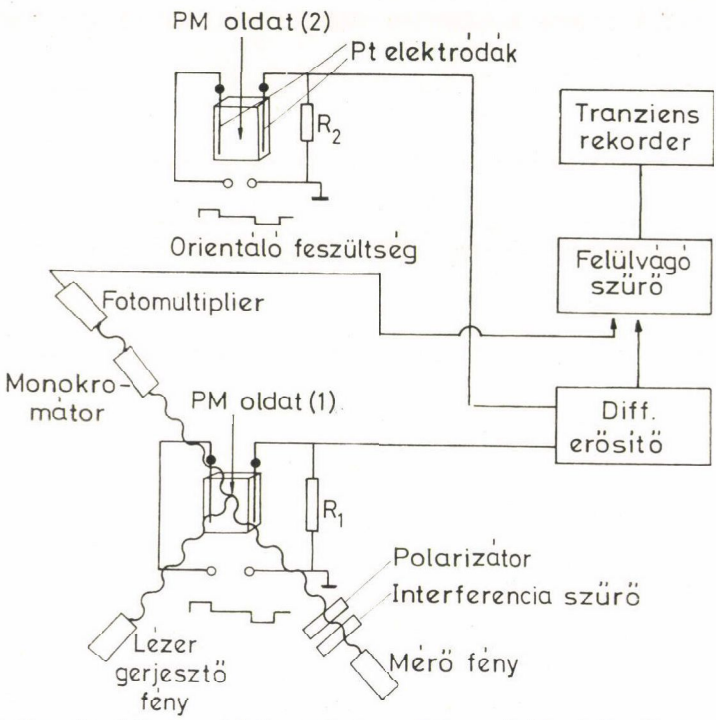
Az elektromos jelek tanulmányozására a 13. ábrán látható mérőrendszert állítottuk össze. Egy házilag készített kapcsoló egység (az ábrán nem látható) két feladatot látott el:

i) Előállította az orientáláshoz szükséges, T, 2T, T időkkel rendelkező pozitív — nulla — negatív négyszöget jelet (T $\simeq$ 3 s);

ii) Az első két időintervallumban (T, 2T) tetszőleges időben indító jelet adott egy Opton festék lézerre, amely λ = 580 nm, 1 μs hosszú és 10 mJ energiájú fényimpulzust adott. Ugyanakkor indította a tranziens rekordert (KFKI, legkisebb konverziós idő 0,1 μs, konver-

ziós tartomány 256 egység/csatorna, 1024 csatorna mérési tartomány).

A két identikus bíbormembrán rendszert használtuk az elektromos mérésekhez, mert az R_1 munkaellenálláson elkerülhetetlenül megjelenő orientáló feszültségből származó jelet, amely rendszerint nagyobb volt, mint a mérendő jel, kompenzálnunk kellett. A Keithley 604 differenciális erősítő mindkét rend-

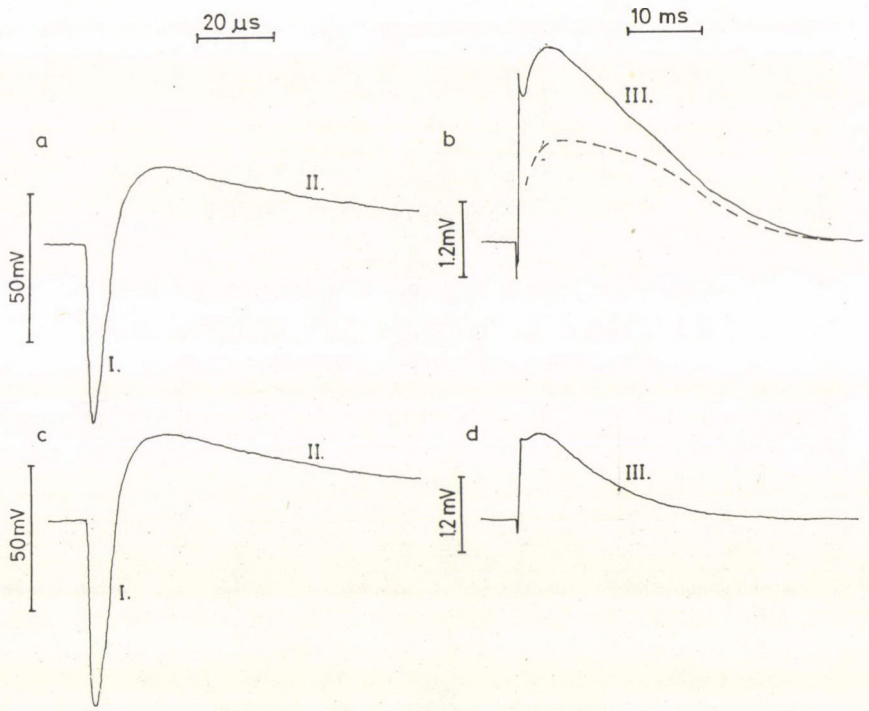


13. ábra. Az elektromos jelek tanulmányozására szolgáló mérőrendszer vázlata

szerből azonos nagyságú és alakú orientálásból származó jelet kapott, amelyre a kimeneten nem adott jelet. Az R_1 ellenálláson a lézer impulzus hatására is jelent meg jel, ezt az erősítő természetesen erősítette, és az a felülvágó szűrőn keresztül bejutott a tranziens rekorderbe. Az egész rendszer idő felbontása 1,5—2 μs volt (a felülvágó szűrő határfrekvenciája 0,5 Mc). A határfrekvenciát csökkentettük, amikor hosszabb időállandókat mértünk.

A mérőrendszerhez egy fénymérő út is tartozott, amely kettős célt szolgált: egyrészt ellenőriztük a lineáris dikroizmus méréssel az orientáció bekövetkeztét, másrészt a fotociklust követtük különböző hullámhosszú fénnyalábbal végezve méréseket. A fénymérő fotomultiplier jele a differenciális erősítő után csatlakozott a rendszerbe.

A 14. ábrán bemutatjuk az orientált membránrendszeren mért elektromos jeleket, amelyeket a lézer impulzus gerjesztett. A jeleket t = 2,5 s és t = 3,3 s időben, tehát elektromos tér jelenlétében és anélkül is mértük. Látható, hogy a két gyors komponens praktikusan azonos, míg a lassú komponensben különbség van, amelyet a *b* ábrán a szaggatott görbe mutat. Elektromos



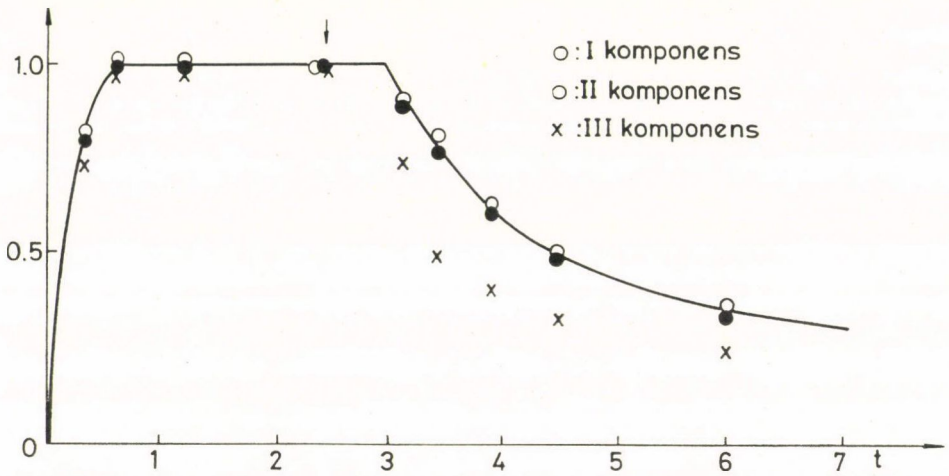
14. ábra. Az elektromos jelek időfüggése: (a, b) t = 2.5 s (tér és orientáció van) esetén mért jelek; (c, d) t = 3.3 s (tér nincs, orientáció van). (b) ábrán a szaggatott vonal a (b) és (d) görbe különbsége (az utóbbit az I komponensre normáltuk). A bíbormembránok vizes szuszpenzióban voltak, A = 1.8, T = 20 °C, orientáló feszültség 8.5 V. Az elektródák közti távolság D = 0.8 cm

tér nélkül nyilvánvalóan van még orientáció, amely csak bizonyos idő alatt relaxál. Ennek pontosabb tanulmányozása érdekében mértük az orientációval arányos lineáris dikroizmus jel idő függését (15. ábra folyamatos vonal) és erre normáltuk a különböző időkben kapott elektromos jelek amplitúdóit (I, II, III). (A mérésekben nagyobb bíbormembrán részecskék voltak, ezért nagyobb a relaxáció időállandója). Látható, hogy az I. és II. komponens kizárólag az orientálástól függ, a III. komponensben van elektromos tértől függő rész is.

Az elektromos tértől függő részt könnyen megérthetjük. A jelet a protonpumpálás hatására tranziensen felszabaduló protonok okozzák. A membrán

egyik oldalán kilépő protonok megnövelik az oldatban a vezetőképességet annyi időre, amíg a másik oldalról be nem lép egy másik proton a kilépett helyére. A görbe (14b ábra, szaggatott görbe) alatti terület $2{,}56 \cdot 10^{-4}$Vs. Ennek értékelésére később térünk vissza.

Az elektromos jel orientáció és tér függésének megállapítása után ugyanazon a mintán parallel mértük az elektromos jelet és a fényabszorpciós jeleket különböző hullámhosszokon azzal a céllal, hogy az elektromos jele-



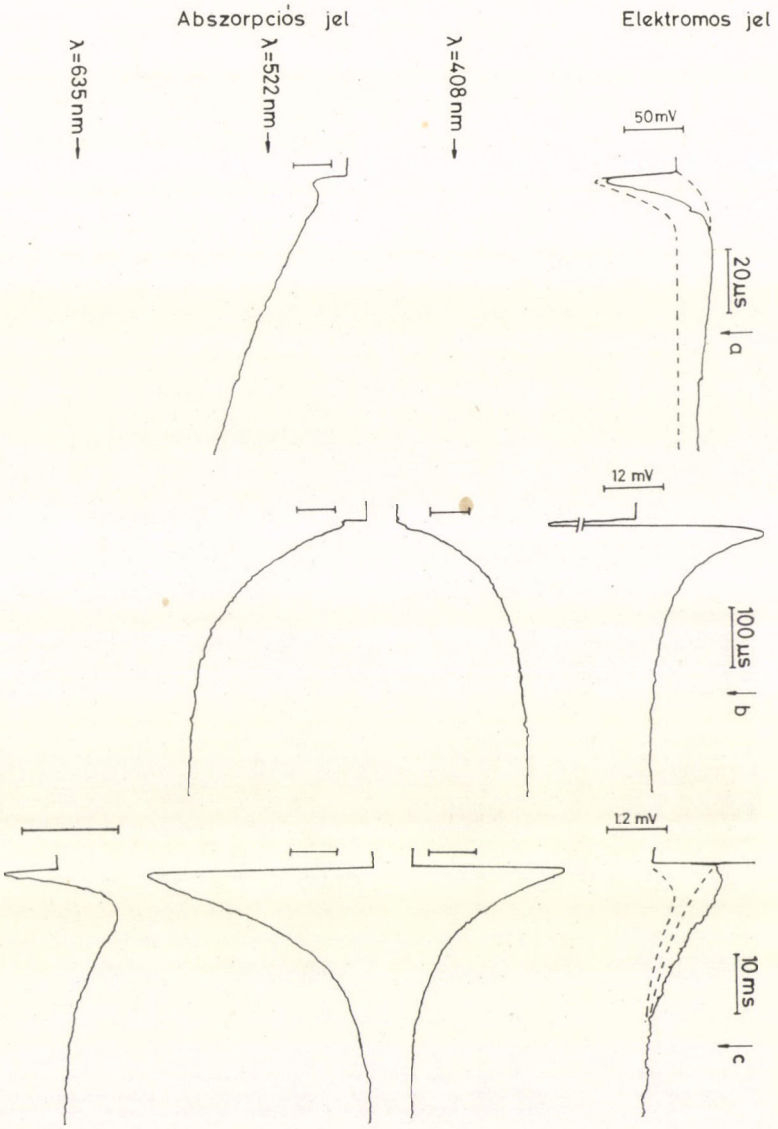
15. ábra. Az elektromos jel komponensei amplitúdójának korrelációja az orientációval. Az orientáció fokát $\lambda = 570$ nm-es polarizált fénnyel mértük, ezt jelzi a kihúzott görbe. Az adatokat a nyíllal jelzett pontban normáltuk

ket a BR fotociklusának a lépéseihez hozzárendeljük. Az eredményeket a 16. ábrán gyűjtöttük össze. A hozzárendelést a jelek kvantitatív leírásával kezdjük.

Az I. komponens exponenciálisan eső negatív jel $\tau_1 \simeq 4$ μs időállandóban. Ugyanezt az időállandót lehet megfigyelni az A_{522} és A_{408} fényabszorpciós jelben. A_{522} mutatja a K-forma azonnali megjelenését és bomlását τ_1 időállandóval az L-formába (K $\rightarrow$ L átmenet). A_{408} megjelenése τ_1 idővel késik.

A II. komponens pozitív jel; $\tau_2 \simeq 80$ μs időállandóval. Ez az L $\rightarrow$ M átmenet időállandója is, amelyet az A_{522} görbén mint az L_{550} forma eltűnését és az A_{408}-as görbén mint az M_{412} forma megjelenését lehet megfigyelni. A 16a ábra a gyors kétfázisú jel felbontását mutatja. Ezek szerint a pozitív jel tartalmaz τ_1 időállandójú emelkedő szakaszt, amely a szülő-leány bomlás összefüggéseit jelzi.

A III. hosszú életű komponens (amelyhez hasonlót előttünk senki sem észlelt) viszonylag komplex jel. Ha a tranziens vezetőképesség növekedés



16. ábra. Az elektromos jelek és a fényabszorpciós jelek (különböző hullámhosszokon) összehasonlítása. (a—c) különböző időfelbontással mért jelek. Az elektromos jeleket t = 3.3 s időben mértük. Az (a) és (c) oszlopban található szaggatott vonalak az elektromos jelek dekompozicióját jelzik. Bíbormembránok H_2O szuszpenziója, A = 1.8, T = 20 °C, orientáló feszültség 8.5 V. Az abszorpciós jeleknél a lépték minden esetben $\Delta I/I = 0.1$ értéket jelez. Pozitív jel esetén $\Delta I < 0$

okozta jeltől eltekintünk, akkor a visszamaradó jel (16c ábra) egy exponenciálisan eső pozitív jel ($\tau_3 \simeq 8$ ms) és egy szülő-leány jel szuperpozíciója. Az $M \rightarrow O$ átmenet időállandója az A_{408} görbén $\tau_3 \simeq 8$ ms. A szülő-leány jel az

O → BR átmenet időmenetével egyezik, amelyet az A_{635} görbe mutat. Az O → BR átmenet időállandója $\tau_4 \simeq 2$ ms.

1. táblázat

A fotociklus egymást követő átmeneteihez társuló elektromos és abszorpciós jelek időállandói. Az adatok H_2O szuszpenzióra és D_2O szuszpenzióra (zárójelben) vonatkoznak

Jel típus \ Átmenet	K → L τ_1 (μs)	L → M τ_2 (μs)	M → O τ_3 (ms)	O → BR τ_4 (ms)
Elektromos	4,4 (6.2)	81 (452)	8.0 (22.0)	2.5 (4.0)
A_{408}		81 (429)	7.9 (20.0)	
A_{522}	3.7 (5.1)	91 (445)	8.5 (20.0)	
A_{635}			9.2 (21.0)	2.2 (4.1)

A $\tau_1 - \tau_4$ időállandókat meghatároztuk a görbékből és az 1. táblázatban összegyűjtöttük. A számításokban a szokásos szülő-unoka ... egyenleteket használtuk, amelyeket a rádióaktív bomlássorozatokból ismerünk (ezek az ún. Buteman-egyenletek [10]). Figyelembe vettük, hogy a komponenseknek a sorozatban különböző előjelük és amplitúdójuk lehet.

Az elektromos és abszorpciós jeleket megmértük és analizáltuk abban az esetben, amikor a bíbormembránokat a szokásos H_2O-oldatból centrifugálással lecsapattuk és aztán D_2O-ban szuszpenzáltuk. Ismeretes, hogy ilyenkor bizonyos lazábban kötött hidrogénatomok deutériumra cserélődnek a fehérjékben, amelynek hatására a fehérjék időállandói megváltoznak. A H—D kicserélődéséhez idő kell, ezért megvizsgáltuk, hogy a D_2O-ban való szuszpendálás után mily mértékben változik az elektromos jel. A 3 perc — 5 óra intervallumban nem tapasztaltunk változást a jelek amplitúdójában. Az időállandókat (τ_1— — τ_4) szintén az 1. táblázatban gyűjtöttük össze (zárójelben).

Az abszorpciós és elektromos jelek időállandóinak kvalitatív (16. ábra) és kvantitatív (1. táblázat) egyezése alapján állítjuk, hogy az elektromos jelek megfelelő komponensei a fotociklusban ismeretes K → L, L → M, M → O és O → BR átmenetek elektromos megfelelői. Ez a megfeleltetés található az 1. táblázatban.

A bakteriorodopszin fotociklusa $\tau_0 \simeq 15$ ps élettartamú nagyon gyors átmenettel (BR → K) indul; ennek az átmenetnek, továbbá a kérdéses M → N átmenetnek az elektromos analóg jelét nem látjuk az elektromos jelben.

6. Az elektromos jel értelmezése: protonok elmozdulása

A 3. részben kifejtettek szerint a fotonok hatására protonok haladnak át a membrán belső oldaláról a külső oldalra a bakteriorodopszin molekulán keresztül. A Lézer—Raman vizsgálatok alapján ismeretes, hogy a Schiff-bázis a BR állapotba protonált és az M állapotba deprotonált. Elfogadhatjuk tehát, hogy a Schiff-bázison lévő proton indul el kifelé és ide jön belülről egy másik proton. HESS és KUSCHMITZ [16], valamint saját eddig nem publikált vizsgálataink szerint ismeretes, hogy tirozin és triptofán oldalláncok abszorpciója megváltozik a BR fotociklusa alatt, azzal időben korrelálva. A tirozin abszorpciós jelről biztonsággal állítható, hogy a) egy tirozin molekuláról hiányzó egyetlen protonnak felel meg és b) felfutása a K → L időállandónak, lecsengése az M → O → BR időállandónak felel meg. A triptofán jel értelmezése nem ilymértékben tiszta, de nincs ellentmondásban azzal, hogy egy proton triptofánhoz való kötődésének felel meg. Időállandó felfutása az L → M átmenetnek, lecsengése M → O átmenetnek felel meg.

A D_2O-oldatban szuszpendált bíbormembránok esetében az egyes időállandók 1,5—5-ször növekedtek meg a H_2O szuszpenzió esetén mért megfelelő időállandóhoz képest. Ez azt mutatja, hogy a protonok, illetve deuteronok nem szabadon mozognak a BR-ben, hanem különböző kötött állapotok igénybevételével, amelyeknek időállandói a H—D kicserélődés következtében különbözőképpen változtak meg. Egyszerű szabad mozgás esetén $H^+—D^+$ csere $\sqrt{\frac{m_2}{m_1}} \simeq 1{,}4$-szeres faktort eredményezett volna.

A protonok áthaladását, a protonpumpát ezek szerint úgy értelmezhetjük, hogy a protonok a Schiff-bázisról termikusan indukált átmenetekben jutnak egyik helyről a másikra, végül kilépnek és a másik oldalról ugyanilyen átmenettel áll helyre az alapállapot. Ezt a képet tovább élesíti és bizonyos vonatkozásban kvantitatívvá teszi az elektromos jel értelmezése.

Az elektromos jel oka az, hogy töltések mozdulnak el a két elektróda között és abban áramot indukálnak. A Ramo—Shockley-tétel szerint [33]

$$i = \frac{Q}{D} v, \tag{9}$$

ahol Q a töltés, v a mozgás sebessége és D az elektródák egymástól való távolsága. A v sebességnek nincs értelme kvantum átmenetekben, ezért csak az indukált töltést határozhatjuk meg. A (9) egyenletet integrálva

$$Q_{ind} = \frac{Q}{D} \int_0^\infty v dt = \frac{Qd}{D}, \tag{10}$$

ahol d a töltés elmozdulása a kvantumátmenetben. Q_{ind} tölti a kör C kapacitását amely az RC időállandón keresztül sül ki (R a mérő ellenállás, lásd. 13. ábra). Az egyszerűség kedvéért vegyük az elektromos jel első komponensét, amely egy τ időállandójú exponenciális függvény. Az indukált töltések időbeli sűrűsége

$$\varrho(t) = k\, e^{-kt} \tag{11}$$

ahol $k = \frac{1}{\tau}$. Ha N töltés elmozdulásából kapjuk a jelet, akkor az R mérőellenálláson

$$V(t) = \frac{NQ_{ind}k}{C} \int_0^{\infty} e^{-kt'} e^{-\frac{t-t'}{RC}}\, dt' = \frac{NQ_{ind}kR}{1 - kRC} \left(e^{-kt} - e^{-\frac{t}{RC}} \right). \tag{12}$$

Ha $\frac{1}{RC} \gg k$, vagyis $RC \ll \tau$

$$V(t) = \frac{NQRd}{D} ke^{-kt} \tag{13}$$

és a különböző komponensekre felírva

$$V_i(t) = \frac{NQR}{D} d_i k_i f(k_1, \ldots\ldots, k_i, t), \tag{14}$$

ahol $f(k_1, \ldots., k_i, t)$ az i-edik komponensre vonatkozó Buteman-függvény. Méréseinkben az $\frac{1}{RC} \gg k$ követelmény az első komponens kivételével messzemenően teljesül, minthogy $RC \simeq 2\ \mu s$. Az első komponensnél $\tau_1 = 3{,}7\ \mu s$ következtében a (14) egyenlet helyett a (12) egyenletet kell használni.

A (14) egyenletből látszik, hogy $V_i(t)$ mért értékéből R, D, k_i és N ismeretében d_i értékek meghatározhatók, tehát meghatározható, hogy egyes kvantum ugrásokban mekkora a protonok elmozdulása. Ebben a célkitűzésben a legproblematikusabb N-nek, a ciklusban résztvevő molekulák számának a meghatározása.

A szokásos módszer a molekuláris extinkciós együtthatókon alapul. Az M_{412} forma maximális koncentrációját tekintik a ciklusban résztvevő molekulák koncentrációjának [26]. Ha a BR molekulák koncentrációja alapállapotban c, a ciklusban nc, a rétegvastagság x, akkor írhatjuk

$$I_1 = I_0\, 10^{-\varepsilon_{BR} cx} \tag{15}$$

$$I_2 = I_0\, 10^{-[\varepsilon_{BR}(1-n) - \varepsilon_M n] cx}, \tag{16}$$

ahonnan

$$\frac{I_2 - I_1}{I_1} = \frac{\Delta I}{I} = 10^{-(\varepsilon_M - \varepsilon_{BR}) ncx} - 1. \tag{17}$$

2. táblázat

A protonok elmozdulása a BR fotociklusának különböző lépéseiben

Átmenet	d_i (nm)	$d_i/2$ (nm)
K → L	−0,3	−0,15
L → M	+1,0	+0,5
M → O	+6,2	+3,1
O → BR	+3,0	+1,5

Az alapállapotban a BR molekulák extinkciós koefficiense $\lambda = 408$ nm-nél $\varepsilon_{BR} = 1{,}5 \cdot 10^4$ l mol^{-1} cm^{-1}, az M állapotban 4×10^4 lmol^{-1}cm^{-1} [26], x = 0,1 mm. $\Delta I/I$ a 16c. ábráról leolvashatóan −32%. (17)-ből n = 0,25, $c = 2{,}9 \times 10^{-4}$ mol/l (külön meghatározásból), tehát a ciklusban résztvevő molekulák száma $N = n \cdot c \cdot V \cdot A = 7 \times 10^{14}$ (ahol $V = 0{,}4 \times 0{,}4 \times 0{,}1$ cm^3 $0{,}4 = 1{,}6 \cdot 10^{-5}$ l besugárzott térfogat és $A = 6 \times 10^{23}$ az Avogadro szám). Ezt az N értéket használva a (14) egyenletből meghatározható d_i értékeket a 2. táblázatban gyűjtöttük össze. Az elmozdulások összege $\Sigma d_i = 10{,}5$ nm, amely a membrán vastagságának a kétszerese. Önmagában meglepő eredmény, hogy ilyen jó nagyságrendi egyezést sikerült kapni a töltések elmozdulásakor indukálódó áramok analíziséből. Ha elfogadjuk, hogy egyes szerzők szerint minden fotociklusban 2 proton halad át a membránon [30], akkor $d_i/2$ értékeket vehetjük a proton elmozdulásának egy-egy átmenetben (2. táblázat). Eszerint a K → L átmenetben a protonok visszafele ugranak $d_1 = 0{,}15$ nm-t, a többi átmenetben előre mozognak. A protonok a Schiff-bázisról előre haladnak az L→ M → O átmenetekben, az összelmozdulás 3, 6nm, ekkor már kijutnak a felületre, az O → BR átmenetben (1,5 nm elmozdulás) a másik oldalról belépve ismét eljutnak a Schiff-bázishoz. Az elektromos jel adatai összhangban vannak azzal a szerkezeti adatokból nyert megállapítással [31], amely szerint a Schiff-bázis a belső oldalon kb. 1/3 távolságban helyezkedik el.

Az áthaladó protonok számát más módszerrel is meghatározhatjuk. A tranziens vezetőképesség változásból származó jel (16b. ábra) nyilvánvalóan függ az oldatba került protonok számától.

Az 5. részben meghatároztuk, hogy a vezetőképesség-jel $2{,}56 \times 10^{-4}$ Vs. Ezt $R = 10^5$ Ω munkaellenálláson kaptuk, tehát az áthaladt töltés $Q_p = \frac{2{,}56 \times 10^{-4}}{R}$ As $= 2{,}56 \times 10^{-9}$ As. Az áthaladó töltés mennyiségét megkapjuk, ha megnézzük, hogy a megvilágítás hatására a megfelelő térfogatban mennyi áram folyik az alatt, míg a protonok szabadon vannak. Ehhez meg kell határozni egy proton fajlagos ellenállását. (pH = 7-nél, szobahőmérsékleten a víz fajlagos ellenállása $5{,}2 \times 10^6$ Ωcm. Egy protonra vonatkozik ebből $R_p =$

$= 3{,}26 \times 10^{20}$ Ωcm. (pH = 7-nél a protonok száma 6×10^{13} cm^{-3}). Könnyű belátni, hogy

$$Q_p = N_p \frac{V_{old} \cdot q \cdot \tau}{R_p \cdot l}, \tag{18}$$

ahol V_{old} a megvilágított részre eső feszültségesés, l az áramvezető hossza, q felülete, τ a protonok oldatban tartózkodásának átlagideje (az *O* állapot élettartama). Esetünkben $q = lx$, tehát $\frac{l}{q} = x = 0{,}1$ cm, $\tau_4 = 2{,}2$ ms, és $V_{old} \simeq$ $\simeq 3$ V. (A méréskor a feszültség 8,5 V, az oldatra esett $\simeq 6$ V, és a lézerrel megvilágított felületre $\frac{0{,}4}{0{,}8} \times 6 = 3$ V. Az elektródák távolsága a 0,8 cm, a megvilágított felület szélessége 0,4 cm). Ezekkel a számadatokkal a (18) összefüggésből $N_p = 1{,}3 \times 10^{15}$, jó közelítéssel kétszerese az $N = 7 \times 10^{14}$ értéknek, amelyet abszorpciós mérésekből kaptunk.

A számítás eredménye azt mutatja, hogy valóban annyi proton halad át a membránon, amennyi a (14) egyenletekbe helyettesítve a helyes membrán vastagságot adja. Felmerül a kérdés most már, hogy valóban 2 proton megy-e egy ciklusban, vagy a ciklusok aránya nem n = 0,25, hanem n = 0,5. Véleményünk az utóbbi érték felé hajlik, mert egyszerűbb megérteni az egy proton — egy ciklus arányt. Ez azonban azt jelenti, hogy ε_M irodalmi értéke nem helyes. A kérdés eldöntésére széles körű vizsgálatokat kezdtünk.

Nagyon fontos megjegyeznünk az elektromos jel jellegzetességére vonatkozóan azt, hogy a protonok az átpumpálás után kikerülve az oldatba a membrán körül diffundálva nagyon gyorsan ekvilibrálódnak. Witt vizsgálatai szerint [39] ez az idő a bíbormembránokhoz hasonló méretű tilakoidoknál (1. 2a rész) $\simeq 10$ μs. Esetünkben is ilyen nagyságrendben kell várnunk a protonpumpa hatására kialakuló koncentrációkülönbség — ami equivalens lenne elektromos potenciálkülönbség létezésével — eltűnését. Felmerül a kérdés, hogy a membránok megkerülésével $\simeq \mu$s alatt visszafolyó töltés miért nem jelentkezik elektromos jelként. A magyarázat az, hogy a protonok elmozdulása a fehérjében kvantumugrás, rendkívül rövid impulzusok töltik a C kondenzátort (12. egyenlet), míg a lassú töltésmozgás nem tudja feltölteni a RC kört.

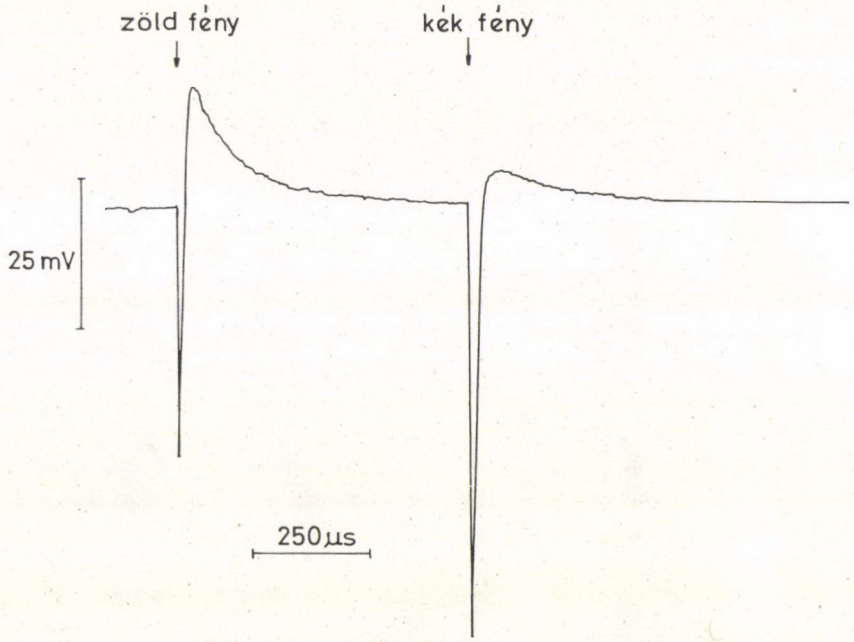
Az ekvilibrálás nem érinti a lassú idejű elektromos jeleket, mert a protonok a fehérjén belül, a külső ionoktól elszigetelt állapotban mozognak.

7. Kék hatás, a protonok visszavétele

További fontos információkat nyerhetünk az elektromos jelekkel kapcsolatban az ún. kék hatás vizsgálata során. A kék hatás abban áll, hogy a BR molekulákat az M_{412} formában $\lambda \simeq 410$ nm hullámhosszú „kék" fénnyel be-

sugározva a protonpumpa leáll, a molekula a protonokat visszaveszi [21] és nagyon rövid idő alatt helyreáll az alapállapot [6, 20].

A kék hatás elektromos jelét a $\lambda = 580$ nm hullámhosszú első lézer impulzus után tetszés szerinti időben adható kék flash felvillantásával tanulmányoztuk (természetesen a bíbormembránokat előzőleg orientáltuk). A flash időtartama 2μs, a fényhullámhossz $\lambda = 400$ nm $\Delta\lambda = 20$ nm sávszélességgel és energiája 2 mJ volt. A 17. ábrán látjuk az egymásután (600 μs) alkalmazott

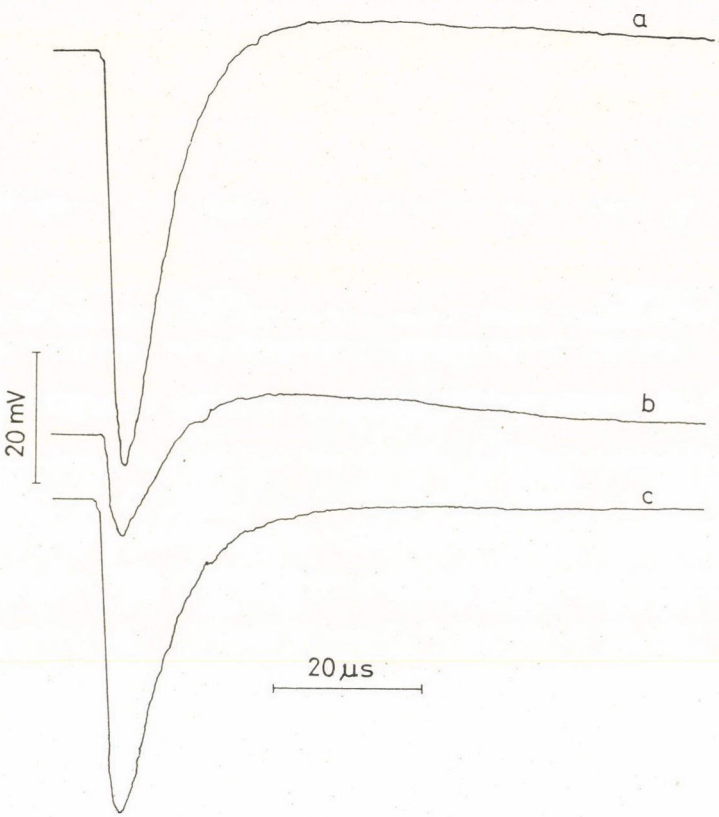


17. ábra. Elektromos jel orientált bíbormembránok esetén egymást követő zöld és kék gerjesztéskor. H_2O szuszpenzió, A = 1.8, T = 20 °C. Orientáló feszültség 10 V. Az elektródák távolsága D = 0.8 cm

zöld és kék fény jelét. A kék flash által keltett jel jellemzői erősen különböznek a zöld jeltől. A nagy negatív jel időállandója nagyobb, mint a zöld jelé, a pozitív rész amplitúdója jóval kisebb.

A kék fény nemcsak az M_{412} formát gerjeszti, hanem a BR_{570}-et is, minthogy az alapállapotban a molekula kékben is abszorbeál. Ezért a második jel a kék fény kék (M_{412}) és zöld (BR_{570}) hatásának az összege. A kék hatás jelét a 18. ábrán jelzett módon kaptuk. A 410 nm-es fény zöldhatását kifejező mérési adatokat (18b. ábra) levonjuk a 18a. ábrán levő összetett görbéből, a kapott eredmény (18c. ábra) némi hibával ($\simeq 5\%$) a kék hatásnak megfelelő elektromos jel.

Szobahőmérsékleten a különbség jel egyetlen exponenciálisan eső negatív görbe, amelynek az időállandója τ_2, = 10 μs. Kis hőmérsékleten (5—10 °C) egy pozitív előjelű gyors komponens is megjelent (19. ábra). A jel élettartama τ_1, $\simeq$ 2 μs, a berendezés felbontásának a határa. Ezért a jelet vizuális módszerrel rajzoltuk az ábrára, és állításunk csak annyi, hogy létezik. Regisztrálni 10 °C-nál magasabb hőmérsékleten nem sikerült, mert τ_1, a hőmérséklettel erősen csökken.

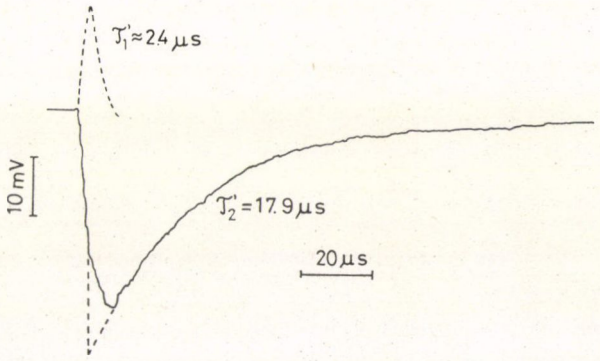


18. ábra. A kék flash-okozta jel felbontása: a) A jel abban az esetben, amikor a kék flash a zöld flash után érkezik Δt = 600 μs idővel, b) a jel csak kék flash esetében, c) az (a) és (b) jelek különbsége. Ez a tiszta M_{412} jel

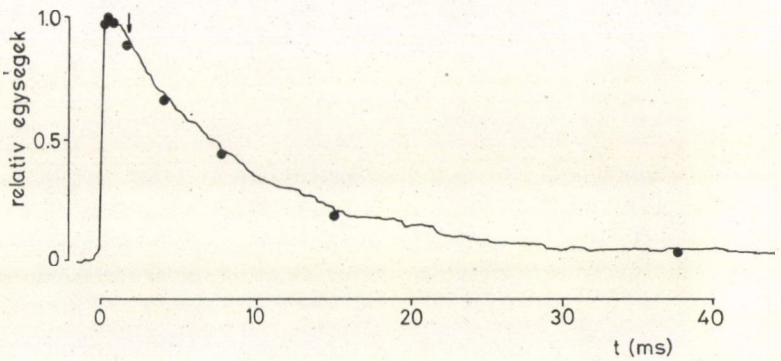
A 20. ábrán az M_{412} állapot optikai módszerrel megfigyelt bomlási görbéje és a kék fény hatására kapott elektromos válaszjel amplitúdója közti korrelációt mutatjuk be. Ez a korreláció bizonyítja, hogy az elektromos jel (a kivonás után) az M_{412} forma gerjesztésének tulajdonítható.

A H—D kicserélődési effektust is megmértük és azt kaptuk, hogy a τ_2, időállandó 1,8-szor növekszik.

Az a tény, hogy a jel két komponenst tartalmaz, arra utal, hogy a fény indukált $M_{412} \rightarrow BR_{570}$ átmenet, vagyis a BR_{570} alapállapot helyreállása az M_{412} elektronikus gerjesztése után legalább 2 termikusan gerjesztett folyamatban történik. Az első folyamat, amelynek az elektromos jele pozitív, és élettartama



19. ábra. A kék fény okozta elektromos jel (lásd 18c ábra) T = 5 °C hőmérsékleten. Két exponenciális komponens különböztethető meg, a szaggatott vonal a jel felbontása két komponensre



20. ábra. Az M_{412} állapot bomlásának (fényabszorpciós jel) és az elektromos jel amplitúdójának korrelációja
——— : a fényabszorpció időbeli változása $\lambda = 400$ nm-nél;
● : az elektromos jel amplitúdója különböző késleltetési időknél.
A jeleket a nyíllal jelzett pontnál normáltuk

(τ_1,) nagyon rövid, szobahőmérsékleten valószínűleg megfelel a KALISKY et al. által spektroszkópiai úton észlelt gyors átmenetnek [20]. Ebben a munkában további átmeneteket nem találtak. LITVIN és BALASHOV azonban megfigyeltek két további közbenső formát is, spektroszkópiai úton [25]. A két forma abszorpciós maximuma 565 és 585 nm-nél az alapforma abszorpciós maximumához (570 nm) nagyon közel van, tehát nehéz felismerni.

Ezek szerint az $M_{412} \rightarrow BR_{570}$ átalakulás a következő átmenetek során valósul meg $M_{412} \rightarrow P_x \rightarrow P_{565} \rightarrow P_{580} \rightarrow BR_{570}$, ahol $M_{412} \rightarrow P_x$ átmenet a

nagyon gyors, foton gerjesztett elektronikus átmenet (ennek elektromos analógját nem látjuk hasonlóan a $BR_{570} \rightarrow K_{590}$ átmenethez), a $P_x \rightarrow P_{565}$ — átmeneteknek felel meg a τ_1, időállandójú pozitív elektromos jel, τ_2, élettartamú elektromos jel a két következő átmenet valamelyikének felel meg, valószínűleg a $P_{565} \rightarrow P_{580}$ átmenetnek. A következő átmenethez nem társul elektromos jel.

Az elektromos jeleket a (14) egyenlet alapján értékeltük ki, hogy a protonok elmozdulását (d_i) megkapjuk. Függetlenül elvégzett abszorpciós mérésekből megállapítottuk, hogy a kék flash hatására az M_{412} állapotban lévő molekulák 33 (± 2)%-a jutott vissza a BR_{570} állapotba, a többi a szokásos $M \rightarrow O \rightarrow BR$ úton. Ezzel $d_1, \simeq +0{,}03$ nm $d_2, = 0{,}35$ nm. Az értékek abszolút hibája kb. 30%, amivel N értékének meghatározása pontatlan). d_2, relatív hibája a zöld fény esetére meghatározott d_1 és d_2 értékekhez (2. táblázat) $\simeq 5\%$. d_1, értéke azonban csak durva becslésnek tekinthető, mert τ_1, az idő felbontásunk határán volt.

Az eredmények értelmezése nyilvánvaló: a molekula az M_{412} formából a kék fény hatására gyorsan visszajut a BR_{570} alapállapotba, amely azt jelenti, hogy az M_{412} formába eljutásig a protonok $d_1 + d_2 = 0{,}35$ nm-re jutottak a Schiff-bázisból és onnan $d_1, + d_2, \simeq -0{,}32$ nm-t léptek vissza. Tehát nagyon jó közelítésben $d_1 + d_2 + d_1, + d_2, \simeq 0$.

8. Következtetések

Kiinduló problémánk volt az élővilág energia átalakítási folyamataiban általánosan résztvevő protonpumpa mechanizmusának megértése. Úgy véljük, hogy a fenti vizsgálatokkal, amelyek a bakteriorodopszin molekulában működő fény hajtott protonpumpa működésére vonatkoznak, a probléma megoldásához hozzájárulunk. Megállapítottuk, hogy a Schiff-bázisról elinduló protonok a fény hatására perturbált molekula saját — kvantumállapotokon át történő — mozgása során meghatározott lépésekben jutnak ki a membrán külső felületére és lépnek be a Schiff-bázisra. A megállapítást a keletkező elektromos jel analízise alapján tettük. A protonok áthaladásának mélyebb részleteit — milyen oldalláncok közvetítésével, milyen energiák felhasználásával, a fehérje milyen belső szerkezeti mozgásai révén alakulnak ki a lépések stb. — további széles körű vizsgálatokkal lehet felderíteni. A kutatómunka végeredménye egy olyan BR molekula modell lehet, amely a szerkezet alapján magyarázza meg a protonpumpa működését.

Az elektromos jel sajátságainak megértése vezetett a (14) egyenlethez, amely kvantitatív módon írja le a fehérjén belül, a fehérje által védett környezetben elmozduló töltés által egy külső körben indukált áramok idő függését. Láttuk, hogy ebből fontos adatokat kaphattunk a molekulán belüli töltés elmozdulások nagyságáról. Úgy véljük, hogy ilyen elektromos jelek más esetek-

ben is fellépnek — amikor valamilyen ionpumpa (Na, K, Ca, . . .) működik, vagy a fehérje működése közben a fehérjén belül töltött csoportok mozognak. Ezért érdemesnek tartjuk, hogy a fehérjék működése közben fellépő elektromos jelet elnevezzük: PERS (protein electric response signal).

Nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a bakteriorodopszin rokon molekulájában, a látásért felelős rodopszinban azonos jelenségek játszódnak le fény hatására. Ismeretes, hogy retinogrammokban, rod outer segmenteken és bizonyos rodopszint tartalmazó modell rendszerekben [5, 18, 36, 2] a flash gerjesztés után azonnal megjelenő két fázisú elektromos jelet lehet észlelni. A jelet korai receptor potenciálnak nevezik (ERP, early receptor potential). A jelek alakra megegyeznek a bakteriorodopszin PERS I. és II. komponensével (14. ábra). CONE kimutatta azt is [5], hogy a meta II. rodopszin formát (amely a bakteriorodopszin M_{412} formájának a megfelelője) megvilágítva nagy ellenkező előjelű ERP jelenik meg (itt is két komponens található). A két komponens pH és hőmérséklet függvényében különbözőképpen változik, pl. az ERP második komponense a csökkenő hőmérséklet hatására eltűnik.

Minthogy a [2] dolgozatban közölt eredmények szerint rodopszint és bakteriorodopszint tartalmazó membránrendszerekben fény hatására hasonló módon, hasonló előjelű membrán potenciál keletkezik, nyilvánvalónak látszik, hogy mindkét esetben fény hajtotta protonpumpa dolgozik.

Nagyon valószínűnek tartjuk a fentiek alapján, hogy az ERP nem más mint a rodopszin molekula PERS jelének első két komponense. Kvantitatív értékelésre ebben az esetben is a (14) egyenletet kell használni. Minden további nélkül megérthetjük az ERP második komponensének az eltűnését: pH változásra és hőmérséklet csökkenésre a komponens élettartama (τ_2) nő, a rate konstans k_2 csökken, ezért az amplitúdó is csökken és beleolvad a zajba.

A 2c. részben mondottuk, hogy a BR molekula tekinthető az élővilág legegyszerűbb protonpumpájának. További munkával, a jelen mérésben használt újszerű kísérleti módszerek továbbfejlesztésével elérhető, hogy PERS jeleket mérhessünk tilakoid és mitokondrium membránok esetében is.

A PERS az eddigi vizsgálatok alapján a fehérje működésének jelzője amelynek a megfigyeléséből értékes információkat nyerhetünk a belső történésekről. A PERS jel esetleges élettani jelentőségéről további vizsgálatok alapján lehet meggyőződni. Ezt a kérdést HONG is tárgyalja az ERP-jellel kapcsolatban [18].

A neuronális membránokon a Na és K csatorna nyílásával korreláltan ún. kapu áramot (gating current) figyeltek meg [14], amelyet úgy értelmeznek, hogy dipólok mozdulnak el, és ezek kapacitív áramot keltenek. Nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a gating current is a PERS egyik megnyilvánulása.

Ezt úgy értelmezhetjük, hogy a gerjesztő áram a membránon nagy elektromos teret hoz létre, amely a 4. részben leírt módon a fehérjék elektromos dipóllal rendelkező részeit, vagy az egész fehérjét mozgásra kényszeríti. Ennek

következtében csatornák nyílhatnak, zárulhatnak stb. A töltött részek mozgása PERS típusú jelet indukál.

A dolgozatban leírtunk egy újszerű kísérleti módszert. Ez abban áll, hogy membrán darabokat elektromos térrel bizonyos időre orientáltunk és az orientált mintákon végezünk további kísérleteket. A módszer fontos jellemzője az, hogy a membránok minden további kezelés (liposzóma építés, modell membránhoz való ragasztás stb.) nélkül állanak a kísérletező rendelkezésére. Kiegészítő mérésekkel meg lehet győződni a membránok mennyiségéről, méreteloszlásáról (pl. fényszórással) orientáltsági fokáról. Várható tehát, hogy a különböző jellegű mérések kvantitatívvá tehetők. Úgy véljük, hogy a módszer jól alkalmazható membránhoz kötött fehérjék működésének és bizonyos esetekben szerkezetének a tanulmányozására.

9. Köszönetnyilvánítások

A dolgozatban leírt munkák bizonyos fázisaiban közvetlenül részt vettek Ormos Pál és Dancsházy Zsolt; segítséget nyújtottak az elektronika terén Tóth Ferenc (KFKI) és Gárgyán József, a számításokban Fajszi Csaba és Pósfai János. Valamennyiüknek köszönetet mondok. A munkákat részben támogatta az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság.

IRODALOM

1. Applebury, M. L., Peters, K. S. and Rentzepis, P. M.: Biophys. J. **23,** 375 (1978).
2. Bolshakov, V. I., Drachev, A. L., Drachev, L. A., Kalamkarov, G. R., Kaulen, A. D., Ostrovskii, M. A. and Skulachev, V. P.: Dokl. Akad. Nauk, USSR **249,** 1462 (1979).
3. Boyer, P. D.: Ann. Rev. Biochemistry 957 (1978).
4. Cherry, R. J.: Biochim. Biophys. Acta **559,** 289 (1979).
5. Cone, R. A.: Science **155,** 1128 (1967).
6. Dancsházy, Zs., Drachev, L. A., Ormos, P., Nagy, K., and Skulachev, V. P.: FEBS Letters **96,** 59 (1978).
7. Dancsházy, Zs., Marden, M. C. and Keszthelyi, L.: to be published.
8. Drachev, L. A., Kaulen, A. D. and Skulachev, V. P.: FEBS Letters **87,** 161 (1978).
9. Eisenbach, M., Weissmann, Ch., Tanny, G. and Caplan, R. S.: FEBS Letters **81,** 77 (1977).
10. Evans, R. D.: The Atomic Nucleus, pp. 470, McGrow-Hill, London, New York, Toronto.
11. Fredericq, E. and Houssier, C.: Electric Dichroism and Electric Birefringence, Clarendon Press, Oxford (1973).
12. Gangliano, A. G., Geacintov, N. E. and Breton, J.: BBA **461,** 460 (1977).
13. Geacintov, N. E., van Nostrand, F., Becker, J. F. and Tinkel, J. B.: BBA **267,** 65 (1972).
14. Gilly, W. F. and Armstrong, C. M.: Biophys. J. **29,** 485 (1980).
15. Govindjee, Rajni and Govindjee: Sci. American, December p. 68 (1974).
16. Hess, B. and Kuschmitz, D.: FEBS Letters **100,** 334 (1979).
17. Heyn, M. P., Cherry, R. J. and Müller, U. J.: Mol. Biol. **117,** 607 (1977).
18. Hong, F. T.: Bioelectrochem. and Bioenerg. **5,** 425 (1978).
19. Hong, F. T. and Montal, M.: Biophys. J. **25,** 465 (1979).
20. Kalisky, O., Lachish, U. and Ottolenghi, M.: Photochem. Photobiol. **28,** 261 (1978).
21. Karvaly, B. and Dancsházy, Zs.: FEBS Letters **76,** 36 (1977).
22. Keszthelyi, L.: BBA. **598,** 429 (1980).

23. KESZTHELYI, L. and ORMOS, P.: FEBS Letters **109,** 189 (1980).
24. KORENSTEIN, R. and HESS, B.: FEBS Letters **89,** 15 (1978).
25. LITVIN, F. F. and BALASHOV, S. P.: BIOFIZIKA **22,** 1111 (1977).
26. LOZIER, R. H., BOGOMOLNI, R. A. and STOECKENIUS, W.: Biophys. J. **15,** 955 (1973).
27. LURIA, S. H.: Sci. American, December **30,** p. 30 (1975).
28. MITCHELL, P.: Nature **191,** 144 (1961).
29. OESTERHELT, D. and STOECKENIUS, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70,** 2852 (1973).
30. ORT, D. R. and PARSON, W. W.: Biophys. J. **25,** 341 (1979).
31. OVCHINNIKOV, Yu. A., ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. Yu., KISELEV, A. V. and LOBANOV, N. A.: FEBS Letters **100,** 219 (1979).
32. SHINAR, R., DRUCKMANN, S., OTTOLENGHI, M. and KORENSTEIN, R.: Biophys. J. **19,** 1 (1977).
33. SIMONYI, K.: Physikalische Elektronik, Teubner, Stuttgart pp. 649 (1972).
34. SINGER, S. J. and NICOLSON, R. L.: Science **175,** 720 (1972).
35. STOECKENIUS, W., LOZIER, R. H. and BOGOMOLNI, R. A.: Biochim. Biophys. Acta **505,** 215 (1979).
36. TRISSL, H.-W.: Photochem. Photobiol. **29,** 579 (1979).
37. TRISSL, H.-W. and MONTAL, M.: Nature **266,** 655 (1977).
38. WITT, H. T.: Biochem. Biophys. Acta **505,** 355 (1979).
39. WITT, H. T. and ZICKLER, A.: FEBS Letters **37,** 307 (1973).

SZERKEZETI ÁTALAKULÁSOK LIPIDMEMBRÁNOKBAN

GYÖRGYI SÁNDOR

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest

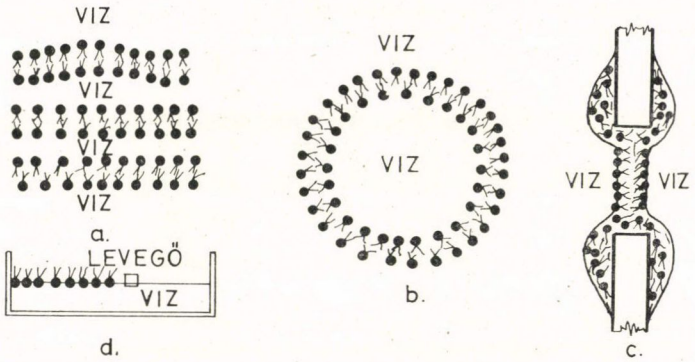
A biológiai membránok működésében, a transzportfolyamatok szabályozásában meghatározó szerepet játszó mechanizmusok közül ezúttal a *lipidrétegben* végbemenő *szerkezeti változásokat* emeljük ki és jelentőségüket, elsősorban hazai eredmények ismertetésével szemléltetjük. A kérdés gyakorlati jelentőségét aláhúzza az a tény, hogy olyan tulajdonságok, mint a membrántranszport, a gyógyszerhatás, az ingerület terjedése, vagy éppen a hidegtűrés befolyásolható a membrán-lipidek strukturális állapotával.

1. A „fluid mozaik" szerkezetű membránból most tehát a folyadékkristály tulajdonságot mutató, dinamikus szerkezetű lipidrétegre szűkítjük tárgyalásunkat. Ennek legtöbb tulajdonsága jól tanulmányozható az ún. *modellmembránok* segítségével és — ami ugyancsak fontos — a kapott eredmények nemcsak elvileg, de sok vonatkozásban gyakorlati szempontból is érdekesek.

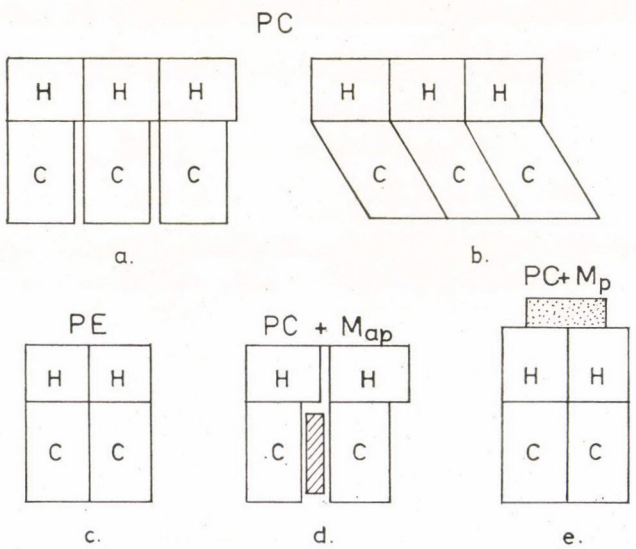
Ha sejtmembránokból kivont lipideket vízzel, elektrolittal hozzuk össze, akkor a lipid/víz aránytól, ill. a kezelés módjától függően különböző elrendeződések jöhetnek létre (NAGLE és SCOTT, 1978) (l. 1. ábra). Az amfipatikus karakterű, poláris fejcsoportot és apoláris szénhidrogén láncot tartalmazó foszfolipid molekulák alkothatnak ún. *multilamelláris rendszert* (1a. ábra), egyszeres, vagy többszörös kettősréteggel körülvett *vezikulákat* (ún. liposzómákat (1b.)), amelyek különösen transzport vizsgálatra előnyösen használhatók. Előállíthatók *sík bimolekuláris* rétegek is kb. 1—2 mm átmérőjű nyíláson (1c.). Külön típust jelent a monomolekuláris film (1.d.), amely mint fél kettősréteg, ugyancsak alkalmas egy sor membrán-tulajdonság vizsgálatára.

1.1 A lipid—víz rendszerek szerkezete — fázisállapota — adott körülmények (hőmérséklet, koncentráció, pH stb.) között is függ a lipidmolekulák típusától, és adalékanyagokkal megváltoztatható. A 2. ábra NAGLE (1976), ill. MCINTOSCH (1980) alapján azt szemlélteti, hogy mivel foszfatidilkolin (PC) esetén (ez a membránok egyik fő és ezért legtöbbet vizsgált, foszfolipid komponense) a fejcsoport térigénye nagyobb, mint a szénhidrogén láncok keresztmetszete (a), a láncok közötti van der Waals erők érvényesülése szempontjából energetikailag kedvezőbb, ha a láncok megdőlnek (b). Foszfatidiletanolamin (PE) esetén a kisebb fejcsoport átmérő miatt erre a dőlésre nincs szükség

(c). Az ábra egyúttal azt is szemléleti (d. és e.), hogy a membrán apoláris fázisába bevitt apoláris (M_{ap}), vagy a fejcsoportokkal kölcsönható poláris (M_p) *módosító anyagok hatás*ára megváltozhat a fázisállapot. Mindkét típusú kölcsönhatás felléphet a membránműködést befolyásoló anyagok hatásának kiala-



1. ábra. Példák a lipid-víz rendszerekre: a) multilamelláris rendszer, b) vezikula, c) sík bimolekuláris membrán (BLM), d) monomolekuláris réteg (NAGLE és SCOTT 1978)

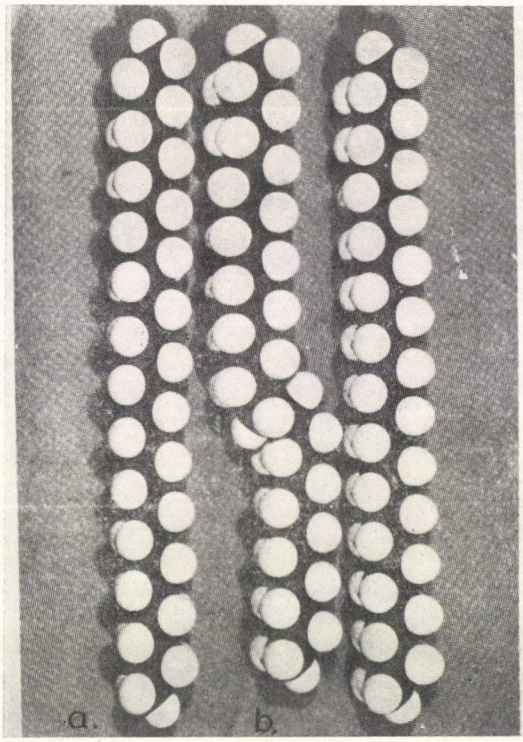


2. ábra. Módosítatlan és módosított lipidrétegek szerkezetének vázlata: PC: foszfatidilkolin, PE: foszfatidil-etanolamin, M_{ap} (apoláris), M_p (poláris) módosítóanyagok elhelyezkedése és hatása a membrán szerkezetére (MCINTOSH 1980)

kulása során. A lipid kettősréteg ezen *intermolekuláris rendjének* megzavarása a membránfunkció jelentős megváltozását vonja maga után.

1.2 A szerkezeti változások másik, funkcionális szempontból hasonlóan fontos típusát jelentik az ún. *intramolekuláris* konformációváltozások, a transz-

gauche átmenetek. A fázisátalakulási hőmérséklet alatt a szénhidrogén láncok kinyújtott állapotban ún. all transz konfigurációban találhatók (3.a. ábra). Energiafelvétellel egy vagy több kötés $\pm 120°$-os elfordulással gauche állapotba kerülhet (ehhez $\sim$ 2 kJ/mól energia szükséges) és a láncban egy, vagy több törés jön létre (3.b. ábra). Egy gauche állapot, különösen a fejhez közelebb, nagyon megnövelné a molekula helyigényét, ezért a 2. ill. 4 gauche-t tartal-

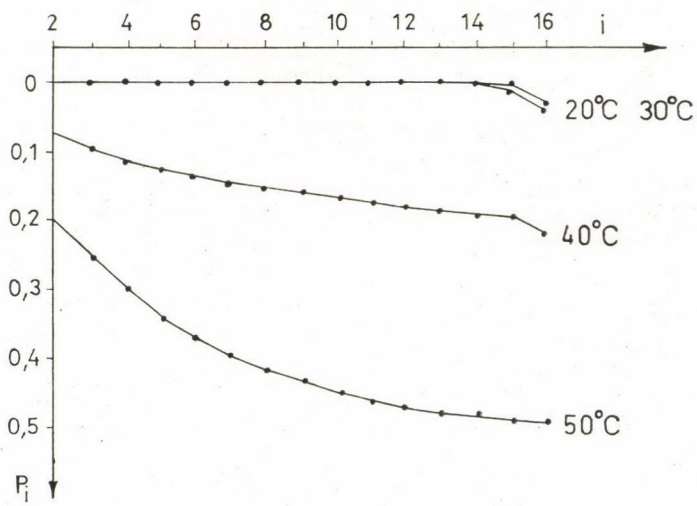


3. ábra. Foszfolipidek apoláris szénhidrogén láncainak két lehetséges konformációs állapota: a) nyújtott (all transz), b) megtört (gauche)

mazó ún. 2g, ill. 4g állapot a valószínűbb, ami két, ill. három oldalról zárt hibahelyet *(kinket)* eredményezhet. Könnyen belátható, hogy a gauche szám, azaz a kink koncentráció növekedésével a membrán átjárhatósága is megnő, s a permeabilitás növekedés számos transzportfolyamat sebességének megemelkedését vonja maga után.

2. Az inter- vagy intramolekuláris szerkezetváltozások *kvantitatív leírása* és ennek révén a funkcióban létrejött módosulások értelmezése különösen összetett, többkomponensű rendszereknél meglehetősen bonyolult feladat, egykomponensű modellrendszerek esetén azonban könnyebben megoldható. Egy ilyen *statisztikus mechanikai modellt* dolgozott ki intézetünkben SUGÁR — a

nematikus folyadékkristályok elméletéből kiindulva — a foszfolipid kettősrétegben külső elektromos tér, ill. hőmérsékletváltozás hatására lejátszódó szerkezeti átalakulások molekuláris szintű értelmezésére (SUGÁR 1979, SUGÁR, GYÖRGYI 1980). A modellben a membrán energiáját leíró Hamilton-függvény felírása során az irodalomban található modellekben szereplő tagok (fejcsoportok és szénhidrogén láncok közötti vonzó és taszító kölcsönhatási energia, valamint az intramolekuláris konformációs energia — a gauche állapotok energiája —) mellett az intramolekuláris deformációt (rugalmassági energiát),



4. ábra. A gauche állapot valószínűsége dipalmitoil-foszfatidilkolin (DPPC) szénhidrogén láncának különböző szénatomjánál 20, 40 és 50°C-on. Az *i* a fejcsoporttól számított sorrendet jelzi

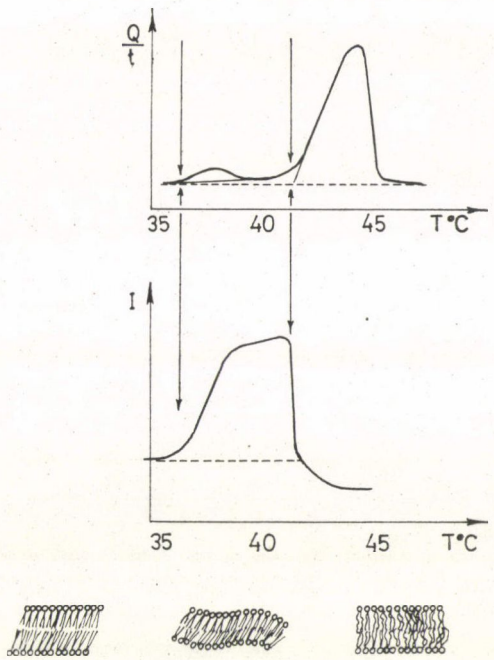
ill. az elektrosztatikus tér—membrán kölcsönhatást is figyelembe vette. Ennek alapján kimutatta, hogy a külső elektromos tér elektromechanikai nyomása révén kiválthatja a membrán struktúra megváltozását, a membrán permeabilitás elektromos tér hatására bekövetkező megnövekedését.

A modell alapján *kiszámítható* volt a transz-gauche átmenetek száma különböző hőmérsékleteken és eredményül a kísérleti adatokkal (YELLIN és LEVIN 1977) megegyező értékeket kaptunk. Meghatároztuk a gauche képződés valószínűségét a láncok különböző mélységeiben (4. ábra). Az eredmények szerint pl. a dipalmitoil-foszfatidilkolin (DPPC) fázisátalakulási hőmérséklete alatt főleg all transz állapotok találhatók, legfeljebb a lánc végén jöhet létre egy-egy gauche állapot, a fázisátalakulási hőmérséklet közelében (35—40 °C-on) átlagosan 1 gauche/lánc, felette 4—5 gauche/lánc érték adódik.

Az elméleti meggondolások és számítások alapján a lipidmembránok hőmérséklet indukálta fázisátalakulására az eddigiektől eltérő értelmezést adtunk, amit az jellemez, hogy fázisátalakuláskor az intramolekuláris és inter-

molekuláris rend együttes csökkenése jön létre és az ilyenkor tapasztalt permeabilitás növekedésnek kb. 50%-a kinkképződésre vezethető vissza, míg a második 50% az intersticiálisan átjutott molekulákból, ionokból adódik.

3. A módosítatlan, vagy különböző anyagokkal módosított lipidmembránok szerkezeti átalakulásának kvantitatív jellemzésére legtöbbször az átalakulási hőmérsékletet és entalpiát használják. Míg ez utóbbi mérésére a *mikro-*

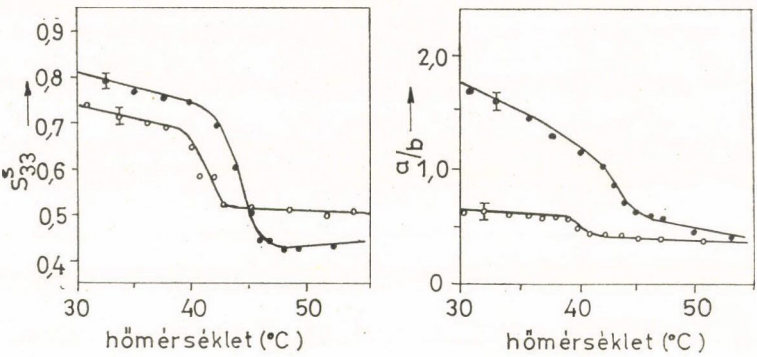


5. ábra. DPPC-víz rendszer elő- és fő-fázisátalakulását jelző differenciál szkening kalorimetriás (felső görbe), ill. termo-depolarizációs analízissel kapott görbe. Alul: a különböző hőmérsékleti intervallumokhoz tartozó szerkezetek vázlata

kalorimetriás módszerek használhatók, az átalakulási hőmérséklet meghatározására minden olyan eljárás alkalmazható, amelynek segítségével az intra- vagy intermolekuláris rendben beálló változás detektálható (optikai, mágneses rezonancia spektroszkópia, diffrakciós módszerek).

3.1. Az 5. ábra felső részén a dipalmitoil-foszfatidilkolin (DPPC) immár klasszikusnak számító differenciál szkening kalorimetriás (DSC) görbéje látható, amelyen a nagyobb maximum a fő (v. Chapman-féle) fázisátalakulást mutatja, az előtte levő kisebb maximum pedig egy kb. 36 °C-nál kezdődő fázisátalakulást jelez. Ez utóbbi az ún. *pretransition* vagy elő-fázisátalakulás. Az ábra alján levő sematikus rajzok szemléltetik az egyes fázisállapotokhoz tartozó szerkezeteket.

Az ábra közepén ugyanezen DPPC/víz rendszer termodepolarizációs analízissel (TDA) felvett fázisátalakulási görbéje látható. Az eddig csak termotrop rendszereknél használt módszert — a lipidrétegek folyadékkristályos tulajdonságára, a liotrop és termotróp rendszerek hasonlóságára alapozva — Szabon (KFKI) alkalmazta először foszfolipid modellrendszereink vizsgálatára (Szabon 1979). Lényege, hogy szerkezetváltozás hatására ugrásszerűen megváltozik a mintán átjutott depolarizált fény intenzitása. Lényeges előnye a TDA módszernek, hogy a költségesebb DSC-vel is nehezen mérhető elő-fázisátalakulás szelektíven követhető vele. Mindkét módszert használjuk a vizsgált



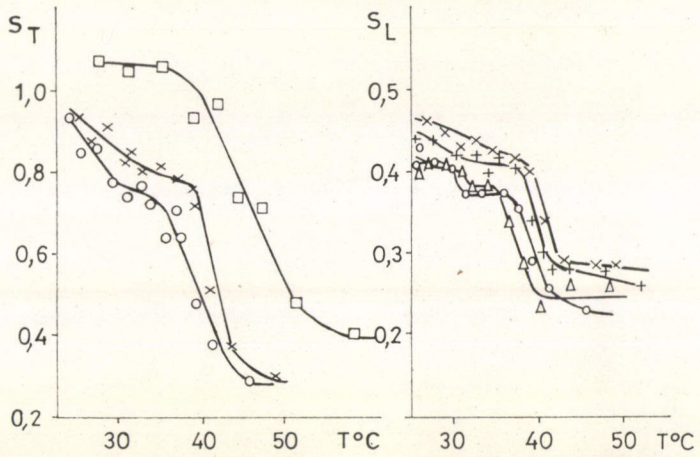
6. ábra. Az ESR transz (S^s_{33}) rendparaméter és a rotációs diffúziós sebességgel arányos jellemző (a/b) hőmérsékletfüggése módosítatlan (o), ill. hexadekanollal módosított (.) DPPC membrán esetén (Horváth és mtsai 1980)

rendszereink termodinamikai paramétereinek meghatározására, a membránműködést módosító anyagok hatásának jellemzésére.

3.2. A lipidmembránokban végbemenő szerkezeti átalakulások vizsgálati lehetőségeit két további példával illusztráljuk. Horváth (SZBK Biofizikai Intézete) módosítatlan és módosított DPPC membránok ESR vizsgálata során kimutatta (l. 6. ábra), hogy mind az intramolekuláris rendet jellemző S^s_{33} (transz) rendparaméter, mind pedig a rotációs diffúziós sebességgel arányos a/b adat érzékenyen változik a DPPC fázisátalakulásakor ($\sim$ 42 °C-on), valamint, hogy az apoláris karakterű hexadekanol (0,5 mól %) eltolja (megnöveli) a fázisátalakulási hőmérsékletet, miközben mindkét rendparaméter hőmérsékletfüggése változik (Horváth és mtsai 1980). A zsírsavláncok közé beilleszkedő alkoholmolekulák növelik a van der Waals kölcsönhatást, árnyékolják a fejcsoportok taszító hatását (l. 2. ábra), s így növelik T_m értékét.

3.3. Hasonlóan érzékeny módszer a fázisátalakulások követésére a *lézer-Raman spektroszkópia.* A spektrális adatok alapján számolt, az intra- és intermolekuláris strukturális állapotot jellemző transz (S_T) és laterális (S_L) rendparaméterek hőmérsékletfüggését mérve a fázisátalakulás, ill. módosító anya-

gok hatása kimutatható. A 7. ábrán LOSCHILOVA (SZBK Biofizikai Intézet) eredményei láthatók, aki KARVALY Bélával együtt kimutatta, hogy többek között, a Ca^{++} jelentősen módosítja a DPPC/víz rendszerek esetében mért Raman transz rendparamétert (S_T) és kisebb mértékben ugyan, de a laterálist (S_L) is (LOSCHILOVA és KARVALY 1978, LOSCHILOVA 1980). Jól látható, hogy nagyobb Ca^{++} koncentrációnál (X: 100 mM, □: 1 M, +: 10 mM) nő az átalakulási hőmérséklet, ugyanakkor eltűnik az elő-fázisátalakulás. A Ca^{++} stabilizáló hatásával kapcsolatban is a 2. ábrára hivatkozunk.



7. ábra. Ca^{++} hatása DPPC-víz rendszer Raman transz (S_T) és laterális (S_L) rendparaméterére a fázisátalakulási hőmérséklet környezetében (○: kontroll, △: 1 mM, +: 10 mM, ×: 100 mM, □: 1 M Ca^{++} koncentráció esetén) (LOSCHILOVA 1980)

3.4. A lipidmembránokban adalékanyagokkal kiváltott *szerkezeti átalakulás* és az ennek eredményeképpen a *membránműködésben* (transzportban) *létrejövő változás* közötti kapcsolatot jól szemléltetik azok az eredmények, amelyeket intézetünkben Szőgyi Mária, Szabon Jánossal és Cserháti Tiborral együttműködésben kapott. Kísérleteikben egy nemionos felületaktív anyag, a nonilfenil-etilénoxid különböző nagyságú hidrofil részt, de azonos hidrofób láncot tartalmazó származékainak hatását vizsgálták DPPC liposzóma fázisátalakulási paramétereire és ^{42}K permeabilitására. Megállapították, hogy a gyógyszerformulálásban is használt, amfipatikus karakterű vegyület hatására csökken az átalakulási entalpia és az átalakulási hőmérséklet — azaz lazult a szerkezet. A permeabilitási adatok az I. táblázatban láthatók. A jobboldalon az egyik vegyületnek a kontrollhoz képest mintegy 8-szoros permeabilitást eredményező hatása (20 °C-on), míg a baloldalon a homológ sor különböző számú poláris csoportot tartalmazó tagjainak (n = 4, 6, 9, 13, 30) permeabilitás növelő hatása látható 42 °C-on, azaz a fázisátalakulás hőmérsékletén. A változás itt

1. táblázat

DPPC liposzóma ^{42}K kiáramlását jellemző permeabilitási állandók (p) különböző (n) számú etilénoxid csoportot tartalmazó nonil-fenil-eliténoxid vegyületek esetében

42 °C		20 °C
p_k	$= 5{,}2 \cdot 10^{-10}$ cm/s	$0{,}5 \cdot 10^{-10}$ cm/s
p_{n-4}	$= 5{,}3 \cdot 10^{-10}$ cm/s	
p_{n-6}	$= 9{,}0 \cdot 10^{-10}$ cm/s	$4{,}1 \cdot 10^{-10}$ cm/s
p_{n-9}	$= 12{,}0 \cdot 10^{-10}$ cm/s	
p_{n-13}	$= 8{,}2 \cdot 10^{-10}$ cm/s	
p_{n-30}	$= 6{,}0 \cdot 10^{-10}$ cm/s	

is szembetűnő, valamint az is, hogy a hatás nem lineáris függvénye a poláris csoportok számának, hanem a közepes értékeknél (n = 6, 9) a legnagyobb. Hasonló jellegű nonlinearitás tapasztalható a vegyületek lipofilitásában és biológiai hatékonyságában is, s mindez korrelációban van a DSC-vel mért termodinamikai paraméterek változásával.

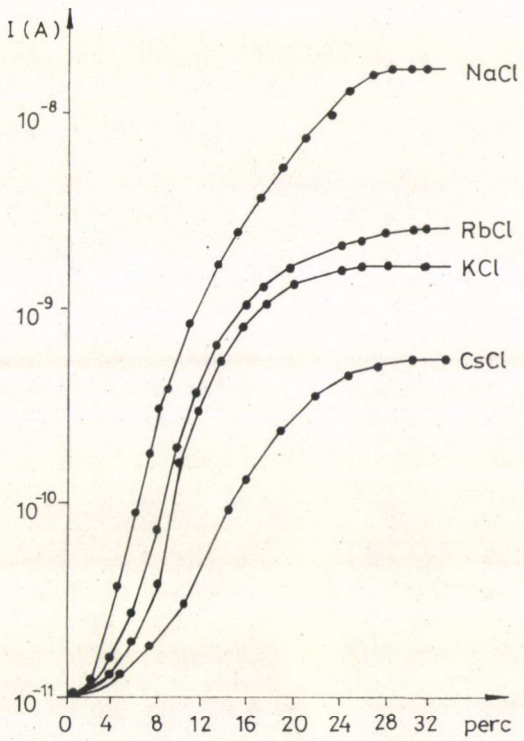
A módszer egyébként jól alkalmazható membránra ható vegyületek hatáserősségének kvantitatív jellemzésére és összehasonlítására — általában a szerkezet-hatás vizsgálatokban. Hasonló jellegű vizsgálatokkal mutatott ki intézetünkben Szőgyi, Tarján és Tamás (1980) szoros korrelációt négy különböző antibiotikum baktericid hatása és membránokon kiváltott permeabilitás növelő hatás között.

3.5. A lipidmembránban létrehozott szerkezetváltozások vizsgálatának és a kölcsönhatás értelmezésének az előzőekhez hasonlóan alkalmas modellrendszere a sík bimolekuláris lipidmembrán (BLM) is. A BLM elektromos paramétereiből (áram-feszültség karakterisztika, vezetőképesség) értékes kvalitatív és kvantitatív információk nyerhetők. A 8. ábrán — (intézetünkben Blaskó mérései Horváth kezdeményezésére) egy új antibiotikum, a primycin hatását szemléltetjük foszfatidilszerinből készült BLM vezetőképességére különböző alkáliionok jelenlétében (Blaskó és mtsai 1979). A görbék egyrészt szemléltetik a permeabilitást növelő hatás szelektív voltát, másrészt az időfüggés jellegéből, valamint a parallel vörösvérsejteken is elvégzett egyéb vizsgálatok eredményeiből arra lehet következtetni, hogy az amfipatikus karakterű molekula először elektrosztatikus kölcsönhatás révén kötődik a BLM-hez és csak bizonyos idő után jut be a hidrofób részével a szénhidrogén láncok közé. Az ábrán látható vezetőképesség növekedést főleg ez utóbbi lépés okozza, de a fejcsoportokkal való kölcsönhatás is jelentős, amit az is bizonyít, hogy a permeabilitás növelésével egyidőben a primycin fokozza a membrán mechanikai stabilitását (kb. hasonló mechanizmus szerint, mint a Ca^{++}).

3.6. Végül még egy gyakorlati jelentőségű példa. Szegedi kutatók összefüggést találtak többek között egyes búzafajok hidegtűrése és a növényi sejt-

membrán lipidrétegének termodinamikai sajátosságai között, ill. a rizs hidegtűrőképessége és a gyökérsejtek alkáliion transzportja között (VIGH és mtsai 1979, ERDEI és ZSOLDOS 1977).

4. Az előzőekben rövid áttekintést adtunk a membrán-biofizikai kutatások egyik fontos területéről, amely szerte a világon, így hazánkban is, az utóbbi időben indult rohamos fejlődésnek. A bemutatott példák jelzik a kutatás



8. ábra. Primycin hatása foszfatidilszerinből készült BLM vezetőképességére különböző alkáliionok jelenlétében. A görbék a 40 mV-nál mért áramerősség értékeket mutatják a primycin hozzáadástól számított idő függvényében

jelenlegi helyzetét és a további vizsgálatok irányát, egyúttal azt is szemléltetik, hogy az általunk alkalmazott módszerek alkalmasak egyrészt a lipidmembránra gyakorolt hatás és közvetve a biológiai hatékonyság kvantitatív jellemzésére, másrészt a hatásmechanizmus felderítésére. Meg kell mondani azonban, hogy az ismertetett kutatások gyakorlati jelentőségének felismerése mindezidáig elsősorban a membrán transzporttal foglalkozó kutatók részéről merült fel. Kívánatos volna, ha ez a törekvés a gyakorlati szakemberek kifejezettebb igényével találkozna.

IRODALOM

Blaskó, K., S. Györgyi, I. Horváth: J. Antibiotics **32,** 408—413 (1979).
Erdei, L., F. Zsoldos : Physiol. Plant. **41,** 99—104 (1977).
Horváth, L. I., J. Cirák, L. Vigh: Chem. Phys. Lipids. **27,** 237—250 (1980).
Loschilova, E., B. Karvaly: Biochim. Biophys. Acta **514,** 274—285 (1978).
Loschilova, E.: Liquid Crystals, Research and Applications. Proc. III. Liquid Crystal Conference, Akadémiai Kiadó, Budapest (1980). megjelenés alatt.
McIntosh, T. J.: Biophys. J. **29,** 237—246 (1980).
Nagle, J. F.: J. Membrane Biol. **27,** 233—239 (1976).
Nagle, J. F., H. L. Scott: Physics Today, Febr., 38—46 (1978).
Sugár, I. P.: Biochim. Biophys. Acta **556,** 72—85 (1979).
Sugár, I. P., S. Györgyi: Liquid Crystals, Research and Applications. Proc. III. Liquid Crystal Conference, Akadémiai Kiadó, Budapest (1980). megjelenés alatt.
Szabon, J.: Liquid Crystals, Research and Applications. Proc. III. Liquid Crystal Conference, Akadémiai Kiadó, Budapest (1980) megjelenés alatt.
Szőgyi, M., I. Tarján, Gy. Tamás: Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. **15,** 57—63 (1980).
Vigh, L., I. Horváth, L. I. Horváth, D. Dudits, T. Farkas: FEBS Letters **107,** 291—294 (1979).
Yellin, N., Levin, I. W.: Biochem. **16,** 642—647 (1977).

AZ IDEGSEJT ELEKTROMOS AKTIVITÁSA

SALÁNKI JÁNOS

MTA Biológiai Kutatóintézete, Tihany

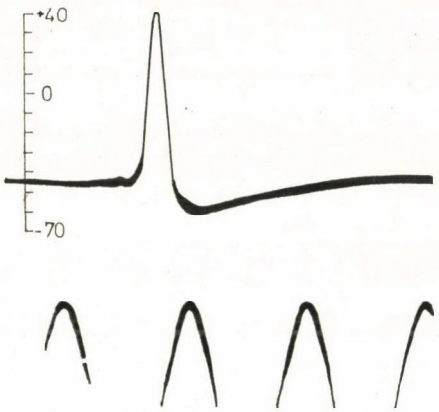
Az idegrendszert alkotó funkcionális egységek legjellegzetesebb, és az aktuális működés szempontjából legfontosabb elemei az idegsejtek, melyek egymás közötti bonyolult kapcsolata hozza létre a neuronhálózatot. A szabályozás — egyszerű és kivételes esetektől eltekintve — nem egy-egy neuron, hanem e neuronrendszerek, hálózatok tulajdonsága, mégis az egyes sejt működése és e működést meghatározó sajátosságok döntőek az egész idegi folyamat szempontjából. A korábbi felfogással szemben, mely valemannyi neuron működési mechanizmusát nagyjából azonosnak vélte, az utóbbi két évtizedben vált nyilvánvalóvá, hogy még a morfológiailag azonosnak tetsző idegsejtek ingerületi tulajdonságai között is alapvető különbségek lehetnek. Tisztázódott, hogy az idegi szabályozás nemcsak a neuroncsoportok rendezettségétől, a kapcsolatok milyenségétől, a szummáció, serkentés és gátlás folyamatától, hanem az egyes elemek ennél specifikusabb tulajdonságaitól is függ, és általánossá vált az a felfogás, hogy az ingerületi mechanizmus jellegzetességeit meghatározó tulajdonságok a neuronok membránjához kötöttek.

A neuronműködés biofizikai megközelítése abból indul ki, hogy az idegsejt alapvető funkcionális szerepe annak elektromos aktivitásával, nevezetesen idegimpulzusok keltésével, felvételével és továbbításával kapcsolatos, következésképpen az idegsejtek specifikumait az ingerületgenerálás intim folyamatainak tisztázásával lehet leírni.

Az ingerületi folyamatokkal nem foglalkozó biológusok előtt is jól ismert a működési áram HODGKIN és munkatársai által 30 évvel ezelőtt kidolgozott és azóta sokoldalúan alátámasztott ion-elmélete. Ennek lényege az, hogy az idegsejt elektromos aktivitása egyfelől az ingerlékeny sejten belüli és membránján kívüli ionkoncentráció különbségen, azaz elektrokémiai gradiensen, másrészt a neuronmembrán időleges és helyreállítódó (regeneratív) permeabilitásváltozásán alapszik és nem más, mint töltéssel rendelkező ionok időhöz kötött áramlása a sejtmembrán e célra szolgáló csatornáin keresztül. Az idegsejtbe vitt mikroelektródák lehetővé teszik a sejtmembrán két oldalán lejátszódó potenciálváltozások regisztrálását és e klasszikussá vált ábra (1. ábra) mutatja a nyugalmi potenciál megszünését, megfordulását, majd helyreállítódását, vagyis a működési áram lezajlását. Ez az az ingerületi jel, mely nem-csökkenő

módon végigfut az idegsejt nyúlványain és az idegi információ hordozójának szerepét tölti be.

A membránfeszültség rögzítésével, voltage-clamp technika alkalmazásával, a membránon átfolyó ionáramok közvetlenül mérhetők és megállapítható volt, hogy az összáram (2. ábra a) két komponensből tevődik össze, nevezetesen az ingerlés után majdnem azonnal induló, befelé irányuló, gyorsan inaktiválódó Na-áramból (2. ábra c) és egy némi késéssel induló, az ingerlés alatt nem inaktiválódó, kifelé irányuló K-áramból (2. ábra b). Ezek a mérések lehetővé tették a membrán számos fizikai paraméterének meghatározását is.

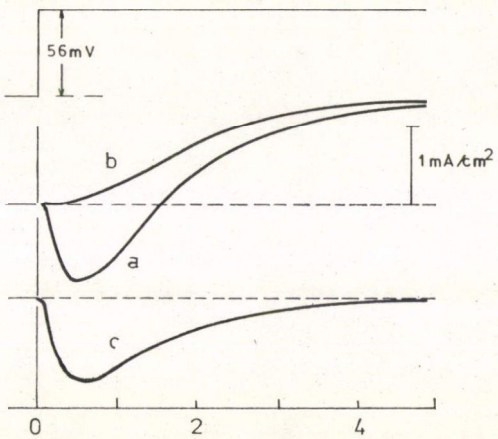


1. ábra. Izolált idegrostról intracelluláris elektródával elvezetett akciós potenciál. Ordináta: mV; időjel: 500 Hz. [2]

A kutatásoknak a klasszikus objektumról, a Loligo óriás axonjáról más preparátumokra történt kiterjesztése az ingerületgenerálás alapvető elvét, az ion-teóriát igazolta. Ugyanakkor azonban a vizsgálatok azt is feltárták, hogy a különböző idegsejtek ugyanazon faj idegrendszerén belül is nagyban eltérnek egymástól, mind a potenciálgenerálásban résztvevő ionokat, mind a membrán kémiai összetétele és felépítése által meghatározott állandókat, mind a felületi receptor struktúrákat és az intracelluláris mechanizmusokat illetően.

Az intimebb jelenségek megközelítésére és a potenciálképzés mechanizmusának tisztázására egyre bonyolultabb módszereket, vagy ötletes megoldásokat dolgoztak ki. Így egyebek mellett általánossá vált raffinált elektromos és kémiai ingerlési módok alkalmazása, a kapott jelek gépi úton történő programozott feldolgozása, továbbá működőképes neuronok izolálása membránjuk sajátosságainak tanulmányozására, valamint hegyezett elektródákkal viszonylag kicsiny, 15—30 μm-es sejtek penetrálása, anyagok dozírozott intracelluláris bevitele, intracelluláris ionkoncentrációk, enzimaktivitás, fluoreszcencia és emisszió mérése. Mindez számos új részismeret feltárását eredményezte.

A különböző neuronokon leírt, gyakorta szűk érvényességi körű membrán biofizikai felismerések neurobiológiába való integrálódásának legnagyobb akadálya jelenleg az, hogy gyakran nem tudjuk pontosan meghatározni az agy különböző területein elektrofiziológiailag vizsgált, különösen pedig az izolálásra került sejt idegrendszeren belüli helyét, kapcsolatait, funkcióját. Az egyidejű elektrofiziológiai, morfológiai, neurokémiai és farmakológiai identifikálás iránti igény világszerte előtérben áll és az utóbbi években egyre több eredmény született is néhány jólismert sejttípuson és különböző gerinctelen állatok ilyen



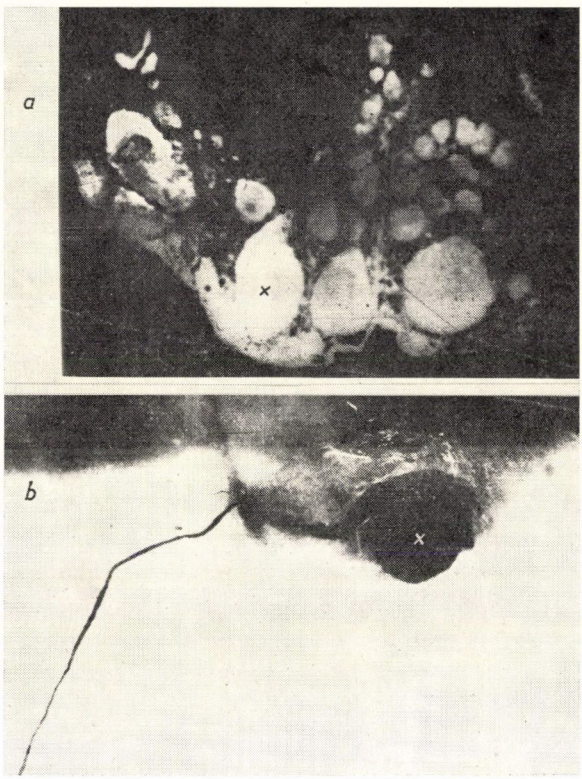
2. ábra. Ionáramok analízise feszültségrögzítési (voltage clamp) technikával. Ingerként 50 mV-os depolarizációt alkalmaztak. a — tengervízben tartott izolált idegrost ionárama ($I_{Na} + I_K$); b — ionáram Na-hiányos közegben (I_K); c;— az a és b különbsége, ami a Na-áramnak (I_{Na}) felel meg. Idő: msec. [3]

vizsgálatra különösen alkalmas óriássejtjein. Saját kutatásaink az utóbbiak körébe tartoznak és a most említésre kerülő, Vadász Istvánnal és Vehovszky Ágnessel kapott adataink a *Helix pomatia* (éti csiga) központi idegrendszerében identifikált RPal elnevezésű neuronra vonatkoznak. Ez morfológiailag és fiziológiailag pontosan azonosított neuroszekretoros sejt, melynek lokalizációja és axonális lefutása is ismert (3. ábra).

A neuronok elektromos aktivitásának generálásában az esetek többségében a Loligo-axonhoz hasonlóan a Na^+ sejtbe való belépése játssza a döntő szerepet. Az elmúlt évtized kutatásai azonban sok példát szolgáltattak arra, hogy az akciós potenciál felszálló szárának kialakításához a Ca^{2+} is hozzájárul, ill. vannak sejtek, amelyeken a működési áram kizárólag Ca-belépés eredménye. Az előbb említett, általunk vizsgált óriás neuron is kevert ionáramú, úgy azonban, hogy azon a Na-megvonás teljesen blokkolja a potenciálképzést, míg a Ca-megvonás a spontán képződő akciós potenciálok kb. 20%-os amplitúdó csökkenéséhez vezet. Ezt a mechanizmust KOSTYUK és munkatár-

sai számos nem identifikált, de izolált csiga neuronon részletesen is tanulmányozták és specifikus csatornagátlók alkalmazásával is bizonyították.

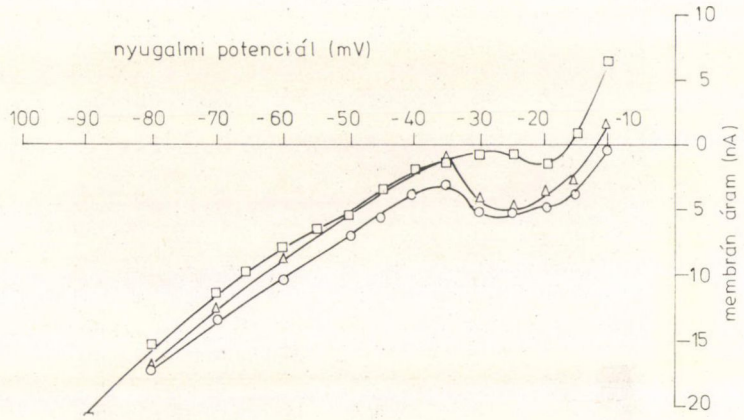
A Na és Ca-áram ugyanazon neuronon való együttes jelenléte nem jelenti azt, hogy ugyanazon feszültségtartományban és időlefutással zajlanak le. Bizonyítást nyert, hogy az ingerületi folyamat valamely diszkrét szakaszán az egyik, másik szakaszán a másik dominál, vagyis a Na és Ca-áram feszültség-



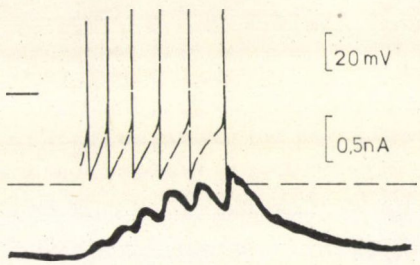
3. ábra. Helix pomatia L. bimodális pacemaker (RPal) sejtjének lokalizációja a jobb parietális ganglionban. a — fluorescens festék intracelluláris bevitele utáni metszet; b — $CoCl_2$ intracelluláris bevitele utáni átnézeti kép. [11]

függése nem azonos. Ilymódon az ingerület kialakulását két független komponens határozza meg, ami részben dinamikusabb folyamatot tesz lehetővé, részben pedig, minthogy a Ca-áram a Na-énál később indul és lassabban inaktiválódik, szelektíven biztosítja a membránpolaritástól függő potenciálforma létrejövetelét. A feszültség-áram görbén (4. ábra) jól látható ez a Ca-függő, Ca-hiányában erősen lecsökkenő, úgynevezett negatív ellenállású szakasz, mely a 10—35 mV-os nyugalmi potenciál tartományba esik. Ezen a szakaszon a membránpotenciál csökkenésével nem nő, hanem csökken a membrán vezető-

képessége, ami az akciópotenciál kialakulásának feltételeit rontja. A Ca-áram létét, nevezetesen a Ca sejtbe való belépését STINNAKRE és TAUC közvetlenül is kimutatták. Na-mentes közegben is működő neuronba fotoproteint (aequorin) vittek, ami a szabad Ca-szint emelkedésekor fényt emittál, s azt találták, hogy az akciós potenciálok alatt szabad Ca-szint növekedés jön létre a sejtben (5. ábra). Na-mal működő neuron esetén ez a jelenség nem volt megfigyelhető. A



4. ábra. Aplysia szakaszosan működő L3 neuronjának feszültség-áram görbéje tengervízben o-o-o; Ca^{2+}-mentes, 10 mMol/l Mn^{2+} tartalmú oldatban □-□-□; fiziológiás oldathoz való visszatérés után △-△-△. [4]

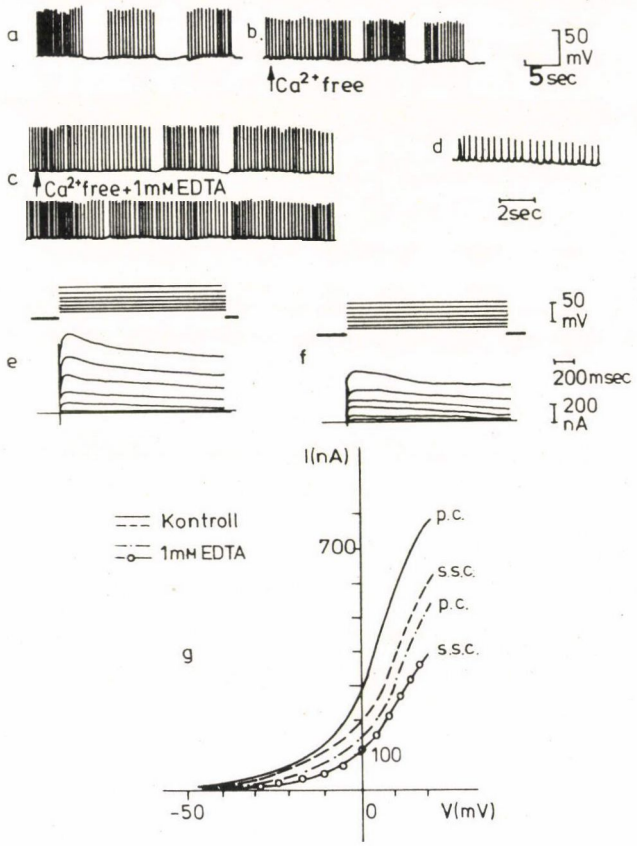


5. ábra. Ca-belépés közvetlen kimutatása Aplysia Na-hiányban is működő neuronján. Fent — akciós potenciál sorozat; lent — az intracellulárisan bevitt aequorin fényemissziója, ami az akciós potenciálokkal egybeeső intracelluláris szabad Ca-szint megnövekedését jelzi. [4]

Ca-áram jelenlétét és fontosságát leírták egyes transzmitterek, főleg szerotonin hatásának megvalósulásában is: egyes óriás neuronokon a Ca-tartalmú oldatban észlelt serkentő hatás nem alakult ki Ca-hiányban.

Helix korábban bemutatott bimodális pacemaker neuronján mi azt tapasztaltuk, hogy nemcsak az amplitúdó nagyságának meghatározásában van szerepe a Ca-nak, de a nyugalmi potenciálnak a bimodalitást meghatározó lassú hullámzásában is. Ca-mentes EDTA tartalmú közegben ugyanis teljesen eltűnnek az akciós potenciálsorok közötti hiperpolarizációs szakaszok, jóllehet,

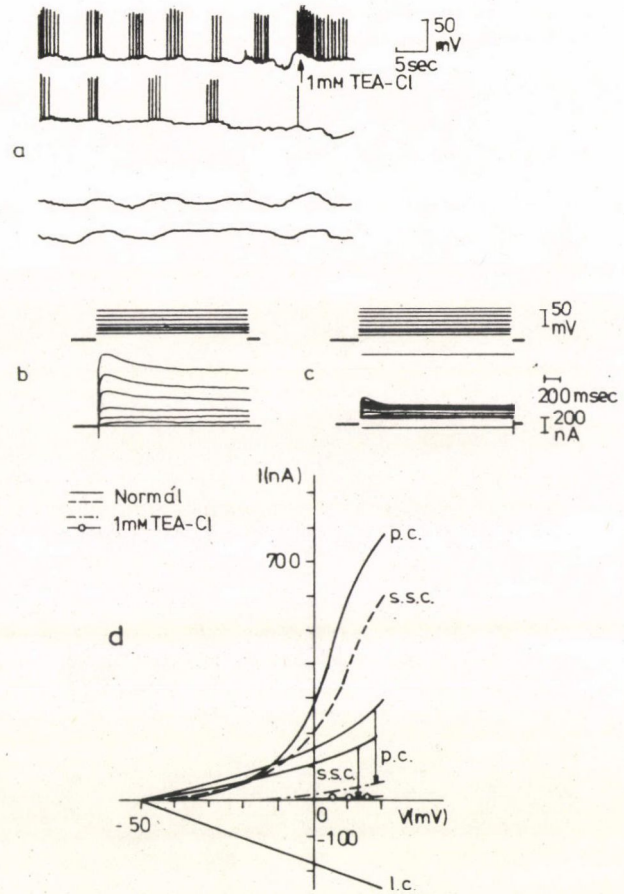
az ezt valószínűleg létrehozó K-vezetőképesség csak mintegy 30%-kal csökken (6. ábra). Ugyanakkor a K-csatornát blokkoló TEA alkalmazásakor a lassú hullámzás megmarad, míg a kifelé irányuló K-áram majdnem teljesen eltűnik (7. ábra). Mindez azt mutatja, hogy a Ca jelenléte szükséges a lassú hullám-



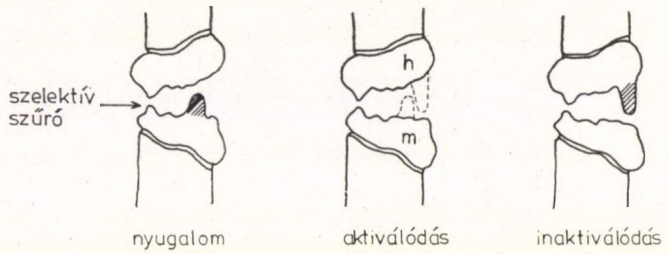
6. ábra. Helix RPal neuronjának működése fiziológiás sóoldatban (a); Ca-mentes oldatban (b); Ca-mentes, 1 mMol/l EDTA tartalmú oldatban (c, 10 perc mulva —d). A neuron ionáramai különböző depolarizációs szinteknél fiziológiás sóoldatban (e) és EDTA tartalmú oldatban (f). A kilépő (outward) áram nagysága a feszültség függvényében (g). p. c. — kezdeti (csúcs) áram, s. s. c. — állandósult áram. [15]

záshoz, de a TEA-val blokkolható K-csatorna nem azonos azzal, ami a lassú hullámzás hiperpolarizációs fázisáért felelős.

A membrán szelektív permeabilitását, az egyes ionok gradiens irányába történő áramlását az ionelmélet szerint szelektív ioncsatornák teszik lehetővé. Ezek a csatornák a membrán preformált, de csak időlegesen átjárható pórusai, melyek megnyílása, vagy záródása a membrán molekuláris szerkezetében vég-



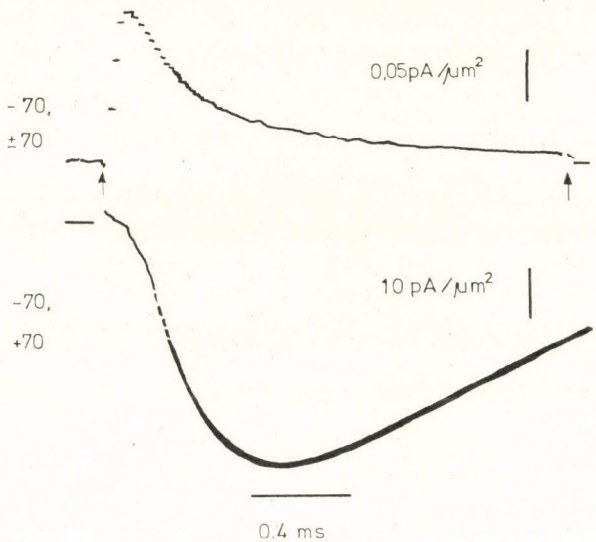
7. ábra. Tetraetilammónium hatása Helix RPal neuronjának működésére (a) (folyamatos regisztrálás). A neuron ionáramai különböző depolarizációs szinteknél fiziológiás oldatban (b) és 1 mMol/l TEA jelenlétében (c). A neuron feszültség-áram karakterisztikája (d), p. c. — kezdeti (csúcs) áram, s. s. c. — állandósult áram, l. c. — kicsurgási (leak) áram. [15]



8. ábra. Szelektív ioncsatorna működési modellje

bemenő konformáció változások eredménye. HODGKIN és HUXLEY elképzelése szerint a csatorna (8. ábra) akkor lép működésbe (aktiválódik), ha olyan töltés átrendeződés következik be, ami az „m" részecskéket eltávolítja a csatornából, és ezzel a szelektív szűrő által meghatározott tulajdonságú, ill. méretű ionok

áramlására az út szabaddá válik, s az ionáramlás akkor szűnik meg, amikor a „h" részecskék zárják a csatornát, — ez az inaktiválódás. Az „m" és „h" kapuelemek töltéssel rendelkeznek, ezért mozgásuk kapuáram (gating current) formájában mérhető. A legutóbbi években sikerült mérni ezeket az igen gyors és kicsi kapuáramokat, mind a Na-, Ca- és K-csatornára vonatkozólag. A Na-csatorna kapuárama pl. Loligo-axonon 300-szor kisebb, mint az akciós potenciál felszálló szárát létrehozó Na-áram, azzal ellentétes irányú és kialakulása megelőzi a Na-áramot (9. ábra). A kísérletek igazolták a kapuáram membrán-



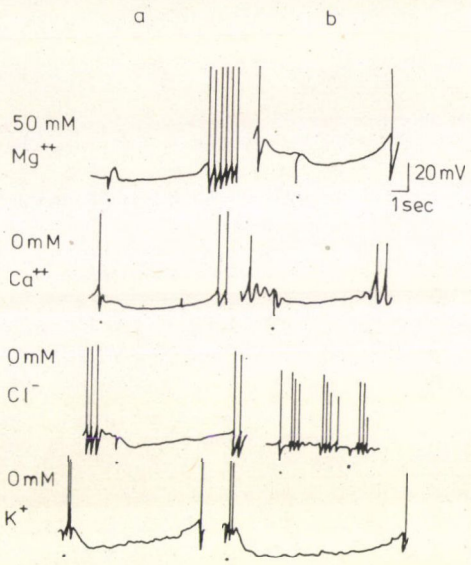
9. ábra. A Na-csatorna kapu árama (fent) és az egyidejűleg regisztrált Na-áram (lent). [1]

polaritástól való függését is, ami a korábbi elméleti meggondolások helyességét támasztotta alá.

A kapuáramok kimutatása az ioncsatornák működésbe lépését és inaktiválódását magyarázza, mi indítja be azonban a kapuelemek elmozdulását? Erre a kérdésre eltérő válasz adható aszerint, hogy szinaptikusan, illetve elektromosan vezérelt, vagy pacemaker sejtről van-e szó. Előbbi esetben a transzmitter-receptor kötődés, illetve a neuront ért elektromos impulzus eredményez olyan töltéseloszlás változást a membránban, ami a csatorna nyílást kiváltja, éspedig kémiai struktúrájától és a receptor sajátosságaitól függően minden transzmitter meghatározott csatornákat aktivál. Ugyanazon transzmitter több csatornát is aktiválhat, de az aktiválás membránpolaritástól való függése, valamint az aktiválódás — inaktiválódás időviszonyai nagymértékben eltérőek lehetnek. Ha ehhez még hozzávesszük azt, hogy egyetlen neuron a szóma, axondombon, axonon és a szinaptikus kapcsolóhelyeken eltérő transzmitterkötő struktúrákkal (receptorokkal) rendelkezhet, nyilvánvaló, hogy maga a

neuron is sok bemenettel rendelkező integrációs elem és elektromos aktivitásának kialakulása bonyolult kölcsönhatások függvénye. Az ioncsatornák és e kölcsönhatások sajátosságainak tisztázása magában rejti olyan farmakológiai lehetőségek feltárását is, amelyek kiaknázása a jövő feladata, amire azonban most nincs idő kitérni.

A már említett identifikált pacemaker neuronunkon kiváltható szinaptikus potenciálok sajátosságait hozom fel példának a fentebb elmondottak demonstrálására. A palliális idegek ingerlésével két, illetve három komponensű

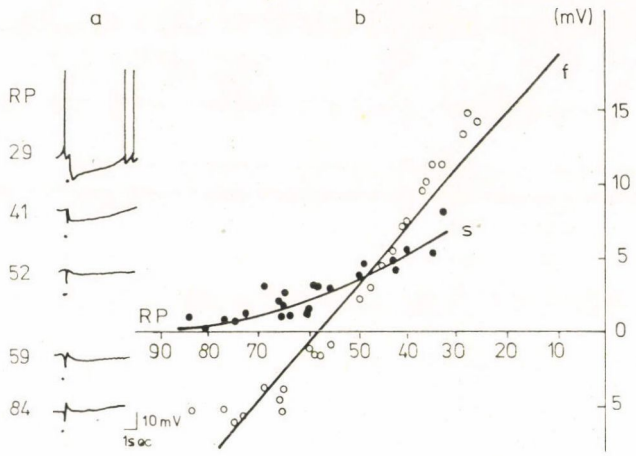


10. ábra. A jobb palliális ideg ingerlésével kiváltott szinaptikus potenciálok a Helix RPal neuronján és azok megváltozása különböző összetételű oldatokban. a — kontroll, b — Mg-felesleg, Ca-hiány, Cl-hiány, ill. K-hiány hatása

szinaptikus potenciál váltható ki a neuronon, egy gyors serkentő, azt követő gyors gátló és egy lassú gátló PSP (10. ábra). Mg-hiány, ami a szinaptikus struktúrákat általában szétkapcsolja, nem károsítja a lassú gátló komponenst, Ca-hiányában a gyors komponensek maradnak meg, illetve felerősödnek, Cl-hiányában minden komponens eltűnik, K-hiányban pedig a gátló potenciál megnő. A membránpolaritás változtatása során kiderült (11. ábra), hogy a gyors komponensek a nyugalmi potenciál növelésekor megfordulnak, a lassú komponens azonban legfeljebb eltűnik, meg nem fordul. A kiváltott szinaptikus potenciálok nagyságát és irányát a feszültség függvényében ábrázolva is kitűnik, hogy a gyors komponensek polaritásfüggése lineáris és megfordulási pontja —58 mV-nek adódik. A lassú komponens polaritásérzékenysége ettől eltér és csak 70—80 mV-nál kisebb nyugalmi potenciáltartományban van jelen.

Mindez egyértelműen bizonyítja a sejten kiváltott 3-féle PSP eltérő feszültségfüggését és különböző ionmechanizmusát, ami eltérő transzmitter-receptor kölcsönhatást is jelent.

A spontán akciós potenciált generáló, ún. pacemaker neuronok esetében az ioncsatorna többnyire ritmikus aktiválódását nem lehet a neuronon kívüli komponensekkel magyarázni. Legkézenfekvőbbnek a szívizomsejtekre leírt mechanizmus tűnik, miszerint a membrán nagy nyugalmi Na-permeabilitása hozza létre azt a lassú depolarizációt, ami kritikus szintet elérve aktiválja a Na-, majd a Ca-csatornát, és ez a K-csatorna működésbe léptetésével, a repolari-

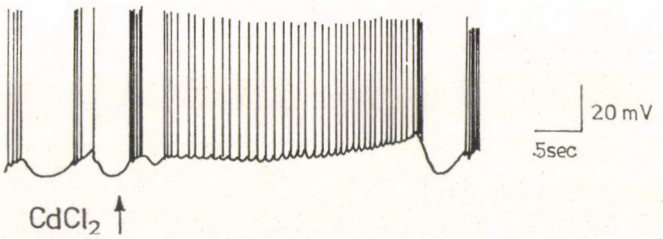


11. ábra. A nyugalmi potenciál (RP) csökkentésének, ill. növelésének hatása az idegingerléssel kiváltott szinaptikus válasz nagyságára és irányára Helix RPal neuronján (a); a szinaptikus potenciál gyors (f) és lassú (s) komponensének amplitudója a polaritás függvényében (b)

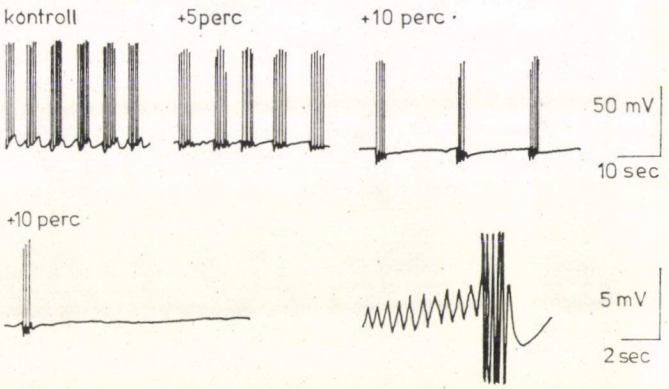
zációval befejezi az akciós potenciál teljes ciklusát. E folyamatokhoz egyes esetekben kiegészítőként társul az elektrogén Na-pumpa is. Ez a mechanizmus azonban nem érvényes például a bimodális pacemaker sejtek lassú hullámzására. Itt az akciós potenciál alatt belépő Ca-nak tulajdonítanak jelentőséget, s úgy vélik, hogy a potenciálsor alatt megnövekvő intracelluláris Ca-koncentráció növeli meg a K-vezetést, ami a hiperpolarizációs hullámot eredményezi. Korábban már demonstrált kísérleteink (7. ábra) azonban egyértelműen igazolták, hogy a lassú hullámzás fennmaradhat akciós potenciálok hiányában is, a Ca-belépés tehát nem lehet indítója a membrán K-permeabilitása megváltozásának. Ezért mi úgy véljük, hogy a bimodális pacemakerek membránpotenciáljának lassú hullámzása, amire a sorozat aktivitás a konvencionális elvek alapján ráépül, nem megelőző „inward" folyamatok, hanem a sejten belüli oszcillációs, metabolikus folyamatok eredménye.

Ezt támasztja alá az, hogy 0,1—0,2 nl 100 mmol/l-es $CdCl_2$ intracelluláris bevitelével a lassú hullámzás reverzibilisen felfüggeszthető anélkül, hogy az

akciós potenciálképzés kezdetben károsodna (12. ábra), néhány perc elteltével azonban paroxizmális potenciálképzés áll elő. Intracellulárisan bevitt 2,4-DNP (13. ábra) ugyancsak kioltja a lassú hullámzást, de a nyugalmi potenciál és az akciós potenciálképzés mechanizmusa tartósan intakt marad. A ritkán megjelenő sorozat aktivitást ez esetben egy oszcillációs depolarizálódó fázis előzi meg.



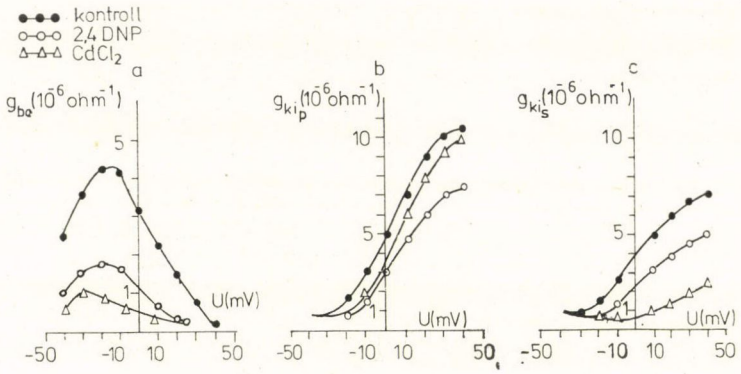
12. ábra. Intracellulárisan bevitt $CdCl_2$ hatása Helix RPal neuronjának aktivitására [13]



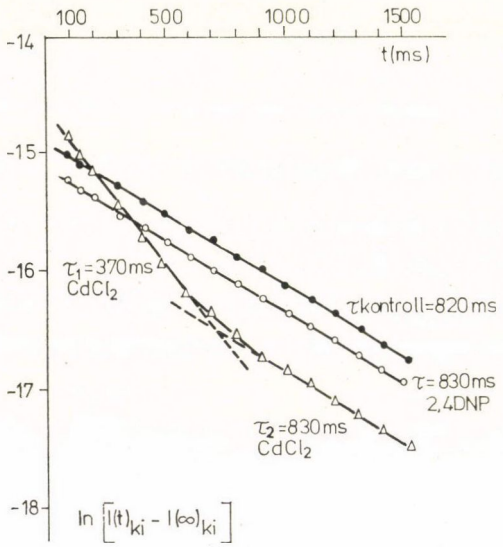
13. ábra. Intracellulárisan bevitt 2,4-DNP hatása Helix RPal neuronjának aktivitására

A vezetőképesség (g) változásai jól mutatják, hogy az intracellulárisan bevitt 2,4-DNP és $CdCl_2$ a kontrollhoz képest jelentősen csökkentik a belépő áramot, kevésbé befolyásolják a kilépő áram kezdeti értékét, az állandósult értéket azonban különösen a Cd erősen redukálja (14. ábra). Ez azt mutatja, hogy az említett anyagok intracelluláris bevitele nemcsak a sejten belüli folyamatokat befolyásolja, hanem a membránpermeabilitást is, és e tekintetben figyelemreméltó a $CdCl_2$-nak a K-csatornát gyorsan inaktiváló hatása.

A kifelé irányuló áram időfüggésének vizsgálata (15. ábra) is azt mutatta, hogy eltérés van a 2,4-DNP és a $CdCl_2$ hatása között. A kontroll és a 2,4-DNP esetén az outward áram kinetikája egyetlen, lényegében ugyanazon időállandó értékkel jellemezhető. Ezzel szemben a $CdCl_2$ intracelluláris bevitele utáni áramgörbék két exponenciálisan csökkenő komponenst tartalmaznak, melyek



14. ábra. 2,4-DNP és $CdCl_2$ hatása a membrán vezetőképességére a belépő (inward) áram (a), a kilépő (outward) áram kezdeti (b) és állandósult szakaszán (c), *Helix pomatia* L RPal. neuronján, intracelluláris bevitelkor



15. ábra. A kifelé irányuló áram kinetikája 2,4-DNP és $CdCl_2$ intracelluláris bevitele után, Helix RPal neuronján

közül az első jelentősen eltér a kontrolltól. Ez az a szakasz, mely a kilépő áram gyors inaktiválódását jelzi, és a $CdCl_2$ membránhatására utal.

Feltételezésünk szerint, e pacemaker sejt membránpotenciáljának lassú oszcillációját intracelluláris metabolikus ciklus szabályozza, mely szoros kapcsolatban lehet a sejt funkciójával, esetleg neuroszekréciós természetével. Ezt támasztja alá az, hogy más állatok neuroszekréciós sejtjein is kimutattak hasonló sorozat aktivitást. Nem lehetetlen, hogy a neuroszekrétum termelés, vagy felszabadulás mechanizmusával áll összefüggésben e sajátos aktivitási

mintázat, ennek taglalására azonban elegendő adat, a spekulációra pedig jelenleg idő nem áll rendelkezésre. Hipotézisünkben nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget, melyet MEECH, valamint HEYER és LUX leírtak, hogy az oszcilláció a membránon Ca-szabályozta K-permeabilitás változási folyamat. Az intracelluláris szabad Ca-szint változást azonban tőlük eltérően mi a sejten belüli reservekből, pl. mitokondriumokból való ritmikus felszabadulással és újrakötődéssel véljük magyarázni, s jelen vizsgálataink arra irányulnak, hogy ezt a lehetőséget bizonyítsuk, vagy ha nem, úgy kizárjuk.

Ilyen rövid idő alatt az idegsejt elektromos aktivitásáról, az ingerlékeny membránok biofizikájáról hozzávetőleges képet sem lehet adni, s az elmondottak legfeljebb egy-két problémát villantottak fel. Azt azonban szerettem volna érzékeltetni, hogy az idegsejtek élettani működésének, az aktivitásgenerálás mechanizmusának megértése, és a szóbajöhető mechanizmusok ismert neuronhálózati elemekre bontott tisztázása hihetetlenül nehéz és bonyolult feladat. El kell azt is ismerni, hogy a mai mikroelektróda technika, mely csak arra alkalmas, hogy a szóma szintjén megjelenő elektromos jelenségeket regisztrálja és mérje, csak részinformációt nyújthat a neuron teljes élettani működéséről és egyáltalán nem ad képet a neuron nem impulzusokkal megvalósuló szabályozó tevékenységéről. E kutatás megítélésem szerint jelentős fejlődés előtt áll világszerte. Ezért csak sajnálni lehet, hogy hazánkban, ahol a neurobiológia más ágai, mint a neuromorfológia, hisztokémia, neurofarmakológia, viszonylag jelentősebb bázisokkal rendelkeznek, az elemi ingerületi és membránfolyamatok kutatása csak szűk térre korlátozott. Ennek az irányzatnak a fejlesztését azért is szorgalmazni kellene, mert olyan kooperatív munka feltételei lennének megteremthetők, ami jelentős sikereket hozhatna a ma is nemzetközi hírű hazai neurobiológiának és egyben jelentősen megnövelhetné a hazai gyógyszerkutatás elméleti alapjait és módszertani eszköztárát is.

IRODALOM

1. ARMSTRONG, C. M., F. BEZANILLA: Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. Nature **242,** 459—461 (1973).
2. HODGKIN, A. L., A. F. HUXLEY: Resting and action potentials in single nerve fibres. J. Physiol., Lond. **104,** 176 (1945).
3. HODGKIN, A. L., A. F. HUXLEY: Currents carrid by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol., Lond. **116,** 449—472 (752).
4. JOHNSTON, D.: Voltage clamp reveals basis for calcium regulation of bursting pacemaker potentials in Aplysia neurons. Brain Research **107,** 418—423 (1976).
5. HEYER, C. B., H. D. LUX: Control of the delayed outward potassium currents in bursting pace-maker neurones of the snail, Helix pomatia. J. Physiol. **262,** 349—382 (1976).
6. KOSTYUK P. G., O. A. KRISHTAL: Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. J. Physiol. **270,** 545—568 (1977).
7. KOSTYUK P. G., O. A. KRISHTAL: Effects of calcium and calcium-chelating agents on the inward and outward current in the membrane of mollusc neurones. J. Physiol. **270,** 569—580 (1977).
8. MEECH W.: The sensitivitiy of Helix aspersa neurones to injected calcium iones. J. Physiol. **237,** 259—277 (1974).

9. SALÁNKI J.: Function of molluscan neurones as revealed in isolated and in intact preparations. Neuron Concept Today, Symposium, Tihany 1976 (Eds. J. Szentágothai, J. Hámori and E. S. Vizi), Akadémiai Kiadó: Budapest 119—131 (1976).
10. SALÁNKI J.: Elemi neuronális mechanizmusok az idegi szabályozásban. MTA Biol. Oszt. Közl. **21,** 37—60 (1978).
11. SALÁNKI J., I. VADÁSZ, K. ELEKES: Physiological and morphological characteristics of Br-type neuron in the central nervous system of the snail Helix pomatia L. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **42,** 243—254 (1972).
12. SALÁNKI J., I. VADÁSZ, M. VÉRŐ, I. S. MAGURA: Role of Na and Ca ions in spike activity generation in the Br-type neurone of Helix pomatia L. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **46,** 355—363 (1975).
13. SALÁNKI J., KATALIN S.—RÓZSA, I. VADÁSZ: Synaptic and metabolic modulation of the bimodal pacemaker activity in the RPal neuron of Helix pomatia L. Comp. Biochem. Physiol. **64A,** 265—271 (1979).
14. STINNAKRE, J., L. Tauc: Calcium influx in active Aplysia neurones detected by injected aequorin. Nature New Biology **242,** 113—115 (1973).
15. VADÁSZ I., J. SALÁNKI: Mechanisms of spike and burst generation in the bimodal pacemaker RPal neuron of Helix pomatia L. In: Neurobiology of Invertebrates. Gastropoda Brain (Ed. J. Salánki) Budapest: Akadémiai Kiadó 371—380 (1976).

TANULÁS AZ IDEGSEJT SZINTJÉN

FEHÉR OTTÓ

JATE Összehasonlító Élettani Tanszéke, Szeged

Az idegrendszer a faj és az egyén specifikumát legmélyebben kifejező, legmagasabb szinten tartalmazó szerv. Nem véletlen, hogy a filogenezisben folytonosan növekvő jelentősége van s mind fontosabbá válik a faj és egyén fennmaradásáért, specifikus tulajdonságainak megőrzéséért felelős struktúrák között. Az idegrendszer működési kapacitásának növekedése, mely mind a filogenezisben, mind az ontogenezisben megfigyelhető, sok területen nyilvánul meg. A receptor funkció fejlődésével párhuzamosan a külső és belső környezetet egyre mélyebben és teljesebben tükrözi. Az egyszerű leképezésen túl, emberben ez a logikai mélység hallatlan fokozatait éri el. Ebből ered az idegrendszer által kidolgozott válaszreakciók bonyolultságának fokozódása, az adaptív működések tökéletesedése. Az idegrendszer saját működését regisztráló, ellenőrző, a tudat anyagi szubsztrátumaként szereplő magasabb struktúrák hierarchiája kiépül és az emberi idegrendszer legspecifikusabb vonásává válik. Az idegrendszer működési kapacitása összes előzőkben felsorolt aspektusának megvalósulásában fontos szerepet játszik az emléknyomképzés funkciója, a memória, mely a tanulás folyamata révén gazdagítja a rendszer működését. Sok okát lehetne felsorolni annak, hogy e funkció miért vonzza a neurobiológusok figyelmét különös erővel. Tény, hogy az emléknyomképződés ma az egyik legintenzívebben tanulmányozott téma a neurobiológiában s ez jelentős részben abból adódik, hogy más szakmák kutatói: matematikusok, fizikusok, kémikusok, kibernetikusok egyre nagyobb számban csatlakoznak s próbálják ki ideáikat, tehetségüket ezen az izgalmas területen, az ember önmegismerésének e hallatlanul fontos állomásain.

Mi a tanulás? Mielőtt erre vonatkozó saját meghatározásunkat kifejtenénk, le kell szögeznünk, hogy a tanulás az *egész* szervezet funkciója, melyet még az idegrendszerre sem lehet teljes mértékben leszűkíteni: abban a szervezet minden részének megvan a saját részesedése, de nem tagadhatjuk az idegrendszer központi szerepét. *A tanulás új magatartási formák, új, azelőtt nem létező idegi kapcsolási mechanizmusok létrejövetele a külső és belső környezet hatásai és a rendszer saját szintetizáló működése révén.*

Az emléknyomképződés, tanulás jelenségei emberen és állaton legtöbbször nyilvánvalók és jól tanulmányozhatók. A neurobiológusok és pszicholó-

gusok az analízis igen széles skáláját alkalmazzák több mint egy évszázada mechanizmusának, részleteinek megismerésére. A tudománytörténet ezen érdekes ágának csak vázlatos ismertetése is órákat venne igénybe, ezért itt csak néhány, a jelenlegi kutatást is elősegítő tanulságára fogok kitérni.

A tanulás kutatásának egész történetén végighúzódik az az általános összefüggés, hogy az analízis módszerei, mélysége, eredményei mindig függtek az idegrendszerről rendelkezésre álló ismeretek egészének aktuális mennyiségétől és színvonalától. A behavioristák és Pavlov munkássága idején az idegrendszer makroszkópiája, fénymikroszkópos hisztológiája, legalapvetőbb pályarendszerei voltak ismertek, de tisztázatlan volt a neuronok közötti kapcsolat természete, a neuron működésének lényege, nem volt módszer az idegi, különösen a komplex idegműködések vizsgálatára. Nem létezett az idegrendszer kémiája, fejlődéstana embrionális állapotban volt. Ebben a korszakban játszódott le a minden tudomány történetében döntő átmenet a puszta megfigyelés stádiumából a kísérletes analízis korszakába. Ami ekkor a működő idegrendszerről objektív adatokat szolgáltatott, a magatartás volt, beleértve néhány megfigyelhető vegetatív funkciót. Ami az egyszerű megfigyelést a kísérletes analízis fokára emelte, az Pavlov ma is élő ideája volt: meghatározott magatartási válaszokat előidéző ingerek olyan időben kontiguus társítása, ami lehetővé teszi azok központi idegrendszeri hatásainak kölcsönhatásba lépését. Az ingerek újszerű társítása az ingerek és a magatartási elemek újszerű asszociációját eredményezte. Az állat tanult, mert addigi válasz-repertoárja új szerzeménnyel egészült ki. Pavlov zsenialitása (s egyben a tudomány nagy szerencséje), hogy rögtön az első kísérleti megközelítésben rátapintott a tanulási folyamat leglényegesebb mechanizmusára, az *asszociáció* folyamatára. Az idegrendszer legplasztikusabb struktúrájának, az agykéregnek tulajdonsága az, hogy képes az egyes alrendszerek időben egybeeső ingerületét olymódon összekapcsolni, hogy azok később egymás számára kölcsönösen az inger forrásául szolgálhatnak. Az új inger-válasz szekvenciák tehát mindig már meglevő ingerületi minták társulásából, asszociációjából, gyakran bonyolult kombinációiból adódnak. Aki fel akarja deríteni a tanulás hogyanját, annak az asszociatív működés rejtvényét kell megoldania. Az asszociatív jelleg nem kísérleti műtermék, nem egy kísérleti paradigma önkényes általánosítása, hanem a tanulási folyamat rendszer- és sejtszinten egyaránt manifesztálódó alapvető folyamata.

Az idegrendszer működése során előálló elektromos feszültségingadozások regisztrálása, az elektroenkefalográfia, elektrokortikográfia és később az egyes sejtekről történő elvezetések új lendületet adtak a tanulás vizsgálatának. A fő kérdés továbbra is az maradt, hogy a létrejövő új inger-válasz szekvenciák *hol* és *milyen módon* jönnek létre, az előbb felsorolt módszerekkel felderített „normális" elektromos aktivitás hogyan változik meg tanulás közben, s a felismert változások hogyan kapcsolódnak egy-egy magatartási aktus-

hoz. Az enkefalográfia és kortikográfiás vizsgálatok sok információt adtak az ingerületi és gátlási folyamatok dinamikájáról tanulás alatt az agykéregben és a kéregalatti struktúrákban.

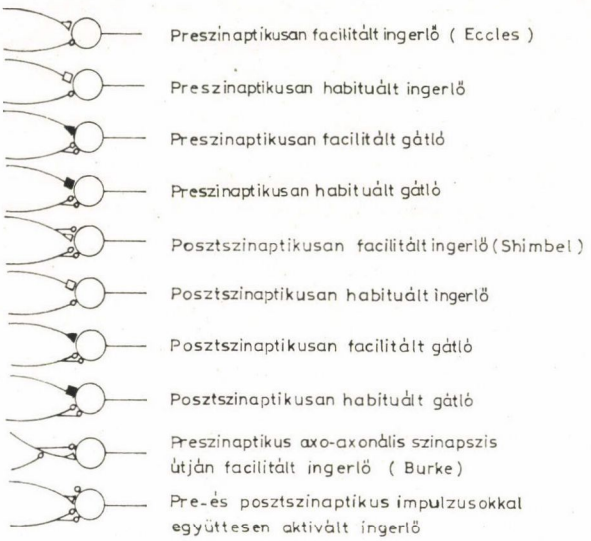
A kutatás e fázisából ki kell emelnünk ÁDÁM professzor és munkatársai eredményeit (1). Ők lényegében a mienkhez hasonló társítási paradigma alkalmazásával bizonyították, hogy az agykéregben, thalamusban, középagyi formatio reticularisban feltételes kiváltott potenciálok építhetők ki, melyek rendelkeznek a magatartási szinten kiépíthető feltételes reflexválasz legtöbb tulajdonságával. Figyelemreméltó, s ez a későbbiekben igen fontosnak bizonyul, hogy a feltételes válasz rögzülésének mechanizmusaként nem a reverberációs aktivitást, hanem a szinaptikus áttevődés módosulásait helyezik előtérbe.

Az idézett és valamennyi más kísérlet által bizonyított labilitás, plasztícitás tényei mellett mint fő tapasztalat az emelhető ki, hogy minden új, ha még oly egyszerű kondicionált válasz kiépülése is, kiterjedt agyi területeket hoz működésbe. Az extracelluláris mikroelektród lényegében igazolta és pontosította ezeket a megállapításokat. Arra nézve azonban, hogy hol és hogyan következnek be módosulások az idegrendszer bonyolult hálózatában, egyik módszer sem tudott választ adni; teljesítményük csupán arra terjedt ki, hogy a módosulás tényét nagyobb vagy kisebb sejtcsoportok aktivitásán bemutassák. Az analízis módszereinek tovább kellett mélyülnie ahhoz, hogy a kulcskérdések megoldásának útjára léphessünk. Új működési elveket kellett felderíteni, melyek a tanulásért felelős bonyolult és plasztikus struktúrák specifikumát képezik, de válaszra várt az is, hogy az ősibb idegi szerkezetekben érvényesülő működési elvek, a szummáció, a facilitáció, szomatotopia, az ingerület és gátlás strukturált viszonya, a reflex elv, a visszajelentés elve hogyan érvényesül e magasabb struktúrákban.

Abból a gondolatból kiindulva, hogy sohasem egyes sejtek, hanem mindig hálózat tanul, a tanulás teoretikusai régen foglalkoznak olyan hálózatok szerkesztésével melyek az őket érő impulzusok, ill. impulzuskombinációk nyomait megőrzik. Kézenfekvő, hogy egy olyan hálózat, amely nem rendelkezik elkülönített memóriával (mint pl. a számítógépek), csupán az *elemei közötti viszony megváltoztatása révén* képes ingertől függő „plasztikus" módosulásokra. Idegrendszerben ez a szinaptikus hatásfok módosulását, az ingerületnek új pályákra terelődését jelenti. A szinaptikus módosulásoknak, mint azt BRINDLEY (7) (1. ábra) elméleti megfontolásai alapján elfogadhatjuk, tíz változata lehetséges. Ezek feloszthatók preszinaptikus, posztszinaptikus, homo- és heteroszinaptikus, facilitálódó és gátlódó változatokra. Maga BRINDLEY, majd GARDNER—MEDWIN (10) és GRIFFITH (11) meggyőzően bizonyítják azonban, hogy *de novo* tanulás csak olyan hálózatokban lehetséges, melyekben legalább egy heteroszinaptikus úton posztszinaptikusan facilitált vagy gátolt szinapszis van. Homoszinaptikus úton vagy preszinaptikus lokalizációval módo-

suló szinapszisok csak valamely latens formában már meglevő pálya aktiválásához elégségesek, de novo tanuláshoz nem.

Ha egy fiziológus kísérleti úton kívánja ellenőrizni ezeket a hipotéziseket, olyan módszert kell választania, mely a szinapszisban lejátszódó finomabb funkcionális módosulások detektálására alkalmas. Jelenlegi eszköztárunkban egyetlen ilyen metodika van : az intracelluláris elvezetés. A makroelektród és az extracelluláris mikroelektród a különböző szinapszisok ezreinek-százezreinek egymással interferáló, analízisre kevéssé alkalmas tömegjelenségeit tük-



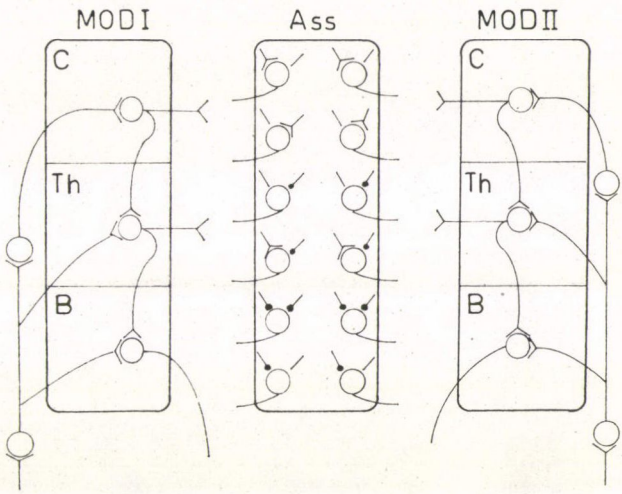
1. ábra. A tanuló hálózatokban elvileg lehetséges modifikálható szinapszisok típusai BRINDLEY [7] szerint. Közülük eddig a preszinaptikusan facilitálódó ingerlőt, a posztszinaptikusan facilitálódó gátlót és a pre- és posztszinaptikusan facilitálódó ingerlő típusút sikerült megtalálni az idegrendszerben

rözi. Ennek ellenére, mint látni fogjuk a tanulás mechanizmusának felderítéséhez értékes adatokkal járultak hozzá.

A következőkben az emléknyomképződés mechanizmusának egy kísérletes megközelítési módját szeretném vázolni, melyben egyszersmind kísérletet teszek arra, hogy az összefüggéseknek az idegrendszer egészétől — mint makrorendszertől — a szinapszisig vezető láncolatát bemutassam, rávilágítva a rész és egész egymástól elválaszthatatlan dialektikus egységére, melynek figyelembevétele nélkül nincs az analízis lehetőségeit kihasználó reális szintézis.

Vegyük a klasszikus vagy I. típusú kondícionálás egy esetét (2. ábra). Az afferens ingerek az egyik reflexíven keresztül kiváltanak egy automatikus feltétlen választ. Ugyanakkor eljutnak a thalamikus és elsődleges kérgi központokba is, melyek a választ különböző módon és mértékben modulálhatják. Lényeges, hogy a két reflexív egymástól függetlenül működik. Mind thala-

mikus, mind kortikális szinten azonban van egy sejtpopuláció, melyre a thalamikus és kérgi elsődleges központok felől konvergálnak az ingerületi pályák, mindkét modalitás irányából. Ezen ún. *poliszenzoros vagy asszociációs mezők* (ide számítható a mozgató mező is) eltérően a primer areáktól szomatotopiásan nem rendezettek, de sok bennük a két-három modalitás által befolyásolt (ingerelt vagy gátolt) változékony válaszmintát mutató sejt. A rájuk irányuló szinaptikus hatások erőssége is igen különböző lehet: egyesek akciós potenciált, mások ingerlő vagy gátló posztszinaptikus potenciálokat keltenek rajtuk.

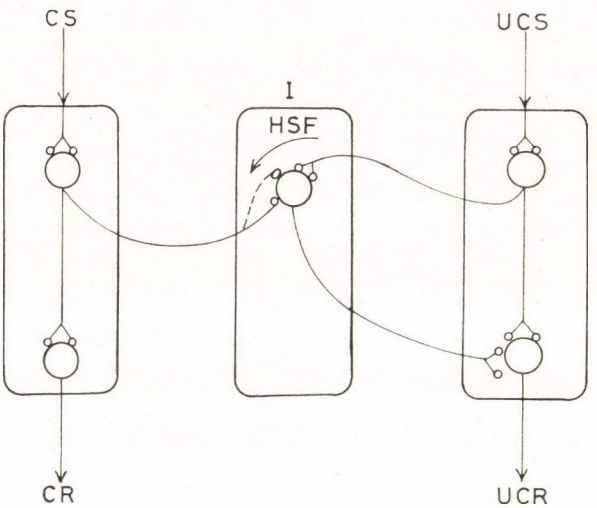


2. ábra. A reflexívek hierarchikus felépítésének és az agykérgi elsődleges és asszociációs areák vázlata. Mod I és Mod II: két különböző modalitású ingerre működésbe lépő reflexív. Ass: asszociációs struktúrák. B: bulbaris, Th: thalamikus, C: corticalis szint. —(: akciós potenciált, —: EPSP-t kiváltó, —●: gátló szinapszis. Az Ass areáról kilépő axonok az egyik reflexív efferens szárához csatlakoznak

Kimenetük szintén igen változatos lehet. Rajzunkon csak a két legfontosabb efferens pályát tüntettük fel: azokat, amelyek az egyik vagy a másik efferens reflexpályába lépnek be. Természetesen lehetnek olyanok is, melyek mindkét reflexívet befolyásolják. A bemenet és kimenet, a szinaptikus hatások szempontjából ez a populáció statisztikusan erősen megoszló, labilis sejtállomány, melynek membránján a heteroszinaptikus facilitáció (HSF) számára tág lehetőségek nyílnak (3. ábra). Ha például az egyik modalitás felől csúcspotenciál, a másik felől EPSP keltődik, akkor e két inger időben kapcsolt beérkezése esetén, a gyengébb szinapszis HSF révén megerősödik s e neuron axonja új pályát nyit az ingerület számára. Ilymódon az I. ingermodalitás ingerré válik a II. reflexpálya végrehajtó szervei számára is. A befutó ingertömeg természetesen módosítja a többi neuron aktivitását is, a kiindulási paraméterektől függően különböző módon. Az asszociatív area így átstrukturálódik s bizo-

nyosra vehető, hogy az idegrendszerben egy ilyen egyszerű kondicionálás során is sokkal több változás történik, mint ami a magatartásban megnyilvánul, vagy amit a kísérletező elérni szándékozik.

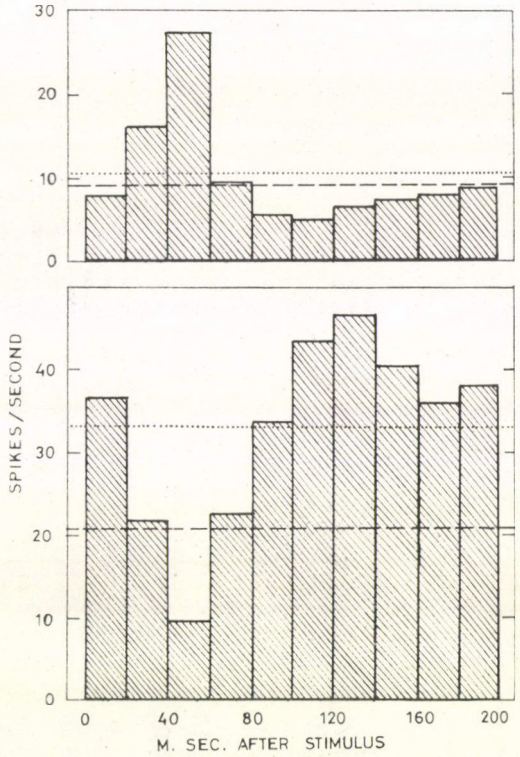
Felmerül mármost a kérdés, hogy az idegrendszer reális körülményei között léteznek-e ezek a struktúrák, sejtpopulációk és kölcsönhatások, amelyeket ez a nagyon egyszerű séma feltételez, s vizsgálhatók-e kísérletes módszerekkel?



3. ábra. A heteroszinaptikus facilitáció (HSF) kialakulásának vázlata és szerepe új ingerületi pályák kialakulásában. Az I mezőben levő idegsejt időbeli kontiguitásban kap csúcspotenciált kiváltó impulzusokat az UCS (feltétlen inger) és PSP-t kiváltó ingereket a CS (feltételes inger) felől. Többszöri társítás után a szaggatott vonallal jelölt szinapszis facilitálódik és a CS egyedül is képes lesz akciós potenciál kiváltására. Ilymódon a CS-től az UCR-ig (feltétlen reflexválasz) terjedő szakaszon új idegpálya kezd működni s új inger — válasz szekvencia jön létre

Az, hogy poliszenzoros, asszociációs areák vannak az agykéregben és ilyen magvak a thalamusban, több, mint 20 éve ismert. Ami fontosabb azonban az, hogy ezek sejtjei, nemcsak több modalitásra érzékenyek, hanem, hogy válaszaik sokkal dinamikusabbak, változékonyabbak, mint a primer szenzoros mezőké. Macskában Bental és Bihari (6) régebben, Szmetankin 1973-ban (15), újabban pedig magyar szerző, Banczerowskyné és Szilakov (2) mutatta ki, hogy bár a primer szenzoros areákban is vannak bimodális sejtek, számuk lényegesen kisebb. Különböző kondicionálási módszerekkel az asszociatív kéreg neuronjainak modalitás specifitása sokkal könnyebben módosítható, mint az elsődleges mezők neuronjaié. A Bental és Bihari (6) cikkéből vett post-stimulus hisztogram mutatja (4. ábra), hogy pl. vizuális ingerlésre egyesek excitációval, frekvenciafokozódással, mások gátlással reagálnak. Találtak olyan neuronokat is, melyek egyik modalitásra ingerülettel, a másikra gátlással vagy kétfázisú reakcióval válaszolnak. Végül az ingerek párosításával

extracellulárisan jól regisztrálható változásokat lehetett létrehozni ezen neuronok válaszkészségében, melyeket azután extinctiós eljárással ki lehetett oltani (SZMETANKIN 1973) (5. ábra). Azok a neuronok, amelyek extracelluláris elvezetésben az egyik modalitásra nem mutatnak csúcspotenciált, lehetnek multimodálisak is, mert a PSP-t e módszerrel nem lehet detektálni.



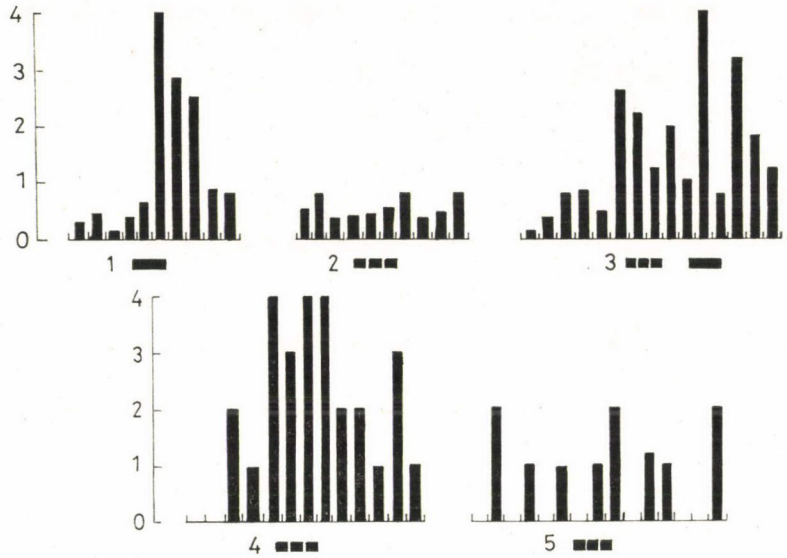
4. ábra. Asszociációs kérgi bimodális sejtek poststimulus hisztogrammjai BENTAL és BIHARI [6] cikkéből. Felül: fényingerre frekvenciafokozódással válaszoló sejt, alul: fényingerre kétfázisú reakcióval válaszoló sejt. Abszcissza: idő ms-ben, ordináta: kisülési frekvencia. Pontozott vonal: a kiváltott válaszok átlagos frekvenciája. Szaggatott vonal: a spontán kisülések frekvenciája. Feltűnő a sejtválaszok rendkívüli labilitása

A másik alapvető probléma, mely kísérletes vizsgálatot igényel az, hogy létezik-e az elméletileg megjósolt *heteroszinaptikus facilitáció* az idegrendszerben, s betölthetí-e azt a kulcsszerepet, melyet neki emléknyomképződésben szánunk.

HSF-t idegsejtekben, kondicionálási eljárással először KANDEL és TAUC (12) demonstrált Aplysia idegrendszerében (6. ábra). Egy identifikált idegsejten bizonyos afferens rostok ingerlése révén ingerlő posztszinaptikus potenciált váltottak ki. Ha ezt követően egy másik afferens rostot ingereltek sorozatingerekkel, melyek más szinapszisokon keresztül a sejt csúcspotenciáljait vál-

tották ki, akkor az EPSP amplitúdója kb. 7-szeresére nőtt. Ez csak úgy magyarázható, hogy az egyik szinapszis kiadós aktiválása a másik szinapszis hatékonyságának erős fokozódásához vezetett. Ez a HSF, mely egyszersmind reverzibilisnek is bizonyult.

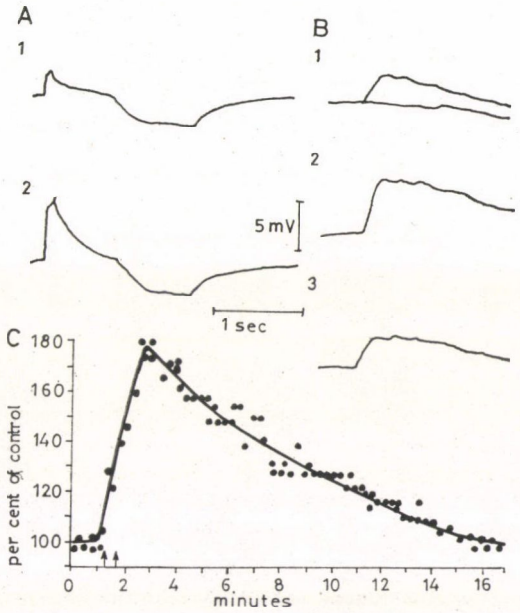
Emlős neokortexben ilyen vizsgálat nem történt, s Baranyi Attila munkatársammal azt a célt tűztük ki, hogy egyrészt megtaláljuk ezt a fontos jelenséget macska mozgatókérgében mely, mint említettem asszociációs területnek



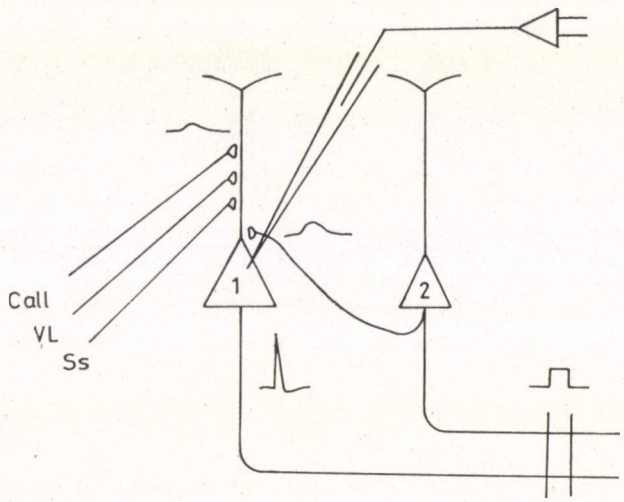
5. ábra. Asszociációs kérgi neuron kondicionálása fény- és hangingerrel SZMETANKIN [15] cikkéből. 1. post-stimulus hisztogram (PSH) fényinger (vízszintes vonal) után. 2. PSH hanginger után (szaggatott vonal). Válasz nincs. 3. Feltételes válasz 8 társítás után. 4. Ugyanaz 25 perc múlva. 5. A válasz eltűnik 30 perc után. Abszcissza: idő, 300 ms-es léptékben, ordináta: kisülési frekvencia

is tekinthető, másrészt, ha ilyen van, megismerjük keletkezésének feltételeit, tulajdonságait s mindezek eredményeként tisztázzuk azt, hogy szolgálhat-e HSF az emléknyomképződés alapjául (3, 4, 5, 9).

Kísérleti paradigmánk a következő volt (7. ábra). Macska mozgatókérgében kerestük fel a pyramis pályához tartozó (PT) és abba nem projiciáló (nem-PT) neuronokat, melyeket antidrom ingerléssel identifikáltunk. Ezután a thalamus VL magja, a szomatoszenzoros pálya és a callosalis összeköttetések ingerlése révén megkerestük a neuron bemeneteit. A VL mag sztereotaxiás ingerlése, az ellenoldali láb bőrének és a homológ kérgi area direkt ingerlése három különböző szinapszist aktivált a neuron membránján, melyek különböző hatásfokkal idéztek elő ingerületet. Egyesek közülük csak EPSP-t váltottak ki, mások csúcspotenciált. Negyedik bemenetként az antidrom aktivált szom-



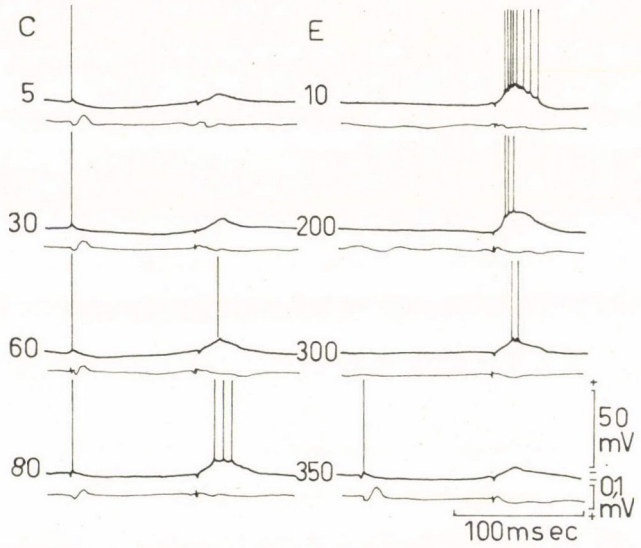
6. ábra. Heteroszinaptikus facilitáció (HSF) Aplysia ganglionsejten KANDEL és TAUC [12] közleményéből. A_1: EPSP kondicionálás előtt, A_2: ugyanaz genitális ideg 1 s-os 5/s frekvenciájú ingerlése után. Közben membrán konduktancia mérése is történt. B_1: EPSP másik sejten kondicionálás előtt, B_2: közvetlenül utána, B_3: 14 perccel a kondicionálás után. C: A B. pontban regisztrált EPSP facilitációjának időbeli lefutása. Ordináta: a kontroll érték százalékai, abszcissza: idő percben



7. ábra. Kísérleteinkben alkalmazott paradigma. 1: „gyors" pyramis (PT) sejt, 2: „lassú" PT sejt. Call: kallózális, VL: a thalamus ventrolateralis magja felőli, SS: szomatoszenzoros bemenet. Mindkét PT neuron a PT felől antidrom módon is aktiválható. A 2. neuron monoszinaptikusan ingerli az 1 PT sejtet. Mikroelektródos elvezetés az 1 sejtből

szédos PT sejtek axon kollaterálisai szerepeltek, melyeket korábban mások is kimutattak. Meg kell jegyeznünk, hogy a VL, a kallozális és a PT bemenet monoszinaptikus volt, míg a szomatoszenzoros EPSP-k oligoszinaptikusnak bizonyultak. Ilymódon kizárható, hogy az egyes ingermodalitások kölcsönhatásai nem a vizsgált neuron membránján, hanem attól távolabb, esetleg alacsonyabb szinten jöhettek létre.

Ha most egy kiválasztott bemenetet ingerelve EPSP-ket váltottunk ki a neuronon s azt egy másik bemenet ingerlésével keltett csúcspotenciállal, meg-

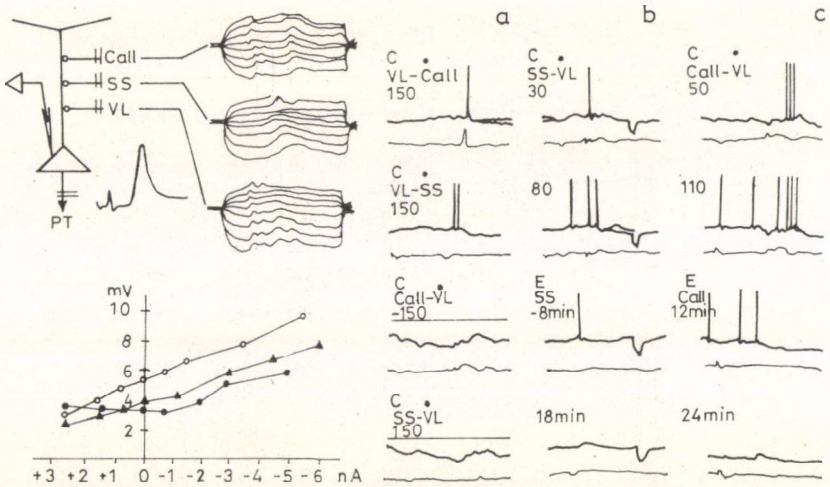


8. ábra. Heteroszinaptikus facilitáció PT neuronon. C: kondicionálási, E: extinkciós széria. A számok a 100 ms időközzel 0,5/sec frekvenciával adott ingerpárok sorszámát jelölik. A csúcs potenciált VL-ingerlés, az EPSP-t szomatoszenzoros ingerlés váltotta ki. Ez utóbbi facilitációja a 30. társítás körül amplitúdó-növekedésben, a 60. ingerpártól spike generálásban nyilvánul meg. Az extinkciós szériában csak SS impulzusokat adtunk. A 350. ingernél a facilitáció teljesen kialszik. Felső sor: intracelluláris, alsó sor: kéregfelszíni elvezetés minden regisztrátumban

határozott (0—100 ms) idő-intervallummal társítottuk, akkor bizonyos számú társítás után az EPSP hatékonysága megnőtt és csúcspotenciál kiváltására vált alkalmassá (8. ábra). Ez a facilitált állapot a korábban gyengébb hatásfokú inger egyedüli alkalmazása során is fennmaradt, majd fokozatosan kioltódott. E kísérletben tehát a HSF-t kétséget kizáróan sikerült létrehozni, mely néhány perctől 30 percig terjedő időtartamra maradt fenn. Az ingerületnek egy új pályája képződött ilymódon szemünk láttára, mely a feltételes reflexek következő tulajdonságait mutatja: 1. ingerek társítására jött létre, 2. extinkció révén megszüntethető, 3. újra kialakítható. További fontos párhuzam, hogy azon szinapszisra nézve specifikus, melynek ingerületét a csúcs-

potenciállal társítottuk (differenciál-kondicionálás) továbbá, hogy az EPSP és csúcspotenciál véletlenszerű adásával HSF nem alakul ki (9. ábra).

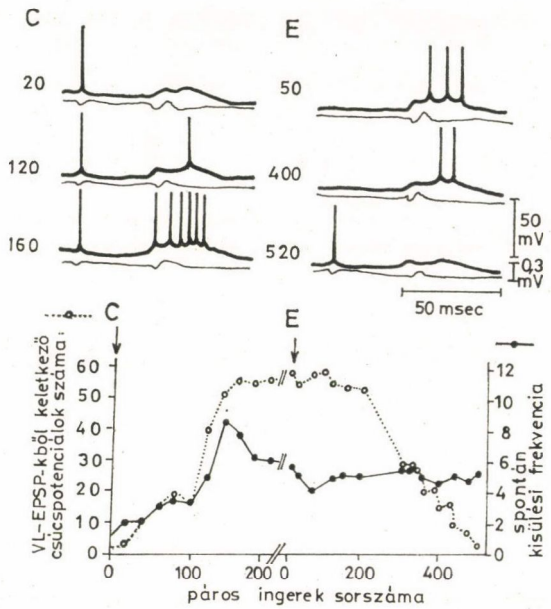
A mi kísérleti eljárásunkkal vizsgált sejteknek kb. negyedrésze tartalmazott kondicionálható szinapszisokat; ebből különösebb következtetéseket nem lehet levonni, mivel nézetünk szerint minden agykérgi sejt rendelkezik a plasztikus változásokra való képességgel és csupán ingerlési technikánk az oka, hogy nem minden neuronban sikerült feltárni ezt a tulajdonságot.



9. ábra. Differenciál kondicionálás egy sejten, mely Call, SS és VL szinapszisok és antidrom ingerlés révén egyaránt aktiválható volt. B. O.: kísérleti paradigma a bemenetek és az elvezetés helyének feltüntetésével. Az egyes bemenetek mellett az általuk kiváltott EPSP-k változásai vannak ábrázolva különböző mértékű de- és hiperpolarizációk mellett. PT jelölése mellett: antidrom spike regisztrátuma. Alsó diagramm: Call ·····, VL -▲-▲- és SS-○-○- EPSP-k polarizáció okozta változásainak ábrázolása. J. O.: differenciál kondicionálás bemutatása. *a oszlop* VL-Call 150: VL—EPSP és Call spike 150-szeri társítása után a PSP nem facilitálódik. C—VL—SS 150: ugyanez VL—EPSP és SS spike esetében. C Call-VL 150: hiperpolarizációs völgyben a társítás nem vezet eredményre. C SS—VL 150: ugyanaz SS—EPSP-kkel. *b oszlop* C SS—VL 30 SS—EPSP VL-spike-al 30-szor társítva. Alatta: a 80. társítás után a SS—EPSP már spike-ot vált ki. E SS 8 min és 16 min: az extinkció 8. és 16. percében. *c oszlop* C Call—EPSP VL-spike-al 50-szer társítva. Alatta: a 110. társítás után a PSP facilitálódik. E Call 12 min és 24 min: a facilitáció kialvásának fázisai a jelzett percekben

Arra nézve, hogy a szinaptikus hatásfok növekedésének mi az oka, számos elképzelés vethető fel. Lehetséges, hogy a szinaptikus hatásfok növekedésének az szolgál alapjául, hogy a transzmitter felszabadulás fokozódik. Ha ez így van, akkor HSF-hoz a preszinaptikus rostok között gyakori és intenzív kapcsolatnak kell lennie, pl. axo-axonális szinapszisok formájában. Bár az agykéregben ilyenek előfordulnak, csekély számuk miatt nem jönnek tekintetbe a HSF alapjaként. Egy elvi nehézsége ennek a magyarázatnak az, hogy a neuron integratív tevékenysége eltolódnék a preszinaptikus végződések területére, holott e tevékenység súlypontja szerteágazó egyéb tapasztalatok alap-

ján is, a posztszinaptikus membránban keresendő. Preszinaptikus lokalizáció ellen szól az a tény is, hogy a HSF-hez vezető ingerpáros egyik tagjának csúcspotenciált kell kiváltania a vizsgált neuronon. Az eseményekben szerepet játszó két vagy több preszinaptikus axonban viszont (ahhoz is hogy EPSP-t váltsanak ki) egyaránt csúcspotenciál keletkezik. Ingerületük mértékében tehát különbség nincs: mindkettő „minden vagy semmi" spike, amit fokozni nem lehet, legfeljebb csökkenteni. KANDEL és TAUC a preszinaptikus mecha-

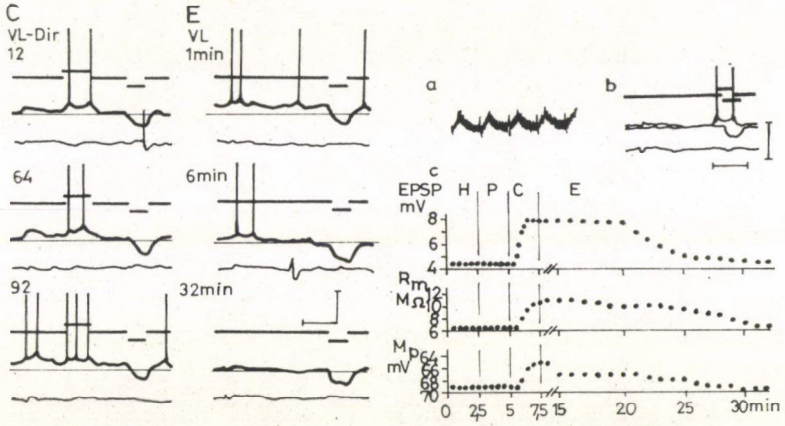


10. ábra. Antidrom úton keltett csúcspotenciálok facilitáló hatása VL—EPSP-kre PT-neuronon. C: kondicionálási széria, melynek 20., 120., és 160. tagját mutatjuk be PT—VL sorrend mellett. Jól látható a VL—EPSP facilitációja, mely az extinkciós szériában (E) fokozatosan visszafejlődik. Alsó diagram: az egész folyamat időgörbéje. ●–●: kondicionálási görbe, ○···○ a sejt spontán aktivitása

nizmus mellett foglalnak állást (13), kísérleteikben viszont a HSF-hoz két EPSP is elegendő, ami macska agykéregben teljesen kizárt.

Mivel a két szinapszis között kapcsolatot teremtő egyetlen anyagi közeg a posztszinaptikus membrán, a HSF lokalizációjának másik lehetősége itt keresendő. Mivel, mint említettem, az EPSP hatékonyságának fokozásához szükséges tényező a hozzá időben kapcsolt csúcspotenciál, a posztszinaptikus hipotézis ellenőrzésére a következő kísérleti paradigma látszott alkalmasnak (10. ábra). Egy PT-neuronon, melyen VL vagy SS eredetű EPSP-k voltak kiválthatók, antidrom úton fix ISI-mal csúcspotenciálokat keltettünk s megvizsgáltuk, hogy e tisztán posztszinaptikus úton keltett spike-ok hozzájárul-

nak-e az EPSP facilitálódásához. Következő képünk azt mutatja, hogy ez lehetséges. VL-(SS)-EPSP-k megfelelő időintervallummal társítva antidrom spike-okkal hatásfokukban lényegesen megerősödnek és csúcspotenciál kiváltására válnak képessé. Más kísérletekben pozitív áram intracelluláris injekciójával váltottunk ki „direkt" spike-okat. Ingerpárokban ezek is a VL-EPSP-k facilitációjához vezettek (11. ábra). Úgy tűnik, ezek alapján, hogy a HSF-hoz azért szükséges csúcspotenciál, mert ez a posztszinaptikus neuron teljesértékű aktivációját jelenti. Ezen aktiváció megtörténte pedig akkor is visszahat a szinapszisra, ha az antidrom vagy direkt ingerlés útján jött létre. Ez kétséget kizáróan a HSF posztszinaptikus lokalizációjára mutat.



11. ábra. Szinaptikus úton keltett EPSP facilitálása direkt, intracelluláris áraminjekcióval. Baloldalt: minden regisztrátum felső sora a mikroelektródon át a sejtbe küldött áramot jelzi, (pozitivitás felfelé), középső sora az intracelluláris, alsó sora a felszíni regisztrátum. C. kondicionálási széria, VL—DIR 12: VL—EPSP 12. társítása direkt áramimpulzussal, mely önmagában 2 spike-ot vált ki. A 64. társításnál amplitúdó növekedés, a 92. társításnál VL-spike generálás látható. E: extinkciós széria. Ebből az 1., 6. és 32. perc eredményét tüntetjük fel. A kondicionált válasz végül kialszik. Jobboldalt: a) a VL—EPSP monoszinaptikus jellegének bizonyítása: 50/s frekvenciával kiváltható. b) pszeudokondicionálás, véletlenszerűen adott ingerekkel. c) A kondicionálási folyamat teljes lefolyása, melyben az EPSP amplitúdó (felső), a membránellenállás (középső) és a membránpotenciál (alsó diagram) alakulása látható a kísérlet habituációs (H), pszeudokondicionálási (P), kondicionálási (C) és extinkciós (E) fázisában

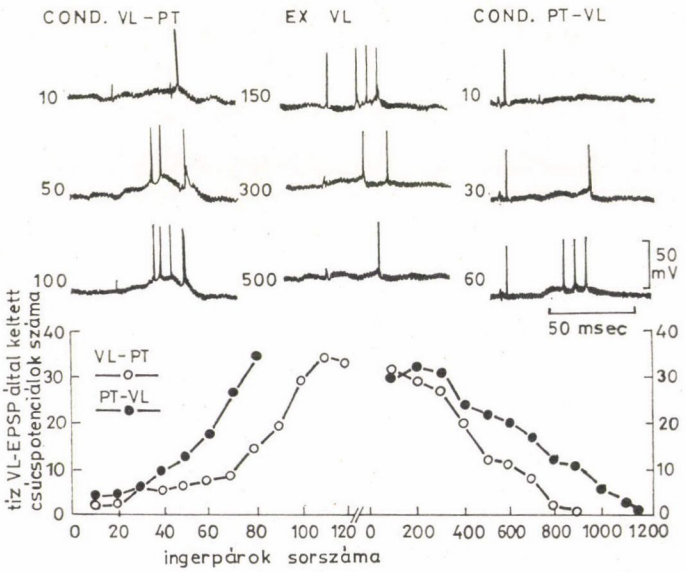
A HSF másik fontosnak látszó tulajdonsága az ingerlés időviszonyaihoz való kötöttsége. Ennek két vonatkozása van. Egyik az, hogy messze nagyobb hatásfokkal akkor volt elérhető, ha az EPSP-t és a spike-ot páros ingerek formájában prezentáltuk. Ekkor 60—90 társítás már eredményre vezetett. Ha a spike-okat 10—20 cps frekvenciájú sorozatinger formájában alkalmaztuk, a létrejött facilitáció kb. 10-szer rövidebb volt és az ingerek ezrei voltak szükségesek annak eléréséhez. Ezt mutatja az 1. táblázat melyet néhány olyan neuron megfigyelése alapján készítettünk, melyeken mindkét ingerlési módra lehetőség volt. A páros ingerek vitathatatlan fölényben vannak, ami valószínű-

1. táblázat

A táblázat a sorozatban és párokban alkalmazott kondicionáló ingerek hatásosságát hasonlítja össze 3 neuron esetében. A számok a sikeres kondicionálások eredményeként elért facilitációk időtartamát mutatják. A páros ingerek lényegesen hatásosabbak

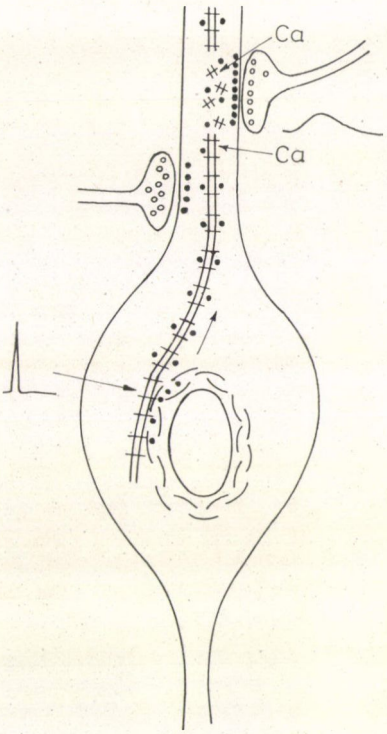
Neuron No	Sorozat mp	Páros mp
3	20	1128
	70	892
	7	359
11	31	789
	48	
	43	
12	7	440
	15	313
	30	148

leg nem irreleváns az egész állaton bevált társítási paradigma mechanizmusát illetően.



12. ábra. EPSP-spike és spike—EPSP sorrendben végzett kondicionálás összehasonlítása Cond VL—PT: VL—EPSP második komponense facilitálódik. A 10., 50. és 100. ingerpár van feltüntetve. Ex, VL: extinkciós sorozat. Cond PT—VL: ugyanaz PT—VL sorrendben, a 10., 30. és 60. ingerpár hatásának bemutatásával. Alul: a két kondicionálási sorozat időbeli lefutásának diagramja. Ordináta: a VL—EPSP-kből keletkező spike-ok száma 10 ingerenként. Abszcissza: az ingerpárok sorszámai

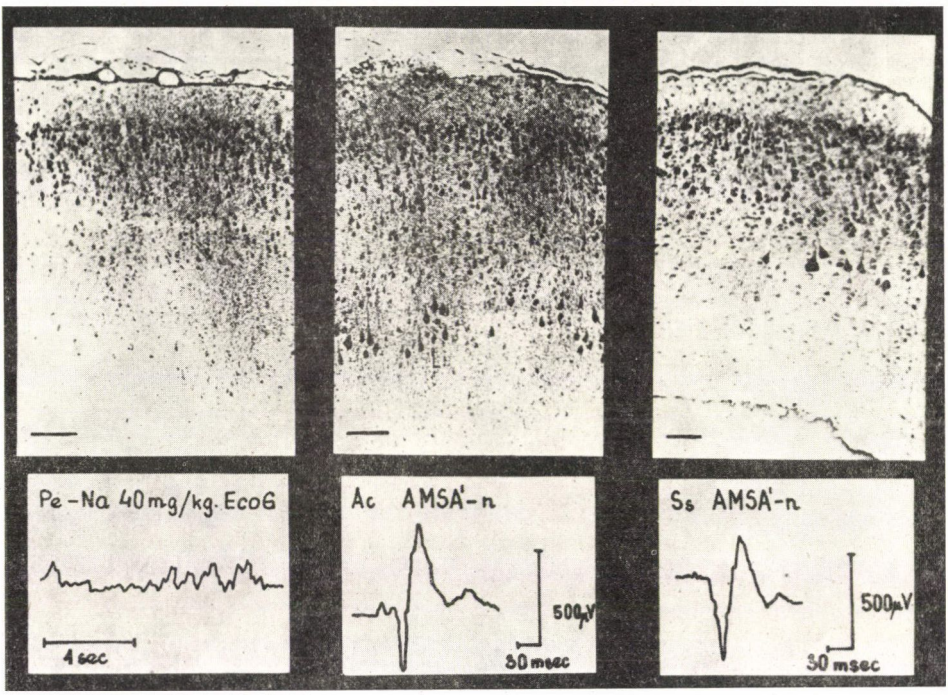
Az időbeli kontiguitás jelentőségét hangsúlyozza másik észleletünk is. Szinaptikus facilitációt, bármely eredetű spike és bármely ingersorrend esetében csak akkor lehetett kiváltani, ha az ISI nem haladta meg a 100 ms-ot. Ez arra mutat, hogy mind az EPSP, mind a spike valamilyen nyomot, utóhatást hagy a membránban vagy a sejt biokémiai mechanizmusában, s a következő inger csak akkor hatásos, ha ezek a nyomok még perzisztálnak. Arra



13. ábra. Hipotézis a csúcspotenciál facilitáló mechanizmusára nézve a vele időben kontiguusan kapcsolt EPSP-re. Magyarázat a szövegben

nézve, hogy mindkettő (EPSP és spike) hagy nyomot az utal, hogy sikeres kondicionálás mind EPSP-spike, mind spike-EPSP sorrendben lehetséges volt (12. ábra). Messze vezetne ha e nyomok természetére vonatkozó hipotéziseinkre kitérnék. E helyen csak a következőket szeretném megjegyezni: a szinaptikus hatásfokot döntő mértékben meghatározó tényezőként a posztszinaptikus receptormező kiterjedtségét, szervezettségét, ionoforokkal való kapcsolatát tekintjük. HSF esetén e receptormező új receptorokkal egészül ki, extinkció alatt e folyamat regrediál. Új receptorok a perikaryon Golgi apparátusában szintetizálódnak, a tubuláris szállító szalagon a dendritekbe, a receptorok közelébe szállítódnak (Fambrough és DeVreotes 1978). (13. ábra). Aktív

szinapszisok tájékán a belépő Ca a tubuláris apparátust dezorganizálja (WEISENBERG 1972) s a rá kötött receptor molekulák a posztszinaptikus receptor mezőhöz csatlakoznak. Ilymódon az EPSP-t kiváltó idegimpulzus hatásfoka nő s csúcspotenciál kiváltására válhat képessé. Ahhoz, hogy a receptormező kiegészítése végbemenjen, a szinaptikus ingerületnek valamilyen szinkronba kell kerülnie a fehérje szintézist vagy a receptorok és ionoforok tubuláris szállító szalagra történő felrakodását szabályozó csúcspotenciálokkal. Az idő-

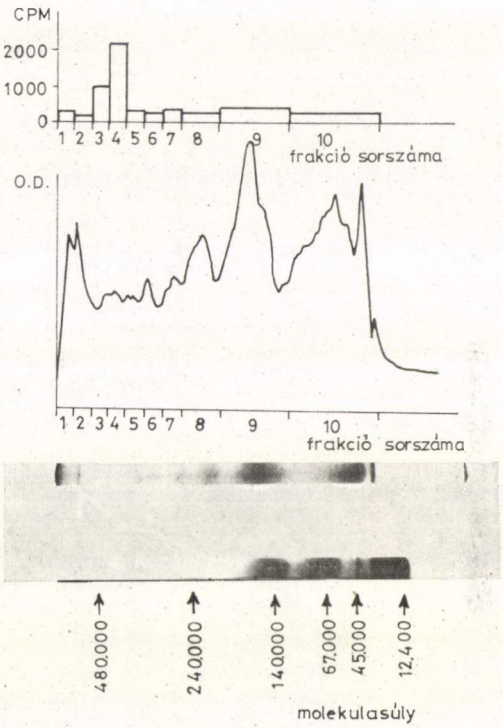


14. ábra. [^{3}H]-glicin beépülése altatott macska asszociációs kérgébe (AMSA) spontán aktivitás alatt (baloldalt), akusztikus ingerlésre (középen) és SS-ingerlésre (jobboldalt). Alul elektrokortikogramok

beli kontiguitás kiemelkedő szerepét egy ilyen intracelluláris mechanizmus magyarázhatná.

Mint látja a tisztelt hallgatóság, ezzel megközelítettük a fiziológiai módszerek teljesítőképességének határait s olyan sejten belüli, finomabb folyamatokba ütköztünk melyek már csak a biokémiai és ultrastrukturális módszerek együttes alkalmazásával ismerhetők meg. E felismerés alapján kezdtünk kollaborációt az SZBK Neurobiológiai csoportjával, élén Joó Ferenccel, s arra teszünk kísérletet, hogy kondicionálás eredményeként plasztikus változásokat mutató szinapszisokat identifikáljuk. Ha ez megtörtént, mód nyílhat azon finomabb módosulások felkeresésére, melyek a szinaptikus hatásfok emelkedését

tükrözik. Párhuzamosan, szükségesnek látszik az idegszövetből azon fehérjék izolálása, melyek szintézisére, foszforilálódására és/vagy tubuláris transzportjára az ingerület serkentően hat. Ilyen fehérjét már találtunk s Rojik Imrével (14) autoradiográfiásan (14. ábra), Novák Róberttel pedig elektroforetikus úton (15. ábra) részlegesen sikerült izolálni (16. ábra). Természetesen nem ab ovo következik, hogy ez a nagy glicintartalmú fehérje éppen az, amely a



15. ábra. Ingerelt hallókéregbe beépült ^{14}C-glicint tartalmazó fehérjék analízise PAG-elektroforézissel. Felül: az egyes frakciók radioaktivitása CPM-ben; középen: a PAG denzitogramja, Alul: a vizsgált gél és a mólsúly standard gél fényképe. A 3. és 4. frakció kiemelkedően nagy specifikus aktivitást jelez

szinaptikus hatásfok növekedésében szerepet játszik, de példáját nyújtja annak hogy az ingerület és fehérjeszintézis között ilyen kapcsolat létezik.

Az elmondottakat egy kissé távolinak tűnő analógiával szeretném alátámasztani és szemléltetni: sok millió kilométeres átmérőjű csillagok, sőt galaxisok keletkezését, sorsát az asztronómia akkor tudta csak magyarázni, mikor az atommagban végbemenő folyamatokra fény derült. Hatalmas égi objektumok sorsa az elemi részecskék kölcsönhatásain, társulásán és szétválásán múlik, s reális szintézist csak e legmélyebb összefüggések birtokában

lehet felépíteni. Meggyőződésem, hogy így van ez az idegrendszer esetében is, s ma már világos, hogy sejtszinten, sőt szubcelluláris szinten várható újabb felismerések azok, melyek az idegrendszer egészének megértéséhez közelebb visznek.

IRODALOM

1. Ádám György: Elemi agyi információtárolási mechanizmusok. MTA Biol. Oszt. Közl. **14,** 275—300 (1971).
2. Banczerowskiné Pelyhe Ilona, Szilakov, V. L.: Plasztikus neuronaktivitás-változások izolált emlős agykéregben. MTA Biol. Oszt. Közl. **22,** 193—215 (1979).
3. Baranyi, A., Fehér, O.: Conditioned changes of synaptic transmission in the motor cortex of the cat. Exp. Brain Res. **33,** 283—298 (1978).
4. Baranyi, A., Fehér, O.: Intracellular studies on cortical synaptic plasticity: conditioning effects of antidromic activation on test EPSPs. Exp. Brain Res. **41,** 124—134 (1981).
5. Baranyi, A., Fehér, O.: Heterosynaptic facilitation in the motor cortex of the cat. Neuron Concept Today (eds. J. Szentágothai, J. Hámori, E. S. Vizi) pp. 255—256. Budapest, Akadémiai Kiadó, (1977).
6. Bental, E., Bihari, B.: Evoked activity of single neurons in sensory association cortex of the cat. J. Neurophysiol. **26,** 207—214 (1963).
7. Brindley, G. S.: The classification of modifiable synapses and their use in models of conditioning. Proc. Roy. Soc. B. **168,** 361—376 (1967).
8. Fambrough, D. M., Devreotes, P. N.: Newly synthetised acetylcholine receptors are located in the Golgi apparatus. J. Cell. Biol. **76,** 237—244 (1978).
9. Fehér, O., Baranyi, A.: On the elementary mechanisms of the memory trace formation. Acta Physiol. Hung. (közlésre elfogadva).
10. Gardner-Medwin, A. R.: Modifiable synapses for learning. Nature **223,** 916—919 (1969).
11. Griffith, J. S.: A theory of the nature of memory. Nature **211,** 1160—1163 (1966).
12. Kandel, E. R., Tauc, L.: Heterosynaptic facilitation in neurones of the abdominal ganglion of Aplysia depilans. J. Physiol. (London) **181,** 1—27 (1965).
13. Kandel, E. R., Tauc, L.: Mechanism of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of Aplysia depilans. J. Physiol. (London) **181,** 28—47 (1965).
14. Rojik, I., Fehér, O.: Correlations between glycine incorporation and cerebral cortical activity. Exp. Brain Res. **39,** 321—326 (1980).
15. Szmetankin, G. N.: Involvement in the temporary connection of units of the visual and associative cortical areas of the cat. Zsurnal Vüszs. Nerv. Dejat. **20,** 563—569 (1970).
16. Weisenberg, R. C.: Microtubule formation in vitro in solution containing low calcium concentrations. Science **177,** 1104—1105 (1972).

NEURONÁLIS RENDSZEREK ANALÍZISE ÉS SZINTÉZISE

LÁBOS ELEMÉR

Semmelweis Orvostudományi Egyetem
1. sz. Anatómiai Intézete, Budapest

Az idegélettan és az idegrendszer szövettana olyan neuronfogalmat használ, ami lehetővé teszi, hogy kísérleti úton, mérésekkel vagy megfigyelésekkel az idegsejteket más sejtektől megkülönböztessük és a neuronok alosztályait is definiálhassuk. Hasonlóan ehhez, a neuronhálózat fogalma is határozott annyira, hogy morfológiai elemzéssel vagy elektrofiziológiái mérésekkel egyértelműen meg lehet állapítani az elemi egységek kapcsoltságának tényét, leírható a kapcsolatok sokasága és alkalmas méréssel kimutatható és jellemezhető a neuronok viselkedésének és működésének összefüggő jellege.

A fenti fogalmak azonban nem eléggé elvontak ahhoz, hogy azokra alapozva nem triviális elméleti megfontolásokat lehessen alapítani, összetettebb tulajdonságokat nem csupán megsejteni, hanem akár kiszámítani lehessen. Ehhez a formalizálás radikálisabb foka szükséges. A további elméleti, ill. matematikai megfontolások és értelemszerűen a levonható következtetések jellege és értéke attól is függ, hogy a valóságos neuronok milyen tulajdonságait véljük fontosaknak és melyeket elhanyagolhatóaknak. Az absztrakció minőségének megfelelően így a reális neuronális rendszerek formális modelljeinek sokasága konstruálható. Ezek értéke természetesen nem az alkalmazandó matematikai technikától, hanem attól függ, hogy a modell mennyire interpretál megfigyeléseket és hogyan jósol meg közvetlenül meg nem figyelt jelenségeket.

Neuronok, neuronhálózatok és viselkedésük formalizálása

Az egyik legkorábbi és egyben leginkább elvont formális neuron és neuronhálózat modell MCCULLOCH és PITTS (1943) elméleti konstrukciója. E sokszor és nem mindig adekvát módon kritizált fogalomrendszer a neuronok állapotának és működésének leegyszerűsítése és azok rögzítése miatt túlzottan elkötelezett, feltéve, hogy a formális neuron fogalmát — amint az az eredeti elképzelésben szerepel — közvetlenül a valóságos neuron absztrakt megfelelőjének tekintjük. Úgy tűnik, hogy e modell alkalmazása során ez a felfogás vezethet a legtöbb hibás eredményhez. Másrészt viszont a formális neuronok-

ból konstruált hálózatok *alkalmasak* mindazon jelenségek interpretálására, amelyekre a *véges automaták* képesek (KLEENE 1956). Utóbbiak azonban nem feltétlenül végeznek olyan számításokat és nem feltétlenül működnek olyan jelek segítségével mint a formális neuronhálózatok. Ennek ellenére mégsem reprezentálnak „nagyobb kapacitású" gépeket mint a MCCULLOCH—PITTS-hálózatok. E két ekvivalens elméleti rendszer azonban végesen diszkretizált idő-modellt használva alkalmas tetszőleges, véges megfigyelési időben előforduló jelenség „szimulálására" ha a leírandó rendszer véges sok állapotát tekintjük csak lényegesnek. Nyilvánvaló tehát, hogy a modellek ilyen osztályának értéke azon múlik, hogy a formális neuronok vagy neuronhálózatok milyen valóságos neuronális részeket vagy folyamatokat reprezentálnak.

A formalizálás másik hagyományos útja az axonális, ill. neuronális kisülést leíró HODGKIN—HUXLEY (1952) modell és módosításainak alkalmazása. Valóságos hálózatok elméleti analízisére azonban ez az út a számítások rendkívüli sokasága miatt ma még nem eléggé hatásos.

A formalizált modellek egyik osztályának lényeges és gyakran kifogásolt tulajdonsága a „determinisztikus" jelleg. Ennek lényege az, hogy a leíró objektumok függvények, amelyeknek „értéke" az argumentum ismeretében egyértelműen kiszámítható. A modellek ilyen értelemben „elfajult" osztályait természetesen könnyen és sok különféle módon lehet általánosítani úgy például hogy a szereplő függvényeket általánosított hírközlési csatornákkal vagy véletlen relációkkal helyettesíthetjük. Ilyenkor természetesen sok új paraméter értékének posztulálása elengedhetetlen. Így valószínűségek értékét kell feltételezni, vagy azok becslését kísérletes úton kell meghatározni.

Más értelemben tapasztalható valóságos határozatlanság viszont az, amikor állati egyedek vagy fajok ekvivalens idegrendszeri egységeit, hálózatait összehasonlítva „pontatlanságot", variabilitást észlelünk. Ilyenkor még nem kell feltétlenül „megbízhatatlanul működő" gépekhez mint modellekhez folyamodni, hanem az összes lényeges variációt magában foglaló modell-osztály általános tulajdonságait lehet magyarázó értékűnek tekinteni. A huzalozás determinálatlansága és a neuronok nagy száma mellett a számítási feladatok nagy mérete is kedvez annak, hogy egy-egy modellt „véletlenítsünk". Ekkor azonban kedvező esetekben is meg kell elégedni várható értékek és valószínűségek kiszámításával.

A határozatlanság másik aspektusa a kiváltott és spontán neuronális tevékenység korlátozott reprodukálhatósága, ami adaptív, tanuló, ill. megbízhatatlan elemekből felépített formalizált rendszerek konstrukciójához vezetett (NEUMAN 1956, MINSKY and PAPERT 1969, JOHANNESMA 1967).

Az axiomatikus leírás szükségessége

A valóságos neuronokra és neuronhálózatokra vonatkozó lényeges adatok két fő forrása a kapcsolatok morfológiai leírása és a válaszok, ill. spontán tevékenység elektrofiziológiai úton történő megfigyelése. A „lényeges" jelző abban az értelemben jelent megszorítást, hogy a szóban forgó elméleti analízis végső célja az idegrendszeri szabályozó működések olyan szintű megértése, ami adekvát gyakorlati (pl. terápiás) beavatkozásokat tesz lehetővé, feltéve, hogy egyéb (pl. neurokémiai) szempontból az ismeretek, ill. az eszközök kielégítőek.

A neuromorfológiai — és szempontunkból fontos — adatok a neuronális kapcsolatok és a neuronok geometriai tulajdonságainak leírásában állnak. Sok, számlálásra szorítkozó, kvantitatív hisztológiai adat viszont még túl sok szabadságot enged meg és csak igen szerény vagy sokértelmű funkcionális konklúziót tesz lehetővé.

Ha a neuronális rendszerek elméletének axiomatikus megalapozására törekednénk, akkor az axiómák egy csoportja a neuronok vagy funkcionális szempontból fontosnak vélt neuron-részek kapcsolatának listázásában, esetleg azok „izgató", ill. „gátló" jellegének posztulálásában merülne ki. Ez elérhető definiálatlanul hagyott elemek közötti *huzalozási* (egyszerű vagy összetett) reláció megadásában (LÁBOS 1975). Az axiómák, ill. posztulátumok második csoportja szükséges viszont ahhoz, hogy az adott huzalozású hálózat magatartásáról egyáltalán beszélhessünk. Az axiómák e második csoportjában kerülne sor a jelek és neuronális „számítások" megadására. Pl. a MCCULLOCH—PITTS-modell (1943) e vonatkozásban rögzített. Nyilvánvaló ellenben, hogy a huzalozási posztulátumok megadása önmagában még alig jelent elkötelezettséget e klasszikus modell irányában, vagyis adott huzalozás praktikusan semmit nem mond a működésre nézve. A hálózat „megszólaltató" második posztulátumcsoportra a hálózat által „használt" *nyelvre* fogunk hivatkozni. Ez szélesen értelmezett esetben alkalmas arra, hogy adott állapot és bemenet esetében a hálózat jövőbeli állapotát és válaszát kiszámíthatóvá tegye. Ebben az értelemben a neuronális rendszer már konkrét automata, amelynek viselkedése vizsgálható.

A valóságos hálózatok tulajdonságait leíró posztulátumrendszer további részeket is tartalmazhat. Ezek elsősorban a nyelv lassabban végbemenő spontán vagy kiváltott változásainak leírására kell, hogy szorítkozzanak. Vagyis olyan tények figyelembevételére, mint adaptáció, akkomodáció, refrakteritás, fáradás, tanulás, megbízhatatlanság stb.

A továbbiakban csak a huzalozásra és a nyelvre vonatkozó posztulátumokból álló rendszerek vizsgálatára szorítkozunk. A „változási posztulátumok" egy része helyettesíthető rögzített huzalozású és nyelvvel rendelkező neuronális rendszerek részei között lezajló kölcsönhatás feltételezésével. Ez utóbbi problematika részletezésétől ugyancsak eltekintünk.

Neuronhálózatok analízise és szintézise

Tegyük fel, hogy az axiómarendszerünk mind huzalozási, mind nyelvi posztulátumokat tartalmaz. Ilyen rendszerek konstruálhatók akkor, ha egy adott huzalozású (véges) hálózat elemeinek, a neuronoknak a McCulloch—Pitts-elméletben előírt működéseket tulajdonítunk. Még ebben az esetben is fennáll az a többértelműség, hogy az egyes neuronokat sok különböző módon lehet formális neuronként értelmezni. Például, ha egy neuront két izgató bemenő huzal innerválja, akkor az mind és- mind vagy-kapu lehet. Ha még az sincs rögzítve, hogy a két befutó huzal izgató vagy gátló, akkor a lehetséges „funkciók" száma 14 lehet. Sőt, ha rögzítjük a befutó két huzal hatásának előjelét és a hatások „erősségét", ahogyan azt az elmélet előírja, akkor a küszöb változtatásával az előző rögzítéstől függően más és más számú, de általában több különböző magatartású neuronként foghatjuk fel ugyanazt a hálózati modult vagy formális neuront. Illúzió tehát azt hinni, hogy pusztán a morfológiai adatokat reprezentáló huzalozás (beleértve akár egy-egy neuron geometriáját szimuláló elemeket és összeköttetéseket) egyértelműen meghatározza a hálózat magatartását, ill. működését. Mindenesetre, ha a huzalozás mellett rögzítjük az egyes neuronok által reprezentált függvényeket (pl. McCulloch—Pitts-függvényt) akkor a hálózat magatartása kiszámítható. Egy ilyen vagy több ilyen rögzítés mellett *a magatartás kiszámítását* az adott hálózat vagy huzalozás *analízisének* nevezzük.

A formális neuronhálózatok elméletében a hálózat magatartása a hálózat állapotátmenet gráfja, amelyre az jellemző, hogy a gráf egy adott pontjából egyetlen egy másik ponthoz vezet él, ami a hálózatot leíró objektum jellegéből következik, hiszen az egy speciális igazságfüggvény. Mivel a formális neuronhálózatnak véges sok állapotot lehet tulajdonítani, ezért az állapotátmenet-gráf, — feltéve, hogy a hálózatot állandó „külső" befolyás éri —, diszjunkt részgráfokból áll, amelyek típusai az alábbiak: 1. fixpont átmeneti állapotokkal, 2. izolált fixpont, 3. többpontos ciklus átmeneti állapotokkal, 4. izolált többpontos ciklus. Minden egyes rögzített külső hatáshoz egy-egy ilyen, általában több és különböző típusú részgráfokból álló magatartás tartozik. Bizonyítható, hogy legfeljebb 3 neuronból álló neuronhálózatokkal minden lehetséges „típus-összetételű" hálózatmagatartás reprezentálható.

Annak illusztrálására, hogy már igen egyszerű huzalozások sokféle lehetséges funkcionális rögzíthetősége a modellek milyen sokaságához vezethez, szolgáljon az alábbi példa (Lábos 1977a). A corpus geniculatum laterale egyik jellegzetes szinapszis együttese 3 szinapszisból áll. Az a, b és c-vel jelölt retinális végződés, relésejt részlet, ill. interneuron-profil között ab, ac és cb irányú szinapszisok vannak. Ha e 3 elemet még esetleg érő „külső" hatásokat is figyelembe vesszük, akkor egy-egy 1, 2, ill. 3 bemenő-huzallal rendelkező formális neuronból álló hálózattal írható le a szinaptikus triád. Mivel 4,14, ill. 104 db

1,2, ill. 3 bemenetű formális neuron létezik és ezek egymástól függetlenül választhatók meg, ezért ennek az egyszerű „lokális" neuronhálózatnak 5824 különböző magatartást tulajdoníthatunk. Ezek közül egyéb, de már csupán plauzibilis kritériumok alapján kiválasztható néhány „érdekes" magatartású változat. Így a lehetséges esetek között megtalálhatók a látórendszer *on*-, ill. *off*-egységeihez hasonló viselkedésű hálózatok, amelyek „tónusos" bementi jelsorozatot „fázisossá" alakítanak át. Ezekből a speciális változatokból további — de ugyancsak heurisztikus — megfontolások révén bonyolultabb (lokális) hálózatok építhetők fel, amelyek többek között alkalmasak álló és mozgó „inger" (bemenő jel) megkülönböztetésre, továbbá a mozgó inger méretének és sebességének, sőt speciális esetben a mozgás irányának a felismerésére is. A modellezés fenti módja lényegében csak azt igazolja, hogy az adott morfológiai tény magyarázó erejű, vagyis a szinaptikus triádok *elegendőek* ugyancsak létező működések, látórendszeri teljesítmények megvalósítására. Azt, hogy vajon szüségesek-e, mástermészetű érveléssel lehet alátámasztani: az adott teljesítményt realizáló neuronhálózat *szintézis*ével.

A formális neuronhálózatok szintézise adott „térbeli" állapot adott átmenetét megvalósító hálózat paramétereinek (a huzalozás mátrixának és a küszöb-vektornak) a kiszámításából állhat. De előírható egyetlen formális neuron időbeli viselkedése is, amikor azt a neuronhálózatot keressük, amelynek létezik olyan neuronja, amelyik az előírt módon viselkedik. Kimutatható, hogy a mozgáspercepció elemi egysége, a mozgás alkalmas definíciója mellett, éppen az a szinaptikus triád lesz, amelyik analízisének egyik eredménye pontosan az, hogy elegendő a mozgás elemi percepciójára (LÁBOS 1977b). Induljunk ki abból, hogy az inger valamilyen neuronhálózat egy állapota, melynek egyik komponensében beálló 0—1, ill. 1—0 időbeli átmeneteket kívánjuk észlelni. Nyilván ezek az időbeli átmenetek definiálhatók a kép mozgásaként. A megfelelő 0—1, ill. 1—0 térbeli állapot-különbségek „kontrasztként" értelmezhetők. Így az elemi mozgás, ill. elemi kontrasztfelismerés ugyanazon teljesítmény tér-, ill. időbeli változatai. Ha x_k és x_{k+1} jelentik az egymást térben vagy időben követő állapotokat, akkor az $y = \bar{x}_k \cdot x_{k+1}$, ill. $z = x_k \cdot \bar{x}_{k+1}$ igazságfüggvények írják le a megfelelő on-, ill. off-választ. Igazolható, hogy, ha egy modult aktiválás és késleltetett gátlás ér, akkor az csak az aktiválás kezdetét, ha gátlás és késleltetett aktiválás ér, akkor az csak az aktiválás végét észleli. Lényegesebb viszont, hogy az aktiválás, a késleltetés, ill. gátlás fenti mintái szükségesek az adott működés realizálásához. Így plauzibilis érv szól amellett, hogy a szinaptikus triádok elegendő és szükséges elemi egységei a mozgás detektálásának.

Hálózatszintézis unit-regisztrátumok alapján

Amíg a neuromorfológus érdeklődésének egyik tárgya az lehet, hogy hálózati leírásainak „funkcionális interpretációját" keresse, addig az extravagy intracelluláris regisztrátumokat észlelő neurofiziológus a megfigyeléseket generáló huzalozást vagy szeparált blokkokból álló „sémákat" keres. E kétségtelenül létező törekvések egyik okozója az, hogy ritka esetben lehetséges ugyanazon objektumról egyidejűleg kielégítő morfológiai és funkcionális leírást kapnunk. Ennek még további oka pedig részben a rendelkezésre álló morfológiai és elektrofiziológiai módszerek alacsony hatásfokában rejlik. Ezért e komplementer adat-osztályok egymással történő interpretálása vagyis az egymás nyelvére történő fordítása elméleti eljárásokat igényel. Természetesen ezek az interpretációs igények nem merítik ki az említett tudományok célkitűzéseit, hiszen ezekből explicite hiányzik az állatok percepciójának, magatartásának konkrét elemzése. Így indokolt, ha az idegsejt-kisülések tér- és időbeli mintáit csupán a hálózatok magatartásának és nem funkciójának nevezzük, hiszen ezek csupán a reguláció formáit és nem annak tartalmát képviselik.

A unit-regisztrátumok alapján történő neuronhálózat-szintézis kiinduló objektuma — némi absztrakció révén ugyan — tekinthető az idő folytonos és legalább kétszer differenciálható függvényének, amit R-rel jelölünk. Az R(t) érték jelenti t időpontban a regisztráló elektródák közötti potenciálkülönbséget. Mivel a kisülés-sorozatok viszonylag egyforma jelekből állnak nem tűnik lényeges hanyagolásnak, ha valamilyen módon egyetlen kisülésnek a kisülés „időpontját" feleltetjük meg.

Az eredeti R regisztrátumban előforduló kisülések időpontjának sorozatát az R objektum *pontfolyamat-modelljének* nevezzük. Az időpontok e sorozata „viszonylag" egyértelműen meghatározható R ismeretében. Legyen igaz c-re, hogy $\max R(t) > c > \min R(t)$, ahol t a megfigyelési periódus egy pontja. Ekkor az alábbi P_c halmazt nevezzük pontfolyamatnak: $P_c = \{t \mid R(t) = c \text{ és } \dot{R}(t) < 0\}$. Nyilvánvalóan sok hasonló definíció lehetséges, amelyek a unit-regisztrátumok tulajdonságai miatt egymáshoz képest „eltolt" sorozatokat eredményeznek, vagyis az eltérések nem túl lényegesek. Fontosabb viszont, hogy a P_c objektum — legalábbis akkor, ha R intracelluláris regisztrátum — határozottan kevesebb információt tartalmaz mint az eredeti R, hiszen ha c elég nagy, akkor a küszöbalatti (szinaptikus és generátor-) potenciálokra vonatkozó információt elhanyagoljuk. Ez természetesen nem jelent végleges veszteséget amennyiben az eredeti R-t tároljuk. A P_c pontfolyamattal ekvivalens a szukcesszív intervallumok sorozata: $d_k = t_{k+1} - t_k$, ill. $t_k = \sum_{j=1}^{k-1} d_j$. Az intervallumok sokaságát T jelöli. A szukcesszív intervallumok sorozata hagyományosan sokat elemzett objektum és elsősorban korrelációanalízis tárgyát képezi (lásd pl. MESERSZKIJ 1972). Ahhoz azonban, hogy a kisüléssorozatot

vagy sorozatokat interpretáló hálózatot konstruálhassunk még további absztrakció szükséges. Mivel a P_c és T halmazok végesek, így a minT legkisebb intervallum mindig létezik. Ha a megfigyelési időtartamot minT hosszúságú félig zárt, ekvidisztáns, diszjunkt intervallumokkal teljesen lefedve beosztjuk, akkor minden intervallumban legfeljebb egy $t_i \in P_c$ időpont (kisülés) esik. Ennek az intervallumnak a sorszáma lesz az illető időpont(kisülés) címe: address$(t_i) = 1 +$ entier (t_i/minT). Az egymást követő intervallumokban megszámlálva a pontokat, a min T felbontásához tartozó *időbeli sűrűség-diagramot* nyerjük, ami adott esetben egy 0—1 sorozat. Természetesen nagyobb (pl. az átlagos) hosszúsági intervallummal történő felbontás nem 0—1, hanem más egészeket is tartalmazó sorozatokat eredményezhet. Az időbeli-sűrűség diagramot F_h-val, speciálisan F_{minT}-vel jelöljük. E sorozat elemei per definitionem nem negatív egészek és nyilvánvaló, hogy az F_h sorozatok a cím szerint közönséges értelemben nem differenciálható függvények. Az F_h elemei *kisülési frekvenciák*, amelyeket hagyományosan az „idegrendszer által használt jeleknek" tekintenek. Látható az F_h származtatásából, hogy az határozottan függ h értékétől, ezért az idegrendszeri jelek és kód elmélete semmiképpen sem nélkülözheti a h felbontásnak megfelelő „integrációs idő" fogalmát. Így a neuronokra jellemző temporális summáció leírása vagy modellálása ugyanezt a fogalmat implikálja.

Mindenesetre igazoltuk eddig, hogy az F_{minT} objektum 0—1 sorozat lévén alkalmas kiindulás lehet formális neuronhálózatok szintéziséhez. Ehhez e sorozatok „időbeli szerkezetét" leíró igazságfüggvényeket kell találnunk. Ilyen leíró függvényt kapunk, ha a 0 és 1 számokat logikai változókkal reprezentálva az F_{minT} sorozat adott hosszúságú szalag-darabjai után közvetlenül következő értékeket megfigyeljük és az eredményeket táblázatban rögzítjük. Ha e szalagok hossza túl rövid, akkor a táblázat nem lesz egyértékű. Ekkor az argumentumok egy-egy értékéhez eloszlásokat rendelhetünk és a kapott táblázatot egy véletlen függvény „becsléseként" értelmezhetjük, vagy növeljük a megfigyelendő argumentum-szalagok hosszát addig amíg a táblázat nem lesz lege artis függvény.

A tulajdonképpeni hálózatszintézis ezután következik, amikor ismert módon, a McCulloch—Pitts-elméletben előforduló szinaptikus súlyokra és küszöbre vonatkozó lineáris egyenlőtlenségrendszert megoldjuk (Muroga 1971). Ha az F_h sorozatot leíró „folytonos" rekurzív igazságfüggvény nem szeparálható lineárisan, akkor a kisülés-sorozatot interpretáló gép nem formális neuronokból felépülő hálózat, hanem az elemi egységek maguk is (speciális) neuronhálózatok, amelyek az igazság-függvények diszjunktív normálformája alapján *mindig* szintetizálhatók.

A fenti R, P_c, T, F_{minT}, leíró-függvény, hálózat objektumokon keresztül történő szintézis eljárás eddigi tapasztalataink szerint általában nagyméretű hálózatokat eredményez, mert a valóságos sorozatok csak lokálisan, rövid

szakaszokon eléggé „regulárisak". A végeredmény hálózat moduljai nem mindig, sőt ritkán reprezentálnak valódi neuronokat, hanem gyakran „időállandókat" (ha szélsőséges hosszúságú periodicitások egyaránt előfordulnak) vagy „funkcionális tulajdonságokat" mint például más neuronok frekvenciájának felismerése (speciálisan temporális summáció). A vázolt modellezés egy további sajátossága, hogy a leíró függvények parciálisan definiáltak, vagyis sok különböző módon tehetők teljesen definiálttá, ami számos predikciót szolgáltat. Végül, ha a leíró függvény tabulázását rövid szalagokkal kezdjük (vagyis az argumentumok kis dimenziójú 0—1 temporális vektorok), akkor többször lép fel többértelműség és sztochasztikus-automata modellhez lehet folyamodnunk. Így vagy nagyméretű és inkább, ill. teljesen determinisztikus vagy kisebb méretű és egyre inkább „sztochasztikus" leírást kaphatunk. A méretcsökkentés másik útja, ha a h felbontási állandó értékét növeljük. Ekkor azonban a hálózat moduljai nem lehetnek klasszikus formális neuronok, hanem pl. általánosított mérőautomaták (LÁBOS 1975). A vázolt nehézségek ellenére azonban rövid kisülési regularitások nem-triviális és legalábbis további gondolatokat ébresztő absztrak gépi interpretációi nyerhetők. További gondot jelent azoknak a kritériumoknak a megfogalmazása, amelyek a sok nyerhető megoldás szelekcióját lehetővé teszik.

IRODALOM

HODGKIN, A. L.: The conduction of the nervous impulse. Liverpool University Press, Liverpool (1964).

JOHANNESMA, P. I. M. (1967): Diffusion Models for the Stochastic Activity of Neurons. In: Caianiello, E. R. (ed.): Neural Networks. Springer Verlag, Berlin (1968).

KLEENE, S. C.: Representation of Events in Nerve Nets and Finite Automata. In: C. E. Shannon and McCarthy (eds): Automata Studies, Princeton University Press, Princeton N. J. pp. 3—42. (1956).

LÁBOS, E.: A huzalozás és a nyelv jelentősége neuronhálózatok viselkedésében és információkezelésében. MTA Biol. Oszt. Közl. **18,** 325—340. (1975).

LÁBOS E.: Theoretical Considerations of Local Neuron Circuits and Their Triadic Synaptic Arrangements (TSA) in Subcortical Sensory Nuclei. J. of Neurosci Res. **3,** 1—10. (1977a).

LÁBOS E.: Neuronal Networks Detecting Movements of Input Signals. In Proceedings of IFAC Symposium on Control Mechanism in Bio- and Ecosystems. Vol. **3,** pp. 25—33. Leipzig (1977b).

MCCULLOCH, W. S. and PITTS, W.: A Logical Calculus of the Ideas Immanent in Nervous Activity. Bull. Math. Biophys. **5,** 116—133. (1943).

МЕШЕРСКИЙ, Р. М.: Анализ Нейронной Активности. Издательство »Наука«. Москва (1972).

MINSKY, M. L. and PAPERT, S.: Perceptrons. The MIT Press, Cambridge, Mass. (1969).

MUROGA, S.: Threshold Logic and its Application. Wiley-Inter-Science, New York (1971).

NEUMANN, J.: Probabilistic Logics and the Synthesis of Reliable Organisms of Unreliable Components. In: C. E. Shannon and McCarthy (eds): Automata Studies, Princeton University Press, Princeton N. J. pp. 43—98. (1956).

NEURONHÁLÓZATOK ÖNSZERVEZŐDÉSÉNEK EGY MATEMATIKAI MODELLJE

ZIMÁNYI JÓZSEF

Központi Fizikai Kutató Intézet, Budapest

1. Bevezetés

Az idegrendszer kutatásának egyik alapproblémája annak megmagyarázása, hogy hogyan szerveződik egy hatékonyan működő hálózatba a központi idegrendszerben lévő óriási számú neuron. (Az ember központi idegrendszerében lévő neuronok számát 3×10^{10}-re tehetjük. Egy-egy neuron átlagosan mintegy 10^3 neuronnal van kapcsolatban.) E hálózat pontos megadásához olyan sok információra van szükség, hogy kizártnak tekinthetjük a teljes információ DNS-ben kódolt genetikai átvitelét. Genetikusan csak a hálózat globális vonásai lehetnek meghatározottak. Szükséges tehát feltételezni, hogy a neuronhálózatnak rendkívül hatásos önszerveződő képessége van, aminek révén az eredetileg véletlenszerűen, csak statisztikusan megadott módon kapcsolódó neuronok egy hatékony, koherensen működő hálózattá alakulnak.

A következőkben egy modell-rendszer vizsgálata kapcsán rámutatunk ezen önszerveződés egy lehetséges módjára. A modellünk [2] egymással kölcsönösen gátló kapcsolatban álló neuronokból áll. Az egyes neuronok aktivitását egy egyszerű, általános tanuló elv szabályozza. Megmutatjuk, hogy ez a rendszer, véletlen eloszlásban érkező ingerek hatására bármilyen kezdő állapotból ugyanabba a jól meghatározott állapotba fejlődik.

A modellünkben felírt neuron egyenlet és memória egyenlet a [1-]ben javasolt egyenletekhez hasonló. A neuronhálózatok tárgyalásának bevezető jellegű összefoglalását [6]-ban írtuk le.

2. A modell leírása

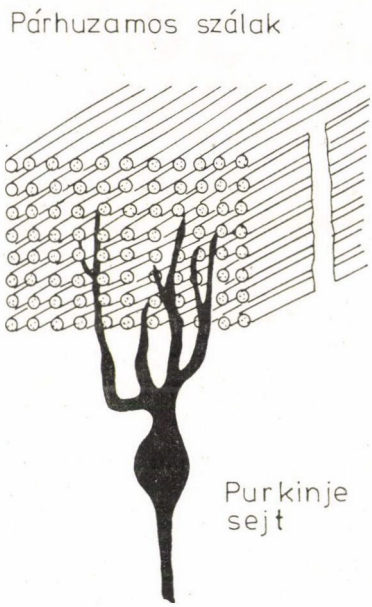
Modellünk felállításában a kisagy szerkezetét tartottuk szemünk előtt. A bemenet N darab neuron axonból álló kötegen (1. ábra) érkezik (hasonlóan a kisagy párhuzamos szálakból álló rétegéhez). Egy adott időpontban a szálak egy része aktív, impulzust szállít, míg a többi inaktív.

(Egy impulzus hossza körülbelül egy ezred másodperc). Így a párhuzamos szálak kötegének egy metszetében „villogó ábrákat" észlelhetnénk (ez az elrendezés hasonló a független impulzusokat szállító optikai üvegszál köteghez). A párhuzamos szálakat megszámozzuk 1-től N-ig. A t időben a köteg kereszt-

metszetében észlelhető ábrát az A(t) vektorral adjuk meg. Az A(t) elemei a 0 vagy 1 értéket veszik fel aszerint, hogy a megfelelő párhuzamos szál aktív vagy inaktív volt-e a t időpillanatban:

$$A(t) = (a_1(t),\ a_2(t),\ \ldots,\ a_N(t)) \tag{1}$$

$$a_i(t) = \begin{cases} 1, \text{ ha az i-ik szál aktív a t időpillanatban,} \\ 0, \text{ ha az i-ik szál inaktív a t időpillanatban.} \end{cases}$$



1. ábra. A kisagybeli Purkinje sejt és a párhuzamos szálak kapcsolatának vázlatos képe

Ezek az ábrák jelennek meg a P neuronok bemenetein. (A kisagyban a Purkinje sejtek valóban ilyen ábrákat „figyelnek" dendritjeik segítségével). A bemeneti helyek a párhuzamos szálak és a P neuron dendritje közötti szinapszisok. Minden szinapszishoz egy erősséget rendeltünk. A k-ik párhuzamos szálat az i-ik P neuronhoz kapcsoló szinapszis erősségét jelöljük $c_k^{(i)}$-val. Egy ehhez a szinapszishoz érkező impulzus a P neuron axon dombjának feszültségét $\Delta v^{(i)}$-vel növeli. A szinapszis erősségét ezzel a potenciál változással definiáljuk:

$$c_k^{(i)} \equiv \Delta v^{(i)}. \tag{2}$$

Az i-ik P neuron gerjeszthetőségét a

$$C^{(i)} = (c_1^{(i)},\ c_2^{(i)},\ \ldots,\ c_N^{(i)}) \tag{3}$$

érzékenységi vektorral karakterizálhatjuk. Az i index az $i = 1, 2, \ldots, M$ értéket veheti fel, ahol is M a P neuronok száma. Természetesen igen sok $c_k^{(i)}$ zérus, mert egy P neuron nem csatlakozik az összes párhuzamos szálhoz.

Egy neuron működését a következő módon írjuk le. A neuron $v^{(i)}(t)$ gerjesztési potenciálja, ha egyéb input nem érkezik, időben exponenciálisan csökken λ csökkenési állandóval. (A gerjesztési potenciált a neuron nyugalmi potenciáljától számíthatjuk.)

A neuron aktívvá válik, ha potenciálja az axon dombon meghaladja az $s^{(i)}$ küszöb értéket. Ekkor a neuron egy τ hosszúságú, nem csökkenő impulzust emittál az axonja mentén. A P neuront gátló típusúnak tekinthetjük, így axonjának minden szinaptikus csatlakozásánál gátló hatást fejt ki (azaz nem növeli, hanem csökkenti a hozzá csatlakozó neuronon potenciálját). Ezt az aktivitást a $w^{(i)}(t)$ függvénnyel írjuk le:

$$w^{(i)}(t) = \begin{cases} 1, \text{ ha } v^{(i)}(t') \geq s^{(i)}, \ (t-\tau) < t' \leq t, \\ 0, \text{ különben.} \end{cases} \tag{4}$$

A P neuron axonjának szinaptikus kapcsolata van a többi P neuronnal. Egy ilyen kapcsolat erősségét $g_j^{(i)}$-vel jelöljük; $g_j^{(i)}$-t azzal a potenciál csökkenéssel definiáljuk, mely az i-ik P neuron jön létre, akkor, amikor a j-ik P neurontól gátló impulzus érkezik.

A fenti diszkusszió alapján a neuron potenciál időbeli változását leíró egyenlet, mely megadja a potenciál $t + \tau$ időben felvett értékét a t időben mérhető adatok segítségével, így írható:

$$v^{(i)}(t+\tau) = \left[(1-\lambda)\, v^{(i)}(t) + \sum_{k=1}^{N} c_k^{(i)}(t)\, a_k(t) - \right.$$

$$\left. - \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{M} g_j^{(i)}\, w^{(j)}(t)\right](1 - w^{(i)}(t)), \tag{5}$$

$$w^{(i)}(t) = \begin{cases} 1, \text{ ha } v^{(i)}(t) \geq s^{(i)}, \\ 0, \text{ ha } v^{(i)}(t) < s^{(i)}, \end{cases}$$

$$i = 1, 2, \ldots, M.$$

Ezek az egyenletek a *neuron egyenletek*. Azt mutatják, hogy a neuron potenciál a $t + \tau$ időben úgy kapható meg, hogy a t időbeli potenciálból levonunk egy kis veszteségi tagot, $-\lambda v^{(i)}(t)$, hozzáadjuk a párhuzamos szálakon érkező gerjesztés hatását, $\Sigma c_k a_k$; levonjuk a többi P neurontól érkező gátlások hatását megadó tagot, $-\Sigma g_j w^{(j)}$. Végül egy szorzófaktort alkalmazunk, $(1 - -w^{(i)})$. Ennek a tényezőnek a hatására az impulzus-emisszió (tüzelés) után a neuron potenciál visszaáll az alapértékére és ott is marad a refrakter idő

$T_r = \tau$ (kb. 1 msec) alatt. A refrakter idő alatt a neuron nem gerjeszthető. Áttekinthetőbbek az egyenletek, ha a gerjesztési potenciált a küszöb potenciál egységekben fejezzük ki. Definiáljuk tehát a relatív gerjesztettséget a következő módon:

$$u^{(i)}(t) \equiv \frac{v^{(i)}(t)}{s^{(i)}}. \tag{6}$$

Az $u^{(i)}(t)$ relatív gerjesztettség időbeli változására vonatkozó egyenletet az 5. egyenletből kapjuk úgy, hogy annak mindkét oldalát elosztjuk a $s^{(i)}$ küszöb feszültséggel:

$$u^{(i)}(t+\tau) = \left[(1-\lambda)u^{(i)}(t) + \frac{1}{s^{(i)}} \sum_{k=1}^{N} c_k^{(i)}(t)\, a_k(t) - \right.$$

$$\left. - \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{M} h_j^{(i)} w^{(j)}(t)\right](1 - w^{(i)}(t)), \tag{7}$$

$$w^{(i)}(t) = \begin{cases} 1, \text{ ha } u^{(i)}(t) \geq 1 \\ 0, \text{ ha } u^{(i)}(t) < 1 \end{cases}$$

$$h_j^{(i)} = g_j^{(i)}/s^{(i)}$$

$$i = 1, 2, \ldots, M.$$

A neuron egyenletnek ezt az alakját használjuk a továbbiakban.

Amikor a neuron hálózatnak az A(t) vektorral jellemzett ábrák „villogására" adott közvetlen válaszát számoljuk, a szinaptikus erősségeket gyakorlatilag konstansoknak tekinthetjük. Egy hosszabb időskálán azonban ezek az erősségek is változnak, és ezáltal a hálózat tanulása lehetségessé válik. A szinapszis erősségek változására a Hebb-féle tanulási elvhez [3] hasonló elvet használunk. Ezt a tanulási elvet a következőkben fogalmazzuk meg:

a) ha egy, a $c_k^{(i)}$ erősségű szinapszison érkező $a_k(t)$ gerjesztést a P neuron tüzelése követi ($w^{(i)} = 1$), akkor ez a szinapszis erősödik (a hatásos gerjesztések erősítik a szinapszist);

b) minden szinapszis erősség exponenciális törvényeknek megfelelően gyengül;

c) a gátló szinapszisok $g_j^{(i)}$ erősségét konstansan tartjuk;

d) egy P neuron összegezett gerjesztő szinapszis erősségét konstanson tartjuk ($\Sigma c_k = \eta =$ konstans).

A fentiekben megfogalmazott tanulási elvet a szinaptikus erősségek időbeli változására vonatkozó következő egyenlettel foglaljuk össze:

$$c_k^{(i)}(t+\tau) = q^{(i)}[(1-\varepsilon)\, c_k^{(i)}(t) + \varkappa\, w^{(i)}(t) a_k\,(t-\tau)], \tag{8}$$

ahol a

$$q^{(i)} = \eta^{(i)} \Big/ \left(\sum_{k=1}^{M} [(1 - \varepsilon)\, c_k^{(i)}(t) + \varkappa w^{(i)}(t)\, a_k(t - \tau)] \right) \tag{9}$$

normálási faktor biztosítja, hogy a gerjesztő szinapszis erősségének összege ne változzon:

$$\sum_{k=1}^{M} c_k^{(i)}(t) = \eta^{(i)}. \tag{10}$$

A 8. egyenletet *memória egyenletnek* nevezzük.

Az itt javasolt tanulási mechanizmus nincsen ellentmondásban Szentágothai [5] és Marr [4] conjunctionális tanulási elvével, hanem alesetként tartalmazza azt. Nevezetesen a conjunctionális tanulási elv azt feltételezi, hogy a párhuzamos szál és a Purkinje sejt közti szinapszis akkor erősödik, ha a párhuzamos szálon érkező ingerrel egyidőben a kúszó roston is érkezik inger. Mivel azonban a kúszó roston keresztül jövő inger minden esetben tüzelésre kényszeríti a Purkinje sejtet, a conjunctionális tanulásnak ez a speciális esete az *a)* tanulási elv következményének is felfogható.

3. A modell tulajdonságainak kvalitatív vizsgálata

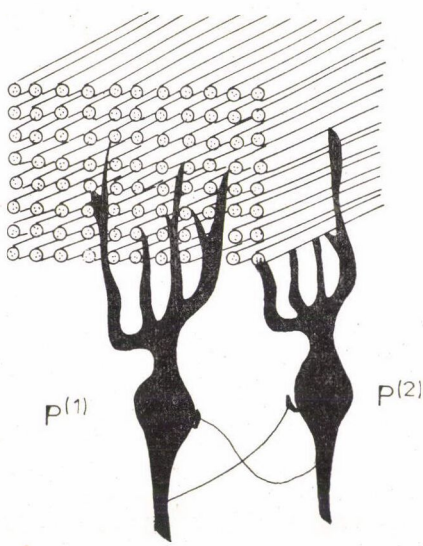
A 7. és 8. egyenletek meghatározzák a hálózat viselkedését adott bemenet esetén, ha a kezdeti értéket megadjuk. Tegyük fel, hogy a szinaptikus erősségek kezdőértékei véletlenszerűen oszlanak el („tanulatlan állapot"). A parallel szálakon egy megadott A_1 ábra villan fel többször egymás után. Ennek hatására az összes P neuron gerjesztettsége növekedni kezd. A gerjesztettség abban a neuronban — jelöljük ezt $P^{(1)}$-gyel — növekszik a leggyorsabban. amelyiknek szinaptikus erősségeloszlásával képzett $\Sigma c_k a_k$ gerjesztési összeg a legnagyobb. Ez a P neuron éri el először a küszöb gerjesztést, amikor is tüzelni fog. A tanulási mechanizmus révén ennek a P neuronnak azok a szinapszisai fognak erősödni, amelyeken inger érkezett. Ennek a neuronnak a $\Sigma c_k a_k$ gerjesztési összege megnövekszik az A_1 ábrára. Így a $P^{(1)}$ neuron egyre érzékenyebb lesz az A_1 ábrára. Eközben $P^{(1)}$ többi, impulzust nem közvetített szinapszisai gyengülnek, így $P^{(1)}$ egyre kevésbé lesz érzékeny a másfajta ábrákra. Ha a P neuronok nem volnának kölcsönös gátló kapcsolatban, akkor ugyanez a folyamat a többi neuront is érzékenyítené az A_1 ábrára. Azonban a kölcsönös gátlás révén a $P^{(1)}$ neuron, amikor elérte a küszöb szintre való gerjesztettséget, a többi $P^{(i)}$ neuronra gátló impulzust ad, és ezzel csökkenti azok gerjesztettségét. Így a többi $P^{(i)}$ neuronnak egyre hosszabb és hosszabb időre lesz szüksége ahhoz, hogy az A_1 ábrára tüzeljen, és végül az A_1 ábrára már egyáltalán nem fognak tüzelni, érzéketlenné válnak A_1-re.

Ugyanez a tanulási folyamat a különböző $P^{(i)}$ neuronokat különböző A_i ábrákra teszi érzékennyé.

A fentieket összegezve a következőket állapíthatjuk meg. Egy neuron hálózatban, amelyben a szinaptikus kapcsolatok kezdetben véletlenszerűen, csak statisztikus törvények által meghatározottan voltak eloszolva, a különböző P neuronok a párhuzamos szálakon át érkező különböző ábrákra szelektív érzékenységet fejlesztenek ki. Ez a fejlődés a kölcsönös gátlás és egy egyszerű, minden neuronra érvényes tanulási mechanizmus következményeként jön létre.

4. Egyszerűsített modell, matematikai analízis

A neuron hálózat kvalitatív analízise plauzibilis eredményre vezetett. Ennek megerősítésére és a hálózat önszervező tulajdonságának mélyebb megértésére kvantitatív analízist írunk le a következőkben. Egy nagy számú neuronból álló rendszer részletes vizsgálata, ahol minden neuronnak több tízezer szinapszisa van meghaladja a ma ismert matematikai módszerek teljesítőképességét. A következőkben két, egymással kölcsönös gátló kapcsolatban álló P neuront fogunk vizsgálni (2. ábra). Mindegyik P neuron sok szinapszissal kapcsolódik a párhuzamos szálakhoz. A $\Sigma c_k a_k$ összeg kiszámításához azonban egy további egyszerűsítést is bevezetünk: a rendszernek két orthogonális ábrára vonatkozó adaptív tulajdonságát vizsgáljuk. (Két ábrát orthogonálisnak nevezünk, ha az ábravektoruk skaláris szorzata nulla.)



2. ábra. Az egymást kölcsönösen gátló két P neuron rendszer vázlatos képe

Legyen a kiválasztott két P neuron egymás mellett, így a parallel szálaknak ugyanarról a területéről kapják mindketten a gerjesztést. Osszuk fel a két P neuron „látóterén" (perceptív területén) átmenő párhuzamos szálakat két egyenlő, diszjunkt halmazra. Jelöljük e két halmazt G_x és G_y-nal. Mindegyik n szálat tartalmaz. Egy általános információ során a G_x halmazból n_x, a G_y halmazból n_y lesz aktív. Ezek átlagos gerjesztő hatását a két P neuronra megkapjuk, ha a gerjesztési összeget két részre bontjuk.

$$\sum_k c_k^{(i)}(t)a_k(t) = \sum_{k\in G_x} c_k^{(i)}(t)a_k(t) + \sum_{k\in G_y} c_k^{(i)}(t)a_k(t),\ i = 1, 2. \tag{11}$$

Itt a két összegezés a G_x, illetve a G_y halmazhoz tartozó párhuzamos szálakra való összegezést jelöli. Definiáljuk az egyes halmazokban az átlagos szinaptikus erősséget a következő módon:

$$\begin{aligned} c_x^{(i)}(t) &\equiv \frac{1}{n}\sum_{k\in G_x} c_k^{(i)}(t), \\ c_y^{(i)}(t) &\equiv \frac{1}{n}\sum_{k\in G_y} c_k^{(i)}(t), \\ i &= 1, 2. \end{aligned} \tag{12}$$

Ha a szinaptikus erősségeket ezen átlagokkal közelítjük, a gerjesztési tag nagyban egyszerűsödik:

$$\begin{aligned} \sum_k c_k^{(i)}(t)a_k(t) &= \sum_{k\in G_x} c_k^{(i)}(t)a_k(t) + \sum_{k\in G_y} c_k^{(i)}(t)a_k(t) \approx \\ &\approx c_x^{(i)}(t)\sum_{k\in G_x} a_k(t) + c_y^{(i)}(t)\sum_{k\in G_y} a_k(t) = \\ &= c_x^{(i)}(t)\, n_x(t) + c_y^{(i)}(t) n_y(t) \\ &= n\, c_x^{(i)}(t)\frac{n_x(t)}{n} + n\, c_y^{(i)}(t)\frac{n_y(t)}{n}. \end{aligned} \tag{13}$$

Definiáljuk továbbá az effektív érzékenységi vektort, $D^{(i)} = (D_x^{(i)}, D_y^{(i)})$, és az effektív ábra vektort, $B = (B_x, B_y)$, a következő kifejezésekkel:

$$D_x^{(i)}(t) \equiv \frac{1}{s^{(i)}} n\, c_x^{(i)}(t), \qquad D_y^{(i)}(t) \equiv \frac{1}{s^{(i)}} n\, c_y^{(i)}(t) \tag{14}$$

és

$$B_x(t) \equiv \frac{n_x(t)}{n}, \qquad B_y(t) \equiv \frac{n_y(t)}{n}. \tag{15}$$

Ezekkel a definíciókkal a gerjesztési tagot így írhatjuk:

$$\frac{1}{s^{(i)}} \sum_k c_k^{(i)}(t) a_k(t) \approx B_x(t) D_x^{(i)}(t) + B_y(t) D_y^{(i)}(t). \tag{16}$$

A normálási feltétel most a

$$D_x^{(i)}(t) + D_y^{(i)}(t) = \eta^{(i)} \tag{17}$$

alakot ölti.

Abból a célból, hogy az eredményeket jól lehessen szemléltetni, a $D^{(i)}(t)$ és $B(t)$ vektorokat polár koordinátákkal fogjuk megadni:

$$D_x^{(i)}(t) = d(t) \cos \varphi^{(i)}(t), \qquad D_y^{(i)}(t) = d(t) \sin \varphi^{(i)}(t), \tag{18}$$

$$B_x(t) = \beta(t) \cos \psi(t), \qquad B_y(t) = \beta(t) \sin \psi(t). \tag{19}$$

Mivel a normálási feltétel egy összefüggést ír elő $D_x^{(i)}$ és $D_y^{(i)}$ között, a $\varphi^{(i)}$ érzékenységi szög teljesen megadja a $P^{(i)}$ neuron érzékenységi állapotát.

Összegezzük az eddigieket. A modell hálózatunk két P neuronból áll, melyek egymást kölcsönösen gátolják. A P neuronokat a 14. egyenletben megadott érzékenységi vektorokkal jellemezzük. A párhuzamos szálakon érkező gerjesztést a 15. egyenlettel definiált két komponensű effektív ábra vektorral adjuk meg. A teljes redukált hálózatot a 3. ábra mutatja. E hálózat működését leíró neuron egyenletek, melyeket a 16. egyenletnek a 7. egyenletbe való helyettesítésével kapunk, a következők:

$$\begin{aligned}
u^{(1)}(t+\tau) &= [(1-\lambda)u^{(1)}(t) + D_x^{(1)}(t)B_x(t) + \\
&+ D_y^{(1)}(t)B_y(t) - g_2^{(1)}w^{(2)}(t)]\big(1 - w^{(1)}(t)\big), \\
u^{(2)}(t+\tau) &= [(1-\lambda)u^{(2)}(t) + D_x^{(2)}(t)B_x(t) \\
&+ D_y^{(2)}(t)B_y(t) - g_1^{(2)}w^{(1)}(t)]\big(1 - w^{(2)}(t)\big), \\
w^{(i)}(t) &= \begin{cases} 1, & \text{ha } u^{(i)}(t) \geq 1, \\ 0, & \text{ha } u^{(i)}(t) < 1, \end{cases} \\
i &= 1, 2.
\end{aligned} \tag{20}$$

A modell memória egyenletét úgy kapjuk meg, hogy a 8. egyenletet összegezzük $k \in G_x$-re és $k \in G_y$-ra, majd elosztjuk a kapott egyenleteket $s^{(i)}$-vel:

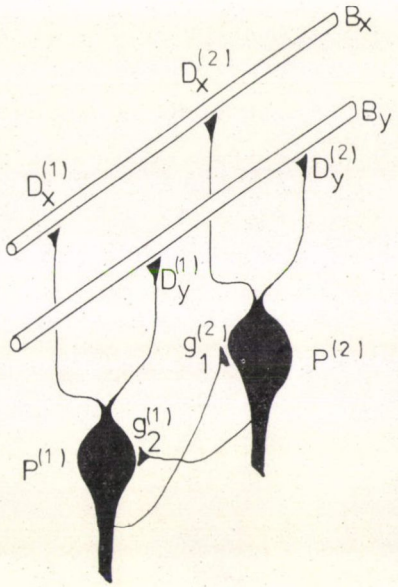
$$\begin{aligned}
D_l^{(1)}(t+\tau) &= q[(1-\varepsilon)D_l^{(1)}(t) + \gamma w^{(1)}(t)B_l(t-\tau)], \\
D_l^{(2)}(t+\tau) &= q[(1-\varepsilon)D_l^{(2)}(t) + \gamma w^{(2)}(t)B_l(t-\tau)],
\end{aligned} \tag{21}$$

ahol $l = x$ vagy y és

$$q = \eta/\Big(\sum_{l=x,y} [D_l^{(j)}(t)(1-\varepsilon) + \gamma w^{(j)}(t) B_l(t-\tau)]\Big),$$

$$\gamma = n\varkappa/s^{(j)},$$

$$j = 1, 2.$$



3. ábra. A redukált modell képe. $D_x^{(j)}$ és $D_y^{(j)}$ az effektív szinapszis erősségek, $g_2^{(1)}$ és $g_1^{(2}$ a gátló szinapszisok erősségei, B_x és B_y a gerjesztő ábra komponensei

E modell hálózat viselkedésének tanulmányozására számológép programot készítettünk. 120 különböző bemenő ábrát alkalmaztunk. A β ábra erősségének a $\beta = 0{,}2$, 0,3 és 0,4 értékeket adtuk. A ψ ábra szögeknek 40 különböző értéket adtunk a [0, 90°] intervallumban. Az így nyert 120 ábrát véletlen sorrendbe állítottuk. Egy-egy ábrát 100-szor kapcsoltunk rá a hálózat bemenetelére mielőtt áttértünk a következő ábrának a bekapcsolására.

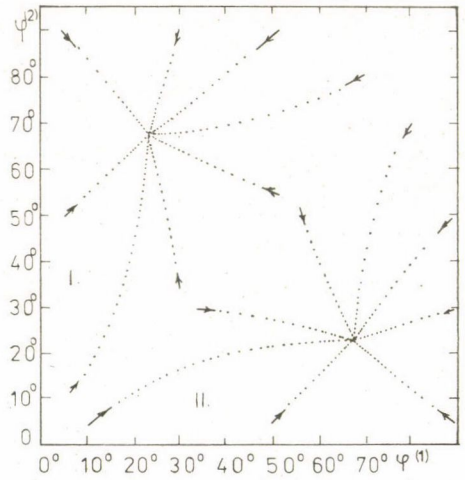
A $\varphi^{(1)}(t)$ és $\varphi^{(2)}(t)$ érzékenységi szög változását minden ábra „felvillantása" után meghatároztuk. A $(\varphi^{(1)}(t), \varphi^{(2)}(t))$ számpárost minden 12 000 ábra felvillantása után kinyomtattuk. Egy-egy ilyen számpárost egy-egy pont jelöl a 4. ábrán. Egy ilyen kinyomtatás után a számítás tovább folytatódott.

Mivel az érzékenységi vektorok normáltak, a két P neuronból álló rendszer érzékenységét teljesen leírja a két, $\varphi^{(1)}(t)$ és $\varphi^{(2)}(t)$ érzékenységi szög. Így egy pont a $(\varphi^{(1)}, \varphi^{(2)})$ „érzékenységi fázis síkon" (4. ábra) teljesen megadja a modell érzékenységi állapotát, és az út amelyen ez a pont halad, az érzékeny-

ségnek a tanulás folyamán létrejövő változását adja meg. A 4. ábrán az útra rajzolt nyíl a fejlődés irányát mutatja. Két szomszédos pont közt eltelt idő mindig azonos, éspedig a 12 000 ábra „felvillantásának" megfelelő idő. A különböző utak különböző kezdő érzékenységnek felelnek meg. A paramétereknek az értéke e számítás során a következő volt:

$$\lambda = 0{,}1\,, \qquad g_2^{(1)} = g_1^{(2)} = 0{,}8\,,$$

$$\eta = 0{,}6\,, \qquad \varepsilon = 1 \cdot 10^{-2}\,, \qquad \gamma = 3 \cdot 10^{-4}.$$



4. ábra. A rendszer fejlődése az érzékenységi fázis síkon. A $\varphi^{(1)}$ és $\varphi^{(2)}$ érzékenységi szögeket megadó pont ezen a síkon a rendszer egy meghatározott érzékenységi állapotának felel meg. Két egymás melletti pont között 12 000 ábrával „ingereltük" a rendszert. A nyilak a fejlődés irányát mutatják. A rendszer fejlődési végpontjainak, a fix pontoknak a koordinátái $(\varphi^{(1)}\ \varphi^{(2)}) = (22.5°, 67.5°)$ és $(67.5°, 22.5°)$

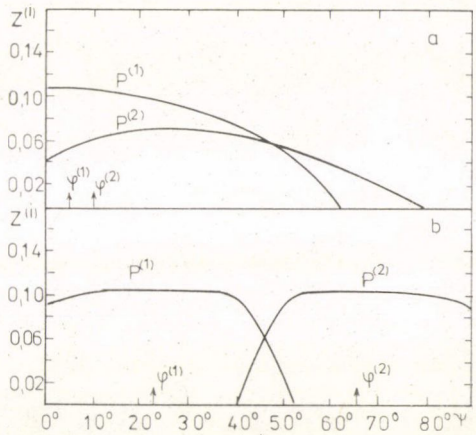
A rendszer szimmetrikus a két P neuronra vonatkozóan, és ezért a rendszer viselkedése a I. tartományban tükörképe a II. tartománybeli viselkedésének (4. ábra).

5. Összefoglalás

Az egyszerűsített modell numerikus analízise alátámasztja a hálózat kvalitatív analízise során nyert következtetéseket. A 4. ábra világosan mutatja, hogy a rendszernek fix pontjai vannak az „érzékenységi állapot fázis síkon". Ez azt jelenti, hogy a rendszer tetszőleges kezdeti állapotból mindig ugyanabba a „tanult állapotba" szervezi magát a véletlenszerű eloszlásban érkező ingerek hatására. Ebben a tanult állapotban a két-P-neuron rendszer felosztja az ábrateret két egyenlő részre, és az egyik P neuron csak az egyik

részhez, a másik neuron csak a másik részhez tartozó ábrákra lesz csak érzékeny. (Egy kis szakaszon, a két rész határán, mindkét neuron érzékelheti az ábrát.) (Lásd 5. ábra.)

A bemutatott matematikai analízisből beláttuk, hogy tetszőleges kezdeti szinapszis erősség eloszlással bíró P neuron esetén is a rendszer mindig ugyanabba a fix tanult állapotba szervezi magát. Ebben az állapotban diszkriminálni képes a beérkező gerjesztések között. A rendszernek ez az önszervező képessége a kölcsönös gátló kapcsolat és a neuron sejtre a 8. egyenletben megfogalmazott egyszerű tanulási elv következménye.



5. ábra. A $P^{(1)}$ és $P^{(2)}$ neuronok tüzelési valószínűségei a ψ ábraszög függvényében a tanulás előtt (a) és után (b)

Végezetül megjegyezzük, hogy a fentiekben leírt önszervező képesség akkor is létrejön, ha a kölcsönös gátlás interneuronokon keresztül valósul meg. Úgyszintén megjegyzendő, hogy ez az önszerveződés nem zárja ki a „tanító segítségével történő tanulást", azaz a P neuronnak a kúszó rost segítségével létrejövő tanulását. A két mechanizmus egymástól függetlenül vagy éppen egymással együttműködve is működhet.

IRODALOM

1. Caianiello, E. R.: Outline of a Theory of thought-processes and thinking machines. Journal of Theoretical Biology **1,** 204—235 (1961).
2. Csernai, L. P. és Zimányi, J.: Mathematical model for the self-organization of neural networks. Biological Cybernetics **34,** 43—48 (1979).
3. Hebb, D. O.: The organization of behaviour. Wiley, New York (1949).
4. Marr, D.: A theory of cerebellar cortex. Journal of Physiology (London) **202,** 437—470 (1968).
5. Szentágothai, J.: Proc. IEEE **56,** 960—968 (1968).
6. Zimányi, J. és Csernai, L.: Az idegrendszer matematikai modelljei. Fizikai Szemle XXVIII, 295—302 (1978).

A MESTERSÉGES ÉS TERMÉSZETES INTELLIGENCIA

VÁMOS TIBOR

MTA Számítástechnikai és Automatizálási Kutatóintézete, Budapest

A természetes és mesterséges intelligencia kapcsolata óhatatlanul eszünkbe juttatja Karinthy zseniális ötletét a férfi és nő viszonyáról: „kik hogyan érthetnék meg egymást? Hisz mind a kettő mást akar — a férfi a nőt, a nő a férfit." A számítógépek adta logikai lehetőségek első felcsillanásától, Turing és Neumann, McCullogh és Pitts munkásságával kezdődően izgalmas szellemi csábítás lett a párhuzamok keresése az emberi agy működése és a gépi problémamegoldás között. A számítástechnikusok egy része az agyi struktúrákban ideális képleteket keresett a gépek architektúrájának kialakításához, processzszálási módszereihez. Más részük azzal az igénnyel próbált fellépni, hogy a gépi problémamegoldásokat az emberi tevékenységgel azonos vagy azt túlhaladó szintre képzelje. A biológusok és pszichológusok azt remélték, hogy jól érthető modellre lelnek a gépi struktúrákban és ezen keresztül lényegesen közelebb kerülhetnek a magasabb rendű idegrendszeri tevékenység megértéséhez. A leegyszerűsített azonosítások heves ellenérzéseket is kiváltottak, amik egyes időszakokban és helyeken majdnem teológiai jellegű vitákra és ítéletekre vezettek. Úgy gondolom, hogy minden olyan szimplifikáció, amely nem bármelyik pillanatban eldobandó hipotézisként kezelhető, erősen tudománytalan. A számítástechnikusok, neurobiológusok és pszichológusok türelmes, előítéletmentes párbeszédére van szükség. A kölcsönös analógiák ezekben a munkákban eddig nem afelé vezettek, hogy egyértelmű megfeleltetéseket végezhetünk, és rendkívül messze vagyunk attól, hogy e három terület egymással való szerves összefüggéseit feltárjuk, akár a neurobiológusok mikrostrukturális tényeit a pszichológia makroeredményeivel hozhassuk kapcsolatba, akár az emberi információfeldolgozás lényeges processzáló eljárásait képesek legyünk formalizálni. Ugyanakkor a haladáshoz feltétlen szükséges fogalomalkotásban, így az információ és vezérlés elvi kérdéseinek tisztázásában, valamint a kísérleti technikában le nem kicsinyelhető közös eredmények születtek.

A következőkben néhány példát szeretnék ismertetni a jelenlegi helyzetről a mi tudományterületünk szemszögéből nézve, ezek között egy-két saját tapasztalatot is. A mi munkánk felől nézve az emberi agytevékenység legizgalmasabb területe a látás. Az emberi információbevitelnek ez az egyik legfontosabb formája és a neurológusok és pszichológusok egyaránt kedvelt kísérleti

célja. A mi feladatunk háromdimenziós tárgyak gépi felismerése, ennek eddigi leegyszerűsített menete a következő:

A gép a tárgy képén felületeket határoló éleket és összefüggő felületeket keres, megállapítja ezek főbb geometriai jellemzőit és egymáshoz való kapcsolatát. Ebből építi fel a tárgy hierarchiáját, amit a tárgyról alkotott előző ismeretanyaggal vet össze. Ez a hierarchia természetesen már az emberi absztrakció előmunkájából készül. Vico ezt zseniális felismeréssel a feje tetejére állítva vette észre: a dolgok csak Isten számára testek, az ember számára csak felületek. A roppant egyszerűnek tűnő gondolatmenet nehézségekkel terhes úton realizálódhat. Ezeknek a nehézségeknek két csomópontja van. Az egyik a zaj, tehát az a körülmény, hogy a beérkezett információ nem pontos. A másik bajunk az, hogy a tárgyaknak a nézőponthoz és egymáshoz viszonyított helyzete rendkívül sokféle lehet, így a tárgyak mindig másképp látszódnak, más-más részleteik takartak. Az *indefinitség* és a *komplexitás* valósága tehát az egyszerű gondolkodás és eljárások fő ellensége. Számunkra is megdöbbentő volt, hogy a televíziós képcsövön látott, tehát már kétdimenziós tárgykép, amit az emberi agy — bármilyen elmosódott is — könnyen fel tud ismerni, mennyire megfoghatatlan nehézséget okozott a gépi feldolgozásnak, mennyire kevés információt tudott szolgáltatni annak eldöntésére, hogy mit látunk. Így számunkra jól érezhető volt az a látáspszichológusok által közismert tény, hogy az emberi képfeldolgozás minden egyes fázisa szorosan kapcsolódik a már tárolt emberi ismeretanyag segítségéhez. Csak így érthető meg, hogy agyunk viszonylag szegényes információ alapján is gyors és határozott döntést hozhat. Ez a rendkívül nagy, tanult tudásanyag, ami a percepció minden fázisát vezérli és ami a gépi megoldások számára ma még bizonyosan elérhetetlen. Jellegzetes példa az a feltevés, hogy az optikai csalódások nagy részét a két dimenzióban látott elemek képzeletbeli háromdimenziós interpretációja hozza létre. Az agy a maga feldolgozó munkájában nehezen tud az előítéletektől megszabadulni, amely előítéletek egyébként legfőbb támaszai a megértésnek. Hasonló mechanizmusok működnek az általam említett másik akadélynál. Kellő előismeret nélkül a gép kénytelen az összes lehetséges variánst végigdolgozni, tehát az előfeldolgozás alapján kapott körvonalképet és felületkonstrukciót minden lehetséges tárgy minden lehetséges kombinációjával, nézetével összehasonlítani. Heurisztikát, azaz kihagyásos, gyors kereső módszert akkor alkalmazhatunk, ha előzetes ismeretanyagra támaszkodhatunk, hipotéziseket készíthetünk. Vonható tehát bizonyos analógia a több szintes, vezérelt információbevitel — tárolás — feldolgozás gépi és emberi folyamatai között. Kezdettől világos, hogy az emberi agy működése sokkal párhuzamosabb jellegű, mint az eddig konstruált számítógépek, e párhuzamosság megközelítésére azonban csak vérszegény modelljeink vannak (holográfikus modell, sejtautomaták stb.), pedig ezek a neuriális párhuzamos processzorok teszik lehetővé az igazi lényegkiemelő információszűrést. Maga a processzor — memória analógia sem szimpli-

fikálható. Úgy tűnik, hogy a biológiában lényeges a *procedurális tudás*, amelynek pontos fiziológiai mechanizmusa szintén nem világos. Kísérletsorozatot végeztek egy-egy bonyolultabb térbeli alakzat különböző szöggel való elforgatásával és mérték, hogy a megfigyelő mennyi idő alatt ismeri fel az azonosságot. A tapasztalat az elforgatás mértékével nagyjából arányos időt mutatott, ami arra utal, hogy az agy a forgatást „lejátssza", nemcsak a képek, hanem eljárások is rögződnek. A vizuális cortex háromdimenziós elrendezésének, tehát a háromdimenziós képeknek az agyban is valahogyan térbeli reprezentációja következményei sem világosak még. Sejtjük, hogy az agy a tárgyak formáit azok mozgásképeiből is következteti, a háromdimenziós kép mintegy merev testként mozog az agyi reprezentációban az emberi felismerés folyamán. A más élőlényeken végzett látásvizsgálat mind arra utal, hogy a processzálásoknak és reprezentációknak az emberi magatartástól sokszor erősen különböző formáit fejlesztették ki, amelyek az ő életműködésükben fontosak. Ez a filogenetikai fejlődés változataival szemben talán nagyobb sokoldalúság arra utalhat, hogy az agytevékenység természeti rögzítettsége a legkisebb, azaz ami ennek sokkal pozitívabb duálja: a legmagasabbrendű idegitevékenység biztosítja a fajta és az egyén számára a legtöbb szabadságfokot. Nem véletlen, hogy a mesterséges intelligencia is valamerre e szabadság felé halad: a software és hardware szabad kombinációja, nem determinisztikus belső programvezérlések, az információk és eljárások kölcsönös felcserélhetősége, az egyes eljárások egymást nem hierarchikusan is módosító kölcsönhatásai. Az egyes bonyolult eljárások kapcsolói, váltói önmagukban is bonyolult eljárások. A modellben az nem világos, hogy az automatikussá vált és a még nem automatikus, de azonos feladatú eljárások funkcionálisan mennyire válnak szét.

Még egy példázat az emberi látásról, amit egyik kiváló keramikusunktól, Gádor Istvántól hallottam: az embereket a képzőművészek tanítják látni; a XVIII. és a XIX. század elejének sötét, zöld-barna tónusai az akkori látásvilágot tükrözték, az impresszionizmus tanított a szabad levegő élénk színeire, mai környezetünk szép, színes világa, az erre feltámasztott érzékünk és igényünk a század első felének képzőművészeti és ipari forradalmának együttes eredménye.

A kontextus alapján történő feldolgozásnak másik két szép példája a beszéd-felismerés és a sakk-probléma. A beszéd-felismerés az a terület, ahol a mesterséges intelligencia kutatók talán legnehezebben jutnak előre, 15—20 évvel ezelőtt elért néhány 10 szavas szótár felismerését még a legnagyobb és leggyorsabb gépekkel is alig tudták a 100-as határ fölé emelni. A nehézség világos számunkra akkor, ha meggondoljuk, milyen feladatot adnánk egy gyorsírónak, ha számára ismeretlen nyelven közvetített telefonüzenetet kellene feljegyeznie. Megint a feldolgozás és felismerés összehangolódott és szét nem választható mechanizmusával állunk szemben. A sakk-probléma triviálisnak tűnne ezekhez viszonyítva, hiszen jól formalizálható. A mai gépi megoldások

azonban nem annyira az egyszerű logikai lépésekből leszármaztatható stratégiák felé mutatnak, hanem igyekeznek emberi stratégiákat tanulmányozni és azokat átvinni gépi formalizmusba. Megjegyzem, hogy roppant koncentrált és nagy háttérrel megvalósított eredmények a körülbelül 2000—2100 pont köré hozták fel a legjobb gépi programokat, tehát legfeljebb egy gyenge mesterjelölt szintjére.

A múlt évben — némileg provokáló szándékkal — publikáltak egy fényképfelvételt, amely megmutatja, hogy a legkorszerűbb áramköri rajzolatkészítő technikával körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb lineáris sűrűséget lehet elérni, mint amit a neuronális alakzatok mutatnak, ami a gépi megoldások optimistáinak egyszerű extrapolációjával három dimenzióban három nagyságrendet jelent. Teljesen világos, hogy az agyi komplexitás mélyebb szinteken van, részben ott, hogy a neuron nem egyszerű logikai elem, hanem önmaga is egy bonyolult, adaptív és tanuló processzor, a neuronális kapcsolatok pedig szintén mutatnak adaptív és tanuló tulajdonságokat. A gépi percepció lassú, de kétségtelen előrehaladása naponta szolgál számunkra újabb bizonyítékokkal ahhoz a tulajdonképpen jól érzett tényhez, hogy az emberi percepció útjait, lehetőségeit és korlátait még nagyjából sem ismerjük. Ez az oka annak, hogy minden korábbi tudományos optimizmussal szemben ma is a mélyen szubjektív a racionálisabb, azaz az emberi agy által végzett szubjektív feldolgozások, ítéletek, felismerések — egyes jól számítható esetek kivételével — sokkal megbízhatóbban összegezik a jelenségeket, mint absztrakt sémáink leegyszerűsítő és az általunk nem ismert részleteket elhagyó, voluntarista vagy tudattalan, vélt racionalizmusa.

Mi a tanulság mindebből? A műszaki gyakorlatban az antropomorf és az antropomorftól magukat elhatároló gondolkodásmódok kezdettől fogva küzdöttek. Ebben sem szabad semmiféle előítéletet táplálnunk. Nincs bizonyítva az sem, hogy a gépi megoldások optimális vagy lehetséges útja emberi analógiákra épülhet-e, és fordítva, hogy milyen mértékig modellezhető vagy nem modellezhető az emberi agy gépi eszközökkel. Jóslásokba sem szabad bocsátkoznunk, mert nem ismerjük sem a határokat, sem a lehetőségeket. A legfontosabb tanulság tehát az előítélet-mentes további kutatás. Az világos, hogy a jelenleg ismert technikai eszközökkel az emberi agytevékenység számos funkciója nem közelíthető meg. Másfelől azt is látjuk, hogy nagyon sok emberi, szellemi munkával végzett tevékenység géppel máris jobban végezhető. Az ember és gép, a műszaki-matematikai, a neurobiológiai és pszichológiai módszerek szimbiózisa tehát tartós lesz, a szintézisek pedig legjobb esetben hasznos közbenső lépcsőfokai a haladásnak.

TÁVLATI LEHETŐSÉGEK

TIGYI JÓZSEF

POTE Biofizikai Intézet, Pécs

Mindenekelőtt a magyar biofizikusok nevében szeretném nagy örömömet kifejezni afelett, hogy hazai fizikus kollégák legjobbjai ilyen élénk és aktív érdeklődésüket fejezték ki a biofizika iránt — ülésszakunk keretében — és készek igen értékes fizikai metodológiai fegyvertárukat biológiai kérdések megoldására felsorakoztatni. Különösen örvendetes ez a tény akkor, ha látjuk azt a nagy kontrasztot is, amelyet a mostani helyzet az ötvenes évek elejéhez viszonyítva jelent, hiszen — az ittlévő generáció még élénken emlékezhet rá — akkor arról kellett vitatkoznunk az akadémián belül is, hogy egyáltalán önálló tudomány-e a biofizika.

Igaz, hogy az elmúlt 2—3 évtized alatt a biofizika világszerte ugrásszerű fejlődésnek, sőt — nem költői túlzás ha azt mondom — virágzásnak indult. Jellemző példának csak azt a tényt ragadom ki, hogy az 1960-tól 70-ig tartó évtizedben 6 kutató, ill. kollektíva kapott biofizikai kutatási eredményért Nobel-díjat, továbbá ezen periódus alatt szaporodott fel a biofizikus kutatók száma a pár százról több mint 10 000-re.

Talán nem szerénytelenség megjegyezni, hogy a hazai biofizikai kutatás magvát alkotó kevés számú kutató, Ernst Jenő vezetésével időben és helyesen ismerte fel a biofizika fontosságát és számos fejlett országot megelőzve erőteljesen harcolt a hazai biofizikai kutatás lehetőségeinek megteremtéséért.

A Tisztelt Szervező Bizottságtól azt a feladatot kaptam, hogy a biofizika távlati lehetőségeiről szóljak. Ez a feladat egyrészről nagyon könnyű, hiszen nincs a fizika és technika fejlődésének egyetlen ága a magfizikától a szilárdtest fizikáig, sőt kozmológiáig, mely előbb-utóbb ne eredményezhetne jelentős biológiai felfedezést, másrészt nagyon nehéz a feladatom, mert ilyen rövid idő alatt ha teljességre kívánnék törekedni, csak címszavak felsorolását kellene tennem egész előadásom során.

Feladatomat úgy próbálom megoldani, hogy nem futurológiai távlati lehetőségekből, hanem a századfordulóig felhasználható már csíráiban valahol megindult fejlődési irányokról kívánok egy csokrot kötve bemutatni, vállalva a válogatással járó szubjektivitás ódiumát is.

Legyen szabad felhívnom a figyelmet arra az örvendetes tényre, hogy jelenleg a fizika lehetőségei és a jól megfogalmazott, megoldandó biológiai

problémák számarányát illetően jelentős fordulatnak vagyunk szerencsés szereplői, hogy — biológus szemmel nézve — a bőség zavarával küzdünk. Az 1900-as évek első éveiben az Ergebnisse der Physiology évente két kötetben jelent meg, Biophysika, ill. Biochemia és Physiologia. Azidőtájt a fizika még kevés olyan ismerettel, ill. módszerrel tudott a bonyolult élő rendszerekhez nyúlni, amely eredményre vezethetett volna, ennek következtében pár évi próbálkozás után a biophysika sorozat el is halt, hiszen az akkor felfutó kémiai lehetőségekkel nem versenyezhetett. Századunk fizikájának ragyogó eredményei ma már mondhatom, hogy elvileg kimeríthetetlen lehetőséget biztosítanak a biológusnak az alkalmazásra és az eredményes alkalmazás a legtöbb esetben attól függ, hogy sikerült-e a technikának a szóbanforgó fizikai elvet stabilisan és könnyen hozzáférhetően a biológiai mérésekre alkalmassá tenni.

A konkrét lehetőségeket az 1. ábrán látható 4 csoportban kívánom összefoglalni: 1. magfizikai módszerek, 2. spektroszkópiai módszerek, 3. szilárdtestfizikai módszerek, 4. computer-mikroelektronika.

ad 1. Magfizikai módszereket az alábbi csoportosításban kívánom tárgyalni:

1. Magfizikai módszerek

a) magsugárzások felhasználása
b) részecskegyorsítók sugárzása
c) Mössbauer-effektus.

a) A természetes és mesterséges izotópok sugárzásának felhasználása — bár nem új — de még számos új ötletes felhasználási lehetőséggel bír a biológiai alapkutatás számára, de különösen az alkalmazásban az orvostudomány és a mezőgazdaságtudomány számára. A fejlődés elsősorban a rövid felezési idejű és kis energiájú izotópsugárzásnak az elektronika fejlett módszerei révén hozzáférhető diagnosztikai fejlesztése tartogat még jelentős lehetőségeket. Az élő sejtbe inkorporált izotópok sugárzásának scintilláció révén az életfunkciókban való követése perspektivikus új nyomozó eljárásnak látszik, de a klasszikus Elmi radioautográfia is tartogat még kihasználatlan lehetőségeket a sejtekvírusok és makromolekulákban való lokalizációs feladatok megoldásában (1. ábra).

b) A részecskegyorsítók sugárzásának felhasználása már eddig is számos új eredményt hozott, de — mint azt Berényi Dénes részletesen ki fogja fejteni — még számos további lehetőség vár hasznosításra.

Itt konkrét feladatként szeretném megemlíteni az izomkontrakcióban szereplő fehérjék X-sugár spektrumának msec-os időfelbontással való követését. Nyugat-Európában és az Egyesült Államokban is jelentős erőfeszítések folynak ezirányban.

Igen érdekesnek ígérkezik a Hamburgi DESY W. UV, UV és látható fénysugárzásának a biomolekulák fluktuációs változásának követésére való felhasználása. Ez a gyorsító képes nanosecundumnál rövidebb (140 psec) igen nagy intenzitású impulzusokat adni — kb. μsec — gyakorisággal. Ma már kifejlesztették azt a szükséges elektronikát, melynek segítségével nagy időbeli felbontásban elemezhetjük a molekulák fluorescens sugárzását is, melynek segítségével a nanosecundum — μsec alatt lejátszódó molekuláris intramole-

1. ábra. A K atomok lokalizációja a harántcsíkolt izomban. Elektronmikroszkópos felvétel 10 000 nagyítás

kuláris rotációs stb. mozgásokat nyomon tudjuk követni. (Damjanovich kolléga remélhetőleg a közeljövőben részt tud venni e kísérletekben).

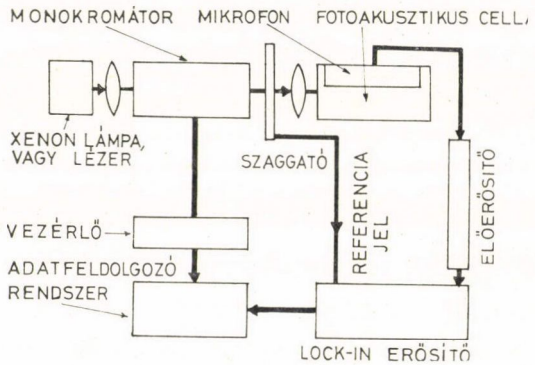
c) A gammasugár spektrometria a Mössbauer effektus tanulmányozása révén már számos fontos megismeréshez segítette a biológusokat is. Mivel a biológiai jelenségekben az anorganikus ionok szerepe egyre nagyobb jelentőségre tesz szert, különösen az enzimek anorganikus kulcsatomjainak kötésviszonyairól még sok új felvilágosítást adhat e módszer. A számbajövő legfontosabb ilyen atomok: Fe^{57}, Ni^{61}, Zn^{67}, Sn^{119}, J^{129}, Au^{197}, de a méréstechnika fejlődésével lehetőség adódhat más gammasugárzók alkalmazására is.

2. Spektroszkópiai módszerek

a) X-sugár mikroanalízis tulajdonképpen nem a jövő módszere, hiszen commerciálisan kaphatók elég jó X-ray mikroanalyzerek, melyek a karakterisztikus rtg. sugárzás segítségével identifikálják az atomokat az ELMI

metszetben mintegy 1 u^3 térfogatban, mintegy 10^{-16} g tömeg felbontóképességgel. A módszer folyamatosan fejlődik, biztosra vehető, hogy ez az elvileg és gyakorlatilag már kidolgozott metodika további javítása érzékenységének növelése révén rutinszerűvé válhat és a medicina, valamint a mezőgazdaságtudomány gyakorlati problémáinak hasznos segítője lehet.

b) A fluorescens spektroszkópia felhasználhatóságáról az előző pontban már szóltam és Damjanovich kolléga is szép példákat említett. E módszer alkalmazása tulajdonképpen összefügg az elektronika fejlődésével, hiszen ez teszi lehetővé a sejten belüli méretek egyre növekvő térbeli, ill. időbeli felbontását. A fluorescens fény polarizációs tulajdonságainak mérésével együtt még hosszú időn keresztül hasznos segítőnk lesz e módszer.



2. ábra. A fotoakusztikus spektrométer vázlata

c) Az egész spektroszkópiát forradalmasította a lézersugárzás befogása biológiai problémák megoldásába. A sugárzás homogenitása, koherenciája, igen nagy intenzitása különösen alkalmassá teszi alkalmazását a spektroszkópiában, de azon kívül is. A lézerspektroszkópia ma már új ága magának a spektroszkópiának is, lézer-Raman és lézer fluorescens spektroszkópia, spektropolarimetria beláthatatlan új lehetőségeket kínál. De a lézer — mint sugárforrás fotolízis, fotoszintézis, továbbá fotodinamiás effektusok vizsgálatában szintén új utakat nyit meg a biológus számára is.

Nagyon érdekes és — véleményem szerint — a biológia számára sok új lehetőséget tartogató módszer a fotoakusztikus spektrometria. E módszernek lényege, mint a 2. ábra mutatja, hogy az objektumot jól definiált fényimpulzusok érik és a fotoakusztikus cella falába épített akusztikus mikrofonok segítségével a fényimpulzus hatására bekövetkező nyomáshullámot (hangot) analizálhatjuk. A biológiai objektum struktúrájára, ill. struktúra változásaira, a hővezetési, hőtágulási, abszorpciós és egyéb adatokból vonhatunk le következtetéseket. Külön nagy előnye a módszernek, hogy teljesen natur körülmények között képes a vizsgálat elvégzésére.

Az alapkutatási problémák mellett a lézer praktikus alkalmazása is egyre terjed, a szemészetben teljesen megoldott a lézer-kauter alkalmazása, a fül-orr-gégészetben és idegsebészetben is már csak tökéletesítés néhány megoldatlan problémája hátráltatja a széles körben való elterjedését (CO_2-lézer).

d) A mikrohullámú spektrometria, elsősorban a EPR és NMR már évtizedek óta rendszeres segítőtársa a biológiai kutatásnak. Az eljárás lényege, hogy a molekula kinetikai energiájával kisebb energiák abszorpcióját úgy tudjuk vizsgálni, hogy a paramágneses molekulákat, ill. atommagokat proton, C^{13}, P^{31} mágneses térrel — mintegy — fixáljuk. Kötetszámot tölt meg ma más e fontos módszer alkalmazásával nyert biológiai eredmények leírása, mégis a jövő lehetőségei közé is sorolom, mert még számos kiaknázatlan lehetőség rejlik benne. Úgy gondolom, hogy a farmakológiai és mezőgazdasági kutatásnak bátrabban kellene e módszer fejlesztésével törődnie. Csak kiragadom a spin-label módszert, mely a stabil szabadgyök (főleg nitroxid) megfelelő biológiai molekulához való kötődése révén lehetővé teszik a kérdéses molekula elhelyezkedésének, mozgásának, rotációjának, fluktuációjának tanulmányozását. Talán nem mindenki tudja a tisztelt jelenlévők közül, hogy a POTE-n Hideg Kálmán szintetikus kémiai csoportja mai napig már több mint 400 ilyen spin-label molekulát készített el, melyet a REANAL ma már számos nyugati és szocialista országba exportál.

3. Szilárdtestfizikai módszerek

Kissé könnyebb a helyzetem e fejezet tárgyalásánál, mert néhány évvel ezelőtt e területet már áttekintettem és publikáltam is. A kérdés lényege, hogy a legtöbb biológiai anyag, struktúrájának szabályos elrendezettsége miatt kvázi-kristályos anyagként fogható fel, ugyanez áll a legtöbb biológiailag fontos makromolekulára is, ilymódon a szilárdtestfizika módszereit alkalmazva számos új ismerethez jutottunk, ill. juthatunk a jövőben is. A legfontosabb módszercsoportok az alábbiak:

a) Mágneses tulajdonságok mérése — lényegében teljesen feltáratlan terület, de az előzőekben ismertetett paramágneses módszerek sejtetni engedik, hogy a biológiai anyagról szóló ismereteknek milyen feltáratlan őserdeje kínálkozik felkutatásra ezen irányzat révén. A szilárdtestfizika fegyvertárából itt csak a neutrondiffrakciós módszerek alkalmazhatóságára hívom fel a figyelmet, mely a termikus sőt az ultrahideg neutronok segítségével számos váratlan információt adhatnak biológiai anyagokról is.

b) A biológiai anyag elektromos (félvezető) tulajdonságainak vizsgálata kimeríthetetlen új lehetőségeket ígér. Biológiai érdekessége miatt talán két speciális kérdést emelnék ki, a Gunn-effektus tanulmányozását, továbbá a Hall-effektus mérését.

A Gunn-effektus tanulmányozása elvileg lehetőséget ad az érzékszervi receptorok ún. generálpotenciál impulzus kódoló jelenségére, mely az érzékszervi működések alapvető problémáját oldaná meg.

A Hall-effektus mérése biológiai rendszerekben eddig nem volt megvalósítható, hiszen a biológiai kvázikristályos struktúra szigeteket egy ionvezető tenger veszi körül. Úgy látszik, hogy megfelelő elektronikai trükkökkel mégis megközelíthető a kérdés (lock-in erősítők), ami a biológiai rendszerben szereplő töltéshordozók kvalitatív és kvantitatív viszonyairól alapvetően fontos információt adna.

c) Fázisátalakulások mérése. Egy nagyon heterogén biológiai rendszerben, de pl. egy egyszerű membránban is nagyon fontos tudni, hogy milyen fázisok léteznek, s ezek milyen külső körülmények (pl. hőmérséklet, nyomás) alakulnak át. A szilárdtestfizika eredményesen alkalmazza a hiperultrahang (gigaherz) terjedésének, csillapodásának mérését, ilyen folyamatok mechanizmusának tanulmányozására. A klasszikus mikrokalorimetria is nagyon fontos módszer, az elektronika és a transzducerek érzékenységének növelésével a mikrokalorimetria továbbra is fontos eszköze marad a kutató biológusnak a konformációváltozások követésében.

d) Az elektronspektroszkópia együtt kisenergiájú elektrondiffrakció méréssel egyre érzékenyebb, stabilabb és könnyen használható módszerei a szilárdtest kutatásnak, jövő jelentőségük nyilvánvaló a biológiában is.

4. Komputer és mikroelektronika alkalmazása

Valójában ma már kevés olyan biológiai mérőmódszerünk van, mely elektronika és komputerizáció nélkül működne. A mérési érzékenység és az effektusnak a zajszintből való kiemelése a jövőben is egyre fokozódó jelentőségű lesz.

Legfontosabb alkalmazási területek az alábbiak:

a) Kvantumkémiai módszerek,

b) Kísérleti görbék analízise,

c) Komputer tomográfia,

d) Mikroprocesszorok alkalmazása.

a—b) A sorozat következő két előadása a „kvantumkémiai módszerek" és a számítógépes „kardiológiai módszerek" kiváló bizonyítását fogják adni a biológiai kutatás komputerizációja hasznosságának és nélkülözhetetlenségének. Kissé bővebben kívánom érinteni a komputer tomográfia és a mikroprocesszorok alkalmazásának kérdését.

c) A komputer tomográfia, azaz a rtg. rétegfelvételek komputerrel való összegezése és felerősítése ma már rutin orvosi módszer s remélhető, hogy pár

éven belül hazánkban is általánossá válik. Igen fontos és érdekes a biológiai kutatás számára a high voltage ELMI, amely kb. 10^6 V feszültségű elektronnal aránylag vastag metszetet tud „átvilágítani" és CT segítségével a sejtorganellumoknak azelőtt soha nem képzelt térbeli képét megadni. Remélhető, hogy a módszer költségei a technikai fejlődés révén elérhetővé teszik a hazai kutatás számára, ill. sikerül tovább tökéletesíteni, kétségtelenül új távlatok nyílnak a citológiai, vírus, fág, interferon stb. kutatásban.

d) Mikroprocesszorok alkalmazása. A mikroprocesszor (μP) a mikroelektronika fejlesztésének az utolsó évtizedben kifejlesztett elemei: igen kisméretű (integrált áramkör) tokban elhelyezett sokezer elemi áramkörből logikai áramkörrendszer, mely egy számítógép központi egységére jellemző feladatokat tud ellátni. Tulajdonképpen a modern technika egyik csúcsát jelentik, alkalmasak folyamatok irányítására, méréssorozatok elvégzésére és kiértékelésére. Az előrejelzések szerint nagyon gyorsan el fognak terjedni világszerte. Itt most azért említem a μP-ok alkalmazását, mert — az utóbbi időben — előtérbe került a tudományos munka hatékonyságának kérdése is. Bizony a legtöbb biológiai kísérletben munkánkat, méréseinket sokszor igen primitív, időt rabló, rossz hatásfokú módszerrel végezzük. A μP-ok alkalmazását előbb-utóbb meg kell tanulnunk, ezzel talán sikerülni fog a tudományos kutatómunka „termelékenységét" fokozni.

Mint előadásom elején említettem, a fizika és a fizikai elvek technikai megvalósulásának hatalmas eredményei révén valóban a bőség zavarával küzdünk. Tulajdonképpen az anyagi és technikai lehetőségeink szabják meg, hogy a fizika eredményeiből mit, mikor és mennyit alkalmazzunk a biológiai kutatásban.

Sajnálatos, de tudomásul kell vennünk, hogy a nagy költségigényesség miatt egyre gyakrabban az a helyzet adódik, hogy a meglévő fizikai metodikához keresnek a kutatók biológiai témát és nem a biológiai probléma megoldásához választhatják meg a metodikát. Nyilvánvaló, hogy a diszciplínák közötti hazai és nemzetközi együttműködési lehetőségek kihasználásának jelentősége a jövőben emiatt is fokozatosan növekedni fog.

Amikor ismét elismeréssel szólok a hazai fizikus kollégák biológia felé való fordulásáról, legyen szabad kihangsúlyoznom, hogy ez a törekvés nemcsak a biológusoknak jelent nagy előnyt és fejlődési lehetőséget, mert mint számos példa mutatja, nem egyszer a bonyolult biológiai rendszerrel való birkózás segítette elő, illetve kényszerítette ki a fizikai metodika további fejlődését, esetleg új fizikai felismerés megszületését. A biológiai elveknek fizikában, technikában való alkalmazása a bionika tudománya is ilyen kollaborációból született meg.

A távlati lehetőségek gyakorlati oldaláról beszélve talán e helyen is szükséges lenne felhívni a figyelmet a hazai bionikai kutatás elmaradottságára. Meg vagyok győződve, hogy hazánkban megvan minden szükséges szellemi

kapacitás hasznos bionikai kutatás kialakítására, talán csak az aktivációs energia hiányzik, melyet a Magyar Tudományos Akadémiának kellene megadni, hogy az elszigetelten tevékenykedő ilyen irányú szakembereket kritikus tömeggé összeszervezze.

Meg vagyok győződve, hogy a Fizikai-, Orvosi- és Biológiai Osztályok által szervezett jelen előadássorozat nagy lendítőerőt fog adni ezen a téren is.

ELEKTRONSPEKTROSZKÓPIA: ÚJ LEHETŐSÉGEK A BIOLÓGIAI—ORVOSI PROBLÉMÁK KUTATÁSÁRA

BERÉNYI DÉNES

MTA Atommagkutató Intézet, Debrecen

I. Új fizikai módszerek biológiai és orvosi alkalmazásairól beszélve úgy gondolom, azzal kell kezdenem, hogy a Szalay-iskola és intézetünk, az ATOMKI végső soron orvosi-fizikai intézetből nőtt ki. A Debreceni Egyetem Orvosi Karának Fizikai Intézetében kezdte el Szalay Sándor a 30-as évek második felében hazánkban a magfizikai kísérleteket és ugyancsak ő végzett munkatársaival együtt Magyarországon először radioaktív nyomjelzőkkel orvos-biológiai kutatásokat.

Ezt a hagyományt a mai napig folytatjuk intézetünkben. Hadd utaljak itt néhány, a közelmúltban elért eredményre, illetve folyamatban lévő munkára:

— In vivo kísérletek *testnedvekben oldott gázok* kutatására kvadrupól tömegspektrométerrel.

— *Műtőlevegő narkotikum tartalmának* vizsgálata ugyancsak kvadrupól-tömegspektrométerrel.

— Légzésvizsgáló berendezés prototípusának kidolgozása a kilégzett levegő összetételének és a *légzésfunkciónak* a vizsgálatára.

— A *szervezet ólom terhelésének* meghatározása a szőrzet ólomkoncentrációjának mérése alapján röntgenfluoreszcencia analitikai módszerrel.

— A *haj Ca tartalma és a szívinfarktus* közötti összefüggés kiterjedt vizsgálata.

— Vizsgálatok a röntgenfluoreszcencia analitikai alkalmazására a *pajzsmirigy diagnosztikában.*

— Van de Graaff-gyorsítóval végzett *nyomanalitikai vizsgálatok szülészeti alkalmazása.*

Ez az a talaj és háttér, amelyben arról a módszerről, az elektronspektroszkópiáról szeretnék beszélni, amely az utóbbi hat-nyolc évben került kifejlesztésre intézetünkben, elsősorban VARGA, KÁDÁR és mások eredményes fejlesztő-kutató munkájának eredményeképpen.

II. Mindenekelőtt talán ismertessük az elektronspektroszkópia, pontosabban annak egyik legfontosabb válfaja a röntgen-gerjesztés fotoelektron-spektroszkópia (elterjedt rövidítéssel: ESCA vagy XPS, esetleg: ESCA-XPS)

elvét, illetve biológiai problémák szempontjából legfontosabb tulajdonságait és néhány jellemző biológiai alkalmazását.

Az elektronspektroszkópia különböző válfajai: az Auger-spektroszkópia (AES), az ultraibolya-gerjesztéses fotoelektron-spektroszkópia (UPS), az elektron energiaveszteséges spektroszkópia (ELS) stb. és köztük az ESCA-XPS is már többé-kevésbé jól ismertek a magyar tudományos társadalom széles körében, számos magyar nyelvű cikk, tanulmány is megjelent róluk [2, 3, 4 5, 6, 9, 13]. Egy alkalommal már egy akadémiai közgyűlés keretében a biológiai alkalmazásaikról is beszélt KESZTHELYI [14].

Az ESCA-XPS alkalmazása a fotoelektromos egyenleten alapszik

$$E_e = E_x - E_b ,$$

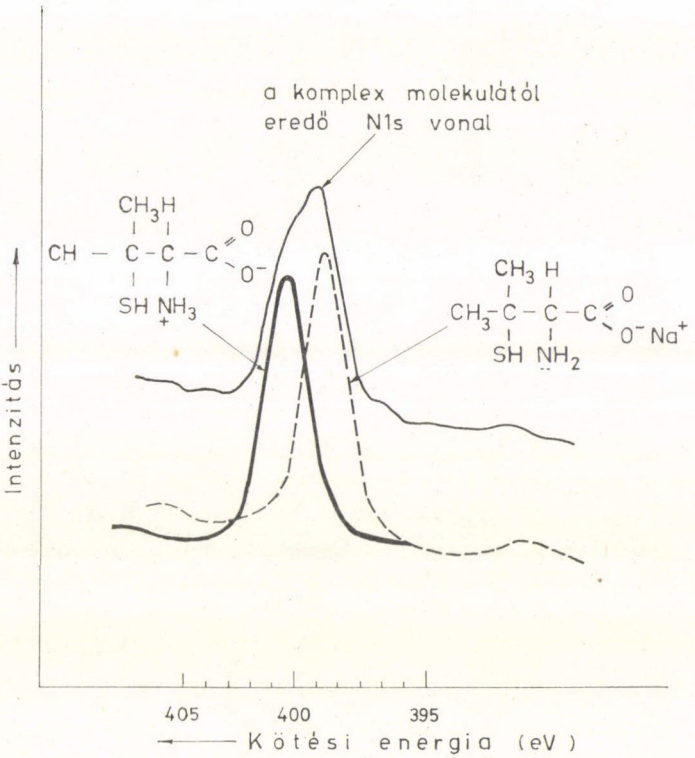
amely szerint a fotoelektron energiája (E_e) a besugárzó röntgen foton energiájától (E_x) és a kötési energiától (E_b) függ, azon az atomi héjon, ahonnan a fotoelektron kilépett. Ez a kötési energia viszont függ a szóban forgó atom molekuláris környezetétől, kötési állapotától, és így ez a fotoelektron energiájának eltolódásában tükröződik.

Az ESCA-XPS módszer legfontosabb tulajdonságait biológiai problémák kutatásában a következőkben foglalhatjuk össze:

— Felvilágosítást ad komplex molekulákban elhelyezkedő egyes kulcsszerepet betöltő atomok (hidak, központi fématomok stb.) vegyértékállapotára, elektronnegativitására, illetve egyáltalán kémiai szerkezeti beilleszkedésére, kötődési viszonyaira.
— Lehetőséget nyújt felületi vizsgálatokra, egészen monomolekuláris rétegekben néhány százaléknyi atom kémiai viselkedésének tisztázására (pl. biológiai membránok).
— Hasonló kémiai szerkezeti információt nyerhetünk mélységi eloszlásban, azaz a biológiai objektum felületéről néhányszor 10, 100 vagy 1000 Å távolságban ion-lebombázással, vagy anélkül.

A módszer számos egyéb jótulajdonsággal is rendelkezik. Így pl. $Z = 2$ felett minden elemre jó, beleértve a biológiailag fontos alacsony rendszámú elemeket (C, N, O stb.), általában roncsolásmentes (összehasonlítva pl. az Auger-spektroszkópiával) és kis minta-mennyiséget igényel ($\approx \mu g$). Igen szelektív (gyakorlatilag nincs interferencia a különböző elemek atomjaiból eredő spektrumvonalak között). Ugyanakkor a spektrum értelmezése lényegesen könnyebb, mint pl. az UV vagy az IR esetében. Mindenesetre biológiai szempontból hátrányos, hogy a mintákat nagy vákuum-térbe kell bevinni és bár bizonyos esetekben lehet folyékony anyagot is vizsgálni, általában a biológiai mintákat porított, lefagyasztott vagy adszorbeált formában kell preparálni.

Az elektronspektroszkópiai módszert általában is (beleértve az Auger-spektroszkópiát, az UV gerjesztésű fotoelektron spektroszkópiát stb.) és konkrétabban a röntgengerjesztésű fotoelektronspektroszkópiát (ESCA-XPS) egyre kiterjedtebben alkalmazzák biológiai jellegű problémák kutatása során (lásd [1, 7, 8, 11]). Így számos aminosav változatot, proteint vizsgáltak meg különböző kapcsolatokban, egyes gyököket helyettesítve.



1. ábra. Az Nls vonal Zn (penicillamin)$_2$ röntgen-gerjesztéses fotoelektron spektrumában [10]

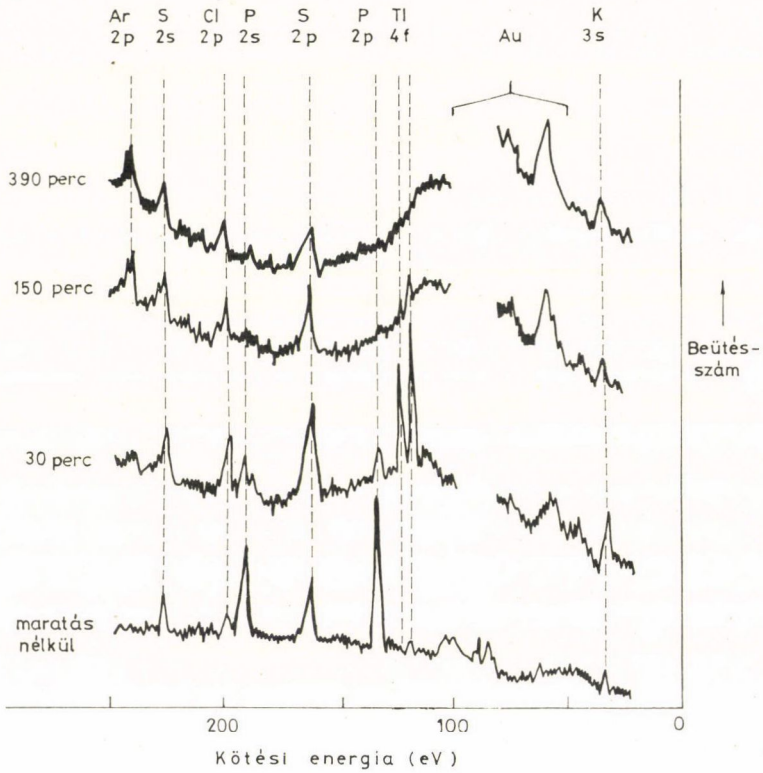
A nagyszámú vizsgálat közül a következőkben három példát mutatunk be az előzőekben kiemelt biológiailag legfontosabbnak ítélt tulajdonságnak megfelelően, illetve azok illusztrálására.

A Zn(penicillamin)$_2$ N(ls) fotoelektron vonalát, azaz a nitrogén atomok ls héjáról a Mg K_α röntgen sugárzás által kiváltott fotoelektronoknak megfelelő vonalat mutatja az 1. ábra.

A vonal összetett jellege bizonyítja, hogy a komplex molekulában a nitrogén atomok különböző kémiai környezetben fordulnak elő. A mélyebb analízis kiderítette, hogy az N atom a szóban forgó komplex molekulában két

különböző funkcióban szerepel: szabad amin és $HN^{+}H_2$, ún. zwitter-ion formációban.

Egy másik munkában azt a feltevést vizsgálták meg az XPS módszer felhasználásával, hogy emlős állatok sejtjei esetében a rosszindulatú sejttranszformációt a sejt felületén bekövetkező változások kísérik-e. Sikerült kimutatni, hogy ezen sejtek néhány nm-nyi felületi rétegében a transzformált



2. ábra. Különböző atomokhoz tartozó vonalak vörös vértestek felületétől számított különböző mélységekben felvett XP spektrumban. A mérések különböző rétegekre, meghatározott ideig tartó Ar-ion bombázás után történtek, ún. „ion-borotválás" után [16]

sejtek esetében kétségtelenül csökken az oxigén-nitrogén viszony (lásd az 1. táblázatot).

Vörös vértesteket (eritrociták) vékony film formájában arany hátlapra felvive és szukcesszive monorétegeket „leborotválva" róla argon-ion bombázással, a különböző rétegek összetételéről kaptunk információt. A 2. ábra mutatja, hogy egy bizonyos rétegben megjelennek a tallium atomok. Feltehetőleg a bizonyos membrán mélységnél jelentkező Tl-nak az ion-transzport jelenségnél van szerepe. Az utólagos mikroszkópos vizsgálat nem mutatta a sejt károsodását az Ar bombázás hatására.

1. táblázat

Oxigén atomok nitrogénhez viszonyított aránya Balb 3T3 A31 HYF sejtek (normál sejt) és MSW/MLV Balb 3T3 A31 HYF transzformált változatuk felületi rétegében [17]

	Héj	Intenzitás	Viszony
Normál sejt	Ols	85,0	2,6
	Nls	53,3	
Normál sejt	Ols	78,0	2,5
	Nls	28,5	
Transzformált sejt	Ols	76,0	2,0
	Nls	37,5	
Transzformált sejt	Ols	59,0	2,2
	Nls	26,2	

Megjegyzés: A két adat normál, illetve a transzformált sejtre, kissé különböző preparálási technikával készült mintára vonatkozik.

III. Intézetünkben a már említett munkatársak kutató-fejlesztő munkájának eredményeképpen az elektrosztatikus elektron-spektrométerek — amelyek a szóban forgó módszer szempontjából központi jelentőségűek — egész családja került kifejlesztésre. Összesen hat ilyen spektrométer készült el, ill. van kivitelezés alatt (lásd a 2. táblázatot). Valamennyi spektrométer alapvetően ún. henger-tükör típusú, ill. annak továbbfejlesztett változata.

2. táblázat

Az ATOMKI-ben kifejlesztett elektrosztatikus elektron-spektrométerek fő jellemző adatai

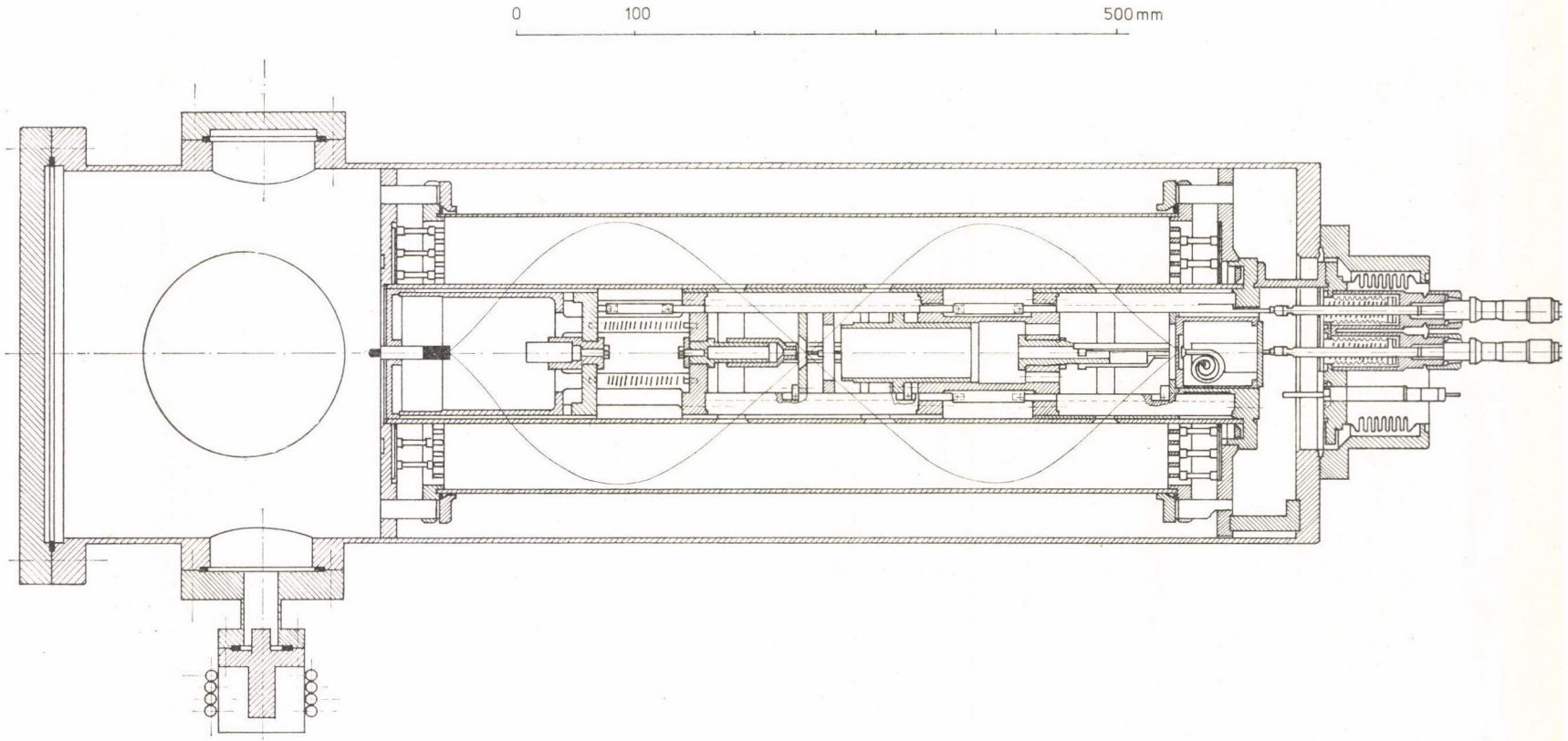
Elnevezés	Energia feloldás[1]	Energia tartomány felső határa[2]
EMESE	$\sim$1%	5 keV
ESA-11	0,2%	20 keV
ESA-12	$<$0,1%	19,5 keV
ESA-13[3]	$\sim$0,2%	5 keV
ESA-21[4]	$\leq$0,1%	15 keV

[1] Fékezéssel a feloldás kb. egy nagyságrenddel javítható. Így pl. az ESA-11 esetében 0,04%-os feloldást sikerült elérni.

[2] Az alsó határ jelenleg minden esetben nagyságrendben 100 eV alatt van.

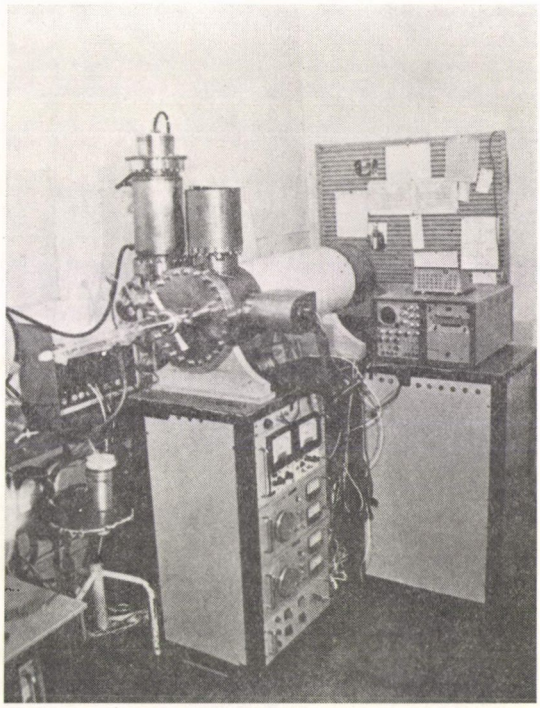
[3] Két példány van építés alatt.

[4] A spektrométerrel egyidejűleg 13 különböző szögnél lehet az elektronok energia spektrumát felvenni. Speciálisan gyorsítók melletti mérésekre tervezve. Jelenleg összeállítás alatt.



3. ábra. Az ATOMKI-ben készült két-fokozatú henger-tükör típusú elektrosztatikus elektronspektrométer (ESA-11 elnevezésű) keresztmetszeti rajza [18]

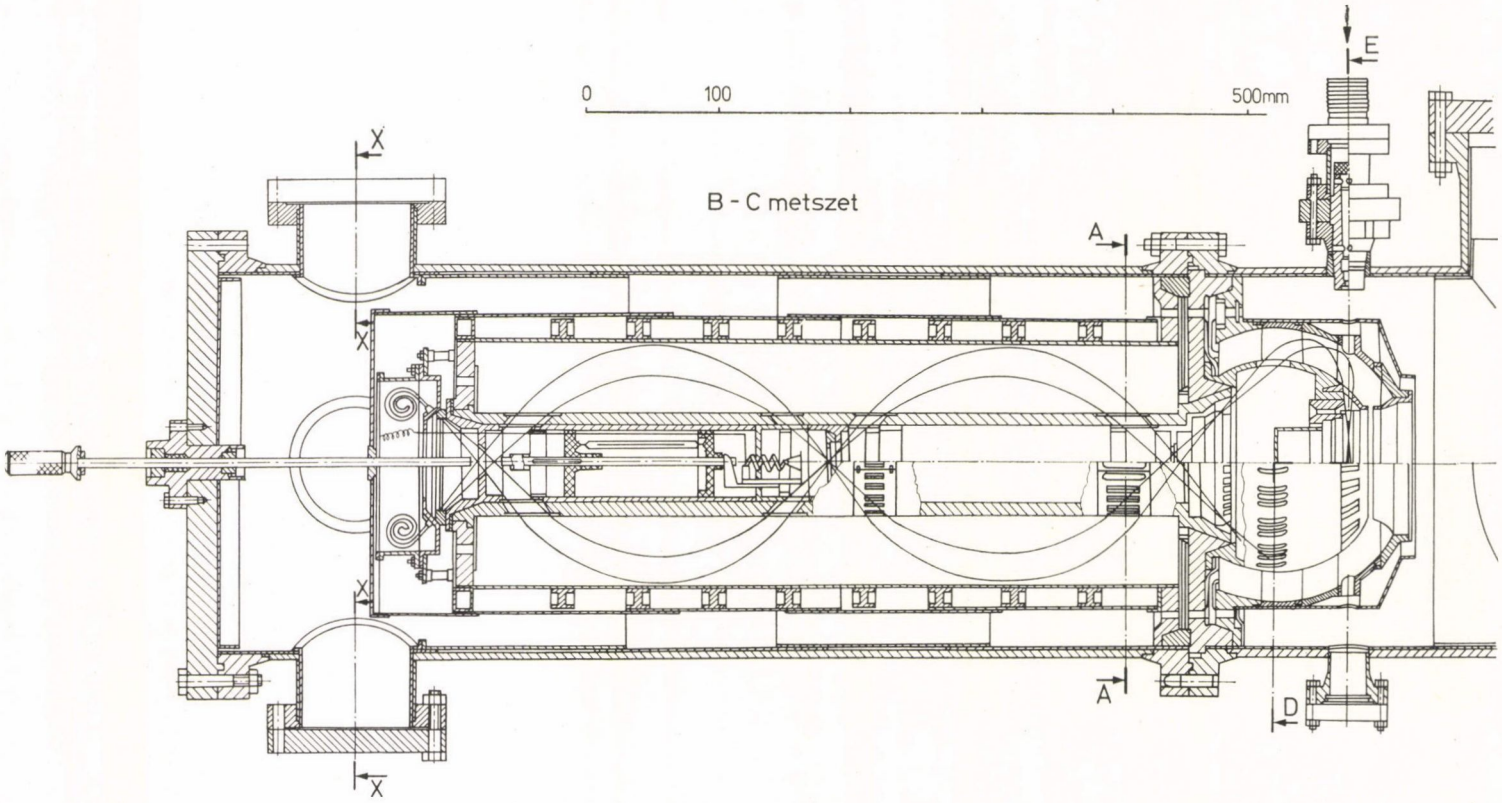
Meg kell jegyeznem, hogy a nagyarányú fejlesztőmunka célja nem elsősorban az anyagvizsgálati alkalmazás volt, hanem a jelenségek egy új területének kutatása. Ez a terület az ion-atom ütközések tanulmányozása gyorsítóknál, ill. azok energia-tartományában. Bombázott célanyagokban létrejövő atomi folyamatokból kilépő elektronok spektroszkópiai vizsgálatáról van itt szó.



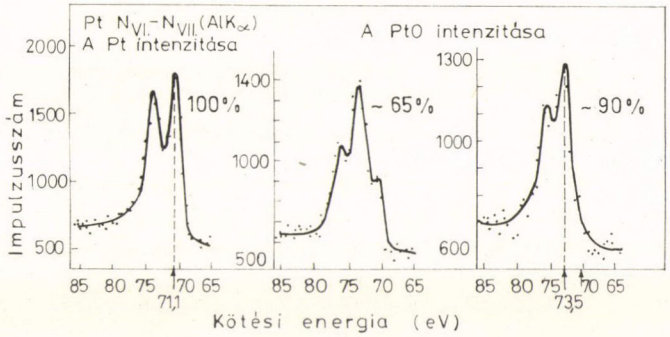
4. ábra. Annak a spektrométernek a fényképe amelynek a keresztmetszete a 3. ábrán látható

A továbbiakban bemutatok az intézetben épített, ill. tervezett elektron spektrométerekből egyet-kettőt. A 3. ábra az ún. ESA-11 (amellyel az XPS mérések folynak az intézetben) keresztmetszetét, ill. a 4. ábra a fényképét mutatja [18, 19]. Az 5. ábra a most összeállítás alatt lévő ESA-21 metszeti rajza, amely egy egészen speciális hármas elektrosztatikus spektrométer és a gyorsítóknál tervezett méréseinknél lesz alkalmazva [20].

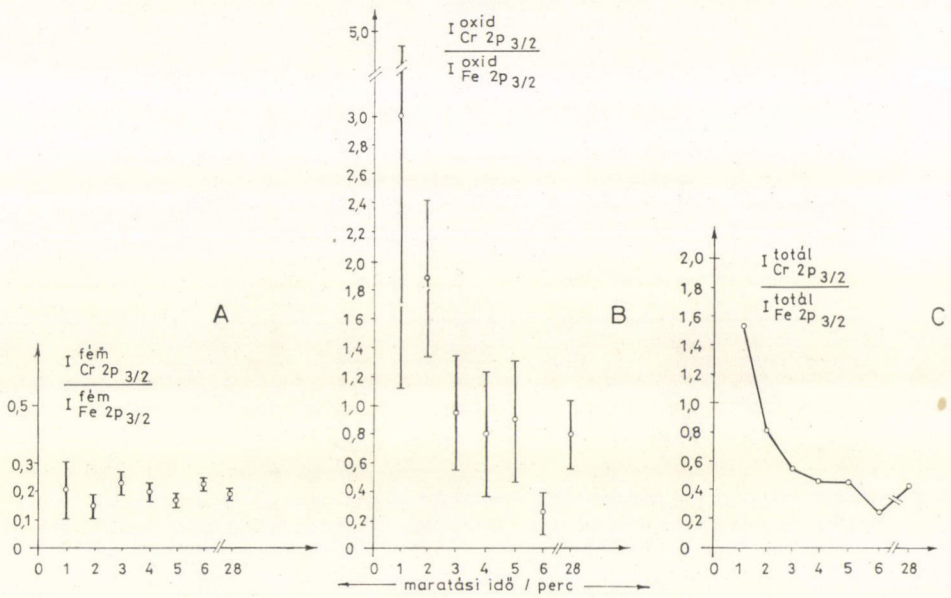
Ugyancsak bemutatok egy-két eredményt, amelyet az intézetben az ESCA-XPS vizsgálatokban értünk el. Bár ezek nem biológiai objektumokra és jelenségekre vonatkoznak, meg is mutatják azt a potenciált, amely e módszer vonatkozásában hazánkban kifejlesztésre került.



5. ábra. Három-fokozatú elektrosztatikus elektron-spektrométer metszeti vázlata. Speciálisan nukleáris gyorsítók melletti kutatásokra tervezve [20]



6. ábra. **Pt-felület elektrolitikus oxidációjának nyomonkövetése az XPS spektrumban [15]**



7. ábra. **Cr és Fe, ill. ezek oxidjainak megfelelő vonalak intenzitásának viszonya az XP spektrumban [12]**

Az első példa platina felület elektrolitikus oxidációjára vonatkozik [15], ahol az egész felületen lejátszódó folyamatot végig lehetett kísérni (lásd 6. ábrát).

A másik rozsdamentes acélok vizsgálatával kapcsolatos [12]. Itt az derült ki, hogy ezen acélok kedvező felületi tulajdonságait a CrO néhány monoréteges bedúsulása okozza a felületen (lásd a 7. ábrát).

Előadásomat azzal a megjegyzéssel zárnám, hogy a fenti insztrumentális és alkalmazott eredmények ellenére a módszer hazai alkalmazása biológiai problémák megoldása még várat magára.

IRODALOM

1. BAKER, A. D., BRISH, M. A. és LIOTTA D. C.: Analitical Chemistry **50,** Chapter C. p. 338 R (1978).
2. BERÉNYI, D.: Magyar Kémikusok Lapja **21,** 533 (1966).
3. BERÉNYI, D.: Izotóptechnika **17,** 225 (1973).
4. BERÉNYI, D.: Atomki közl. **17,** 193 (1975).
5. BERÉNYI, B.: A Kémia Újabb Eredményei **35,** 71 (1977).
6. BERÉNYI, D.: A Szilárdtestkutatás Újabb Eredményei **5,** 131 (1979).
7. BRUNDLE, C. R. és BAKER, A. D.: „Electron Spectroscopy." Academic Press London, New York, San Francisco pp. 346 (1979).
8. CARLSON, T. A.: „Photoelectron and Auger Spectroscopy." Plenum Press, Ne York and London pp. 273 (1975).
9. COLLIN, J. E.: Kémiai Közl. **41,** 81 és 93 (1974).
10. COTHERN, C. R., MODDEMAN, W. E., ALBRIDGE, A. G., SONDERS, W. J., KELLY, P. L., HONLEY, W. S. és FIELD, L.: Anal. Chem. **48,** 162 (1976).
11. HULETT, L. D. és CARLSON, T. A.: Clinical Chemistry **16,** 677 (1970).
12. KÁDÁR, I., KÖVÉR, L. és CSERNY, I.: Atomki közl. **22,** 29 (1980).
13. KÁNTOR, T. és PUNGOR, E.: Kémiai Közl. **36,** 415 (1971).
14. KESZTHELYI, L.: Magyar Fiz. Foly. **21,** 336 (1973).
15. KÖVÉR, L., UJHELYI, Cs., BERÉNYI, D., VARGA, D., KÁDÁR, I. és KÖVÉR, Á.: J. Electron Spectroskopy and Related Phenom. **14,** 201 (1978).
16. MEISENHEIMER, R. G., FISCHER, J. W. és REHFELD, S. J.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **68,** 994 (1976).
17. MILLARD, M. M. és BARTHOLOMEW, J. C.: Analitical Chemistry **49,** 1290 (1977).
18. MÓRIK, GY.: Doktori Disszertáció, Kossuth L. Tud. Egyetem Debrecen (1980).
19. VARGA, D., KÁDÁR, I., KÖVÉR, Á. és MÓRIK, Gy:.: Nucl. Instr. Meth. **154,** 477 (1978).
20. VARGA, D. és MÓRIK, Gy.: magán közlés.

KVANTUMKÉMIAI MÓDSZEREK

KAPUY EDE

BME Fizikai Intézet
Kvantumelméleti Kutató Csoport, Budapest

A kvantumelméletnek a kémiában és a biológiában való alkalmazását kvantumkémiának, illetve kvantumbiológiának nevezik. A kvantumelmélet alkalmazásának két oldala van. Egyrészt segítséget nyújt a mikroszkópos szintű jelenségek megértéséhez, másrészt lehetővé teszi, hogy fizikai és kémiai állandókat pusztán elméleti úton meghatározzunk. Az utóbbi aspektus a nagykapacitású elektronikus számítógépek megjelenése után került előtérbe, mi a továbbiakban kizárólag evvel foglalkozunk.

Atommagokból és elektronokból álló mikroszkópos rendszerek állapotát egy Ψ hullámfüggvény írja le, amely a részecskék koordinátáinak és az időnek függvénye. Ha ezt a függvényt ismerjük, kiszámíthatjuk a rendszer fizikai és kémiai állandóit. A rendszer lehetséges energiaállapotait leíró $\Psi_\varkappa$ hullámfüggvényeket a

$$\hat{H}\Psi_\varkappa = E_\varkappa \Psi_\varkappa$$

ún. időtől független Schrödinger-egyenlet megoldásával határozhatjuk meg, amelyben $E_0, E_1, \ldots, E_\varkappa, \ldots$, a rendszer $0, 1, \ldots, \varkappa, \ldots$, állapotainak energiái. Ha az elektronok és az atommagok mozgását Born és Oppenheimer szerint szétválasztjuk, minden $E_\varkappa$ energia a magok koordinátáinak függvénye, és azt a potenciálteret írja le, amelyben, az adott állapotban, a magok mozognak. Ennek minimumai felelnek meg a stabilis magelrendeződéseknek. Az egyenlet megoldása, vagyis a $\Psi_\varkappa$ hullámfüggvények és az $E_\varkappa$ energiák meghatározása közelítő módszerekkel történhet. A közelítő módszerek közül kiemelkednek az ún. ab inició módszerek, amelyeket az jellemez, hogy a rendszer összes elektronját figyelembe veszik és az atomi állandókon kívül nem használnak fel tapasztalati adatokat. A legfontosabb ab inició módszerek alapja az ún. függetlenrészecske- vagy Hartree—Fock-modell, amely egy N-elektronból álló rendszer hullámfüggvényét determináns alakjában veszi fel:

$$\Psi_{HF} = (N!)^{-\frac{1}{2}} \det \begin{vmatrix} \psi_1(1)\, \psi_1(2) & \ldots & \psi_1(N) \\ \psi_2(1)\, \psi_2(2) & \ldots & \psi_2(N) \\ \ldots & \ldots & \ldots \\ \psi_N(1)\, \psi_N(2) & \ldots & \psi_N(N) \end{vmatrix}$$

A determináns elemei olyan ψ_i függvények, amelyek egyetlen elektron koordinátáitól függnek. Ezeket a függvényeket úgy határozzuk meg, hogy a Ψ_{HF} hullámfüggvénnyel számított E_{HF} energia minimális legyen, ami akkor következik be, ha a ψ_i-k eleget tesznek az ún. Hartree—Fock-egyenleteknek. Az utóbbiak egyelektron-egyenletek, ezért megoldásuk jóval egyszerűbb, mint a fenti Schrödinger-egyenleté. A ψ_i egyelektron-függvényeket rendszerint ismert φ_μ elemi függvények, ún. bázisfüggvények szerint sorba fejtik

$$\psi_i = \sum_\mu c_{i\mu}\varphi_\mu ,$$

és a $c_{i\mu}$ együtthatározókat határozzák meg (Hartree—Fock—Roothaan-módszer). Általában minél több bázisfüggvényt alkalmazunk, annál pontosabb eredményt nyerhetünk, de a bázis növelésével nő a számítási munka mennyisége is.

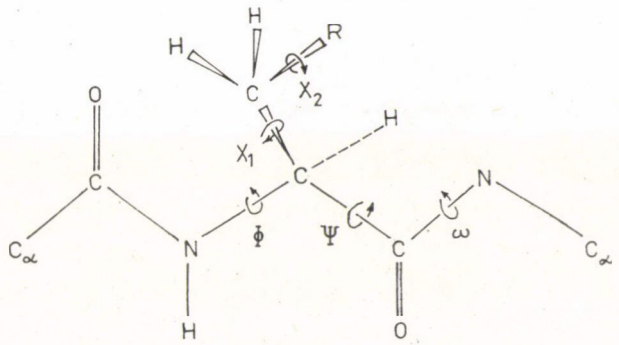
A Hartree—Fock-módszerrel nyert hullámfüggvény természetesen csak közelítőleg írja le a rendszer állapotát, mivel az elektronoknak csak „átlagos" kölcsönhatását veszi figyelembe. Pontosabb leíráshoz figyelembe kell venni az elektronok „pillanatnyi" kölcsönhatását is (elektronkorreláció) [3].

A Hartree—Fock-módszer alkalmazásához szükséges számítási munka rohamosan nő a rendszer elektronjainak N számával. Ezért nagyobb rendszerek tárgyalására olyan közelítő módszereket alkalmaznak, amelyek nem vesznek figyelembe minden elektront, illetve az atomi állandókon kívül más mért adatot is felhasználnak (ún. félempirikus módszerek). Legismertebbek ezek közül a csupán a vegyértékelektronokat figyelembe vevő Extended Hückel, CNDO, INDO, MINDO és PCILO módszerek [3, 6]. A nem ab inició módszerek kevesebb számítási munkát igényelnek, de csak kellő kritikával alkalmazhatók, mivel az eredmények kevésbé megbízhatóak.

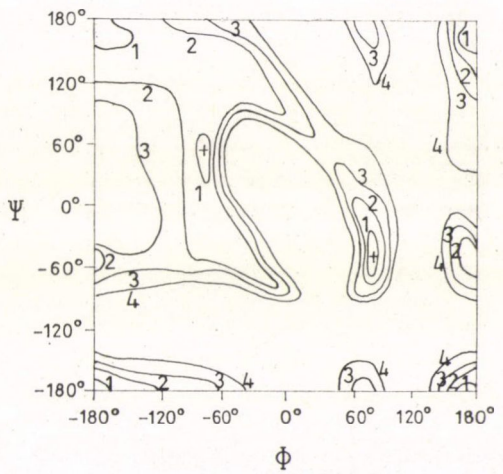
A kvantumkémiai módszerek alkalmazását a gépidőigényesség korlátozza. A korlát azonban nem merev, mivel a számítástechnikai eszközök fejlődésével egyre nagyobb részecskeszámú rendszerek irányába tolódik el. Ma már több olyan módszerrel rendelkezünk, amelyekkel a biológiát és az orvostudományokat érdeklő molekulák is tárgyalhatók elméletileg. Ilymódon olyan információkat nyerhetünk, amelyek hasznos, sokszor nélkülözhetetlen kiegészítői a fizikai és kémiai kísérleti módszerekkel nyerhető adatoknak. Az alábbiakban, nem törekedve teljességre, bemutatjuk az alkalmazások jellegzetesebb példáit.

A szabad (izolált) molekula tárgyalása felvilágosítást nyújt a molekula *alakjáról (geometriájáról* vagy *konformációjáról)*, amelyet akkor vesz fel, ha csak belső erők hatnak rá. Szobahőmérsékleten az atommagok kinetikus energiája alacsony, tehát az $E_\varkappa$ potenciálfelületen nagy valószínűséggel a minimumok közelében tartózkodnak. Meghatározván tehát $E_\varkappa$-t, mint a magkoordináták függvényét, kijelölhetjük azokat a tartományokat a minimumok köze-

lében, amelyben az atommagok tartózkodnak, vagyis megadhatjuk a molekula legvalószínűbb konformációját. E_x-t mint a magkoordináták függvényét szintvonalas térképekhez hasonlóan ábrázolhatjuk (ún. konformáció-térképek).



1. ábra. Polipeptid lánc részlete. A konformációt a beírt Φ, Ψ, ω, χ_1, χ_2, ... szögek rögzítik. A kiindulási helyzet (0°) cisz-planáris konformáció, pozitív szög az óramutató járásával megegyező, negatív szög az óramutató járásával ellentétes forgatásnak felel meg. Az ábra síkjában fekvő peptidlánc konformációja transz-planáris ($\Phi = \Psi = 180°$)

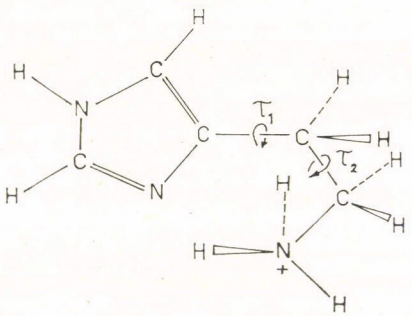


2. ábra. Elméletileg számított konformációs „térkép" alanin-savmaradékot tartalmazó dipeptid-modellre. A modell-molekula energiáját mint a Φ és Ψ szögek függvényét ($\chi_1 = 0$) szintvonalas térképpel ábrázoltuk. Az energia zéruspontját annak minimális értékével vettük azonosnak, amelyet a térképen kereszttel (+) jelöltünk. A szintvonalak az azonos energiájú pontokat kötik össze, és az alábbi energiáknak felelnek meg: 1 = 4,2 kJ/mol, 2 = 12,6 kJ/mol, 3 = = 16,7 kJ/mol, 4 = 25,1 kJ/mol

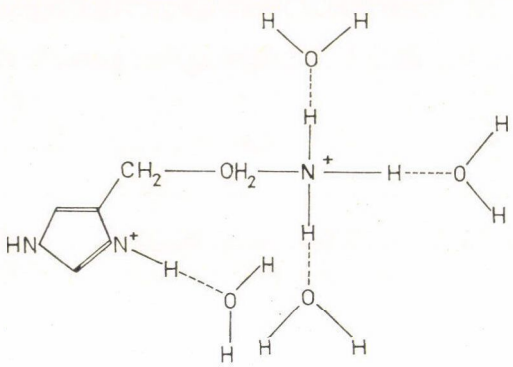
Az 1. ábrán feltüntettük a peptidlánc egy részletét, amelynek konformációját a Φ, Ψ, ω, χ_1, χ_2, ... szögekkel adhatjuk meg. A C_α jelű atomokat metil csoportokkal helyettesítve, egyébként csak az ábrán feltüntetett atomokat véve figyelembe, alanin savmaradék esetén a 2. ábrán feltüntetett konfor-

mációs térképet kapjuk. Noha a modell csak a közvetlen, ún. rövid hatótávolságú kölcsönhatásokat veszi figyelembe, a kísérletekkel összhangban álló eredményeket szolgáltat [8].

A modell ebben a formában vákuumban lévő izolált molekulákat ír le, elhanyagolja azoknak a környezettel (pl. oldószermolekulákkal) való kölcsönhatását. Az *oldószer hatására* azonban a konformáció is megváltozik, ami el-



3. ábra. A hisztamin-kation konformációja

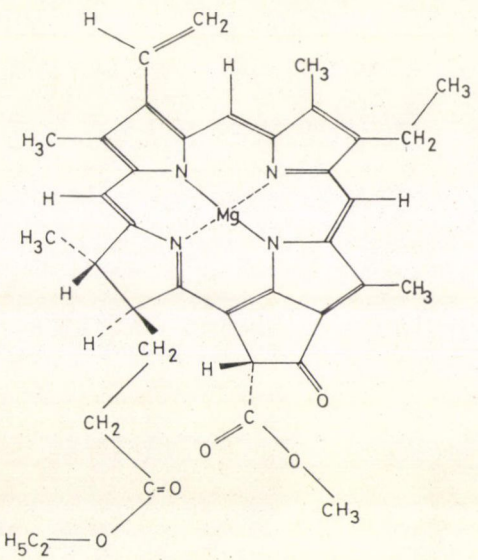


4. ábra. Vízmolekulák kötődési helyei a hisztamin-kationban

méleti számításokkal is kimutatható. A hisztamin kation konformációját a τ_1 és τ_2 szögekkel rögzíthetjük (3. ábra). Elméleti számítások szerint izolált állapotban legstabilisabb konformációja: gauche, $\tau_1 = 30°$ és $\tau_2 = -60°$ szögekkel. A hidratáció hatása elméleti számításokkal jól követhető. A hisztamin kationhoz négy H_2O kapcsolódik hidrogénkötéssel (4. ábra). Ezeket a molekula részeként figyelembe véve a számítások azt mutatják, hogy a konformáció a víz hatására lényegesen megváltozik: gauche ($\tau_1 = \pm 60°$, $\tau_2 = \pm 60°$) és transz ($\tau_1 = \pm 30°$, $\tau_2 = \pm 180°$) minimumokat kapunk, az utóbbiak tartománya nagyobb, ezért oldatban transz a legvalószínűbb konformáció, megegyezően a kísérleti eredményekkel [9].

Jelenleg a *fotoszintézisben* szerepet játszó klorofill-származékok a legnagyobb molekulák, amelyekre ab inició szintű vizsgálatokat végeztek. Ezek közül az 5. ábrán feltüntetett etil-klorofillid-*a* tartalmazza a legtöbb elektront: N = 340. A vizsgálatok hasznos felvilágosítást nyújtottak a fény elnyelésében szerepet játszó molekulapályák energiájáról és töltéseloszlásáról [1].

A kvantumkémiai módszerek végtelen nagy rendszerekre is alkalmazhatók, ha azok periodikusan ismétlődő egységekből épülnek fel. Ilyenek a biopolimerek (proteinek, DNS), amelyeknek *elektromos vezetési tulajdonságai* már



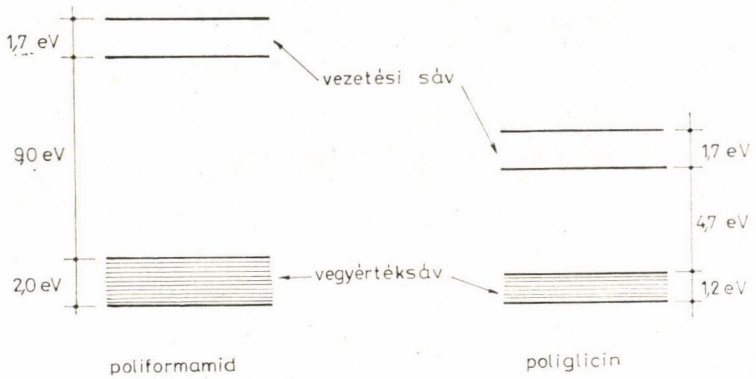
5. ábra. Az etil-klorofillid-*a* molekula szerkezete

régóta foglalkoztatják a kutatókat [13]. Az evvel kapcsolatos elméleti és kísérleti vizsgálatok már több mint 20 éve megindultak. A proteinek legegyszerűbb kétdimenziós modelljeiként szolgáló poliformamidra és poliglicinre végzett elméleti számítások a betöltött vegyértéksávok szélességére 2,0 eV és 1,2 eV, az üres vezetési sávok szélességére 1,7 eV és 1,7 eV, a két sávot elválasztó energiahézagra 9,0 eV és 4,7 eV értékeket adtak (lásd 6. ábra) [2, 4, 12]. A modell szerint a protein szigetelő, mivel túl nagy energiát kellene befektetni ahhoz, hogy a betöltött vegyértéksávból elektronokat vihessünk át az üres vezetési sávba.

Szent-Györgyi azonban posztulálja, hogy létezik a sejtben egy elektromosan vezető protein, amely a légzési lánc részét alkotja. Elgondolása szerint ez a protein csak akkor vezet, ha töltésátviteli komplexet képez elektronakceptor-vegyületekkel, mint például a metilglioxál. Az akceptor ugyanis elektronokat von el a betöltött vegyértéksávból, az így létrejött lyukak miatt a rend-

szer vezetővé válik. Ha azonban valami miatt a komplex felbomlik, a protein elveszti vezetőképességét, vagyis nem továbbítja már az elektronokat a légzési láncban, aminek az a következménye, hogy a sejt egy primitívebb állapotba kerül, amelyben osztódását már semmi nem korlátozza. Ez a hipotézis a rák ún. elektronelmélete [14]. Kazein esetén a vezetőképesség metilglioxál hozzáadására történő növekedését kísérletileg is igazolták [7].

A biológiai folyamatokban nagy szerepet játszanak a *nagy molekulák ún. gyenge kölcsönhatásai* (elektrosztatikus, polarizációs, diszperziós). Ezek elméletileg jól modellezhetők és kvantitatíve is számolhatók. A racionális gyógyszer-

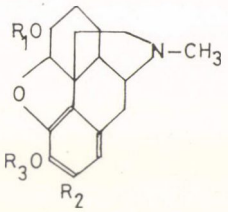


6. ábra. Poliformamid és poliglicin elméleti számításokkal meghatározott sávszerkezete

tervezéshez elengedhetetlen a hatóanyag-receptor kölcsönhatásnak és a receptorhely topográfiájának ismerete. Tanulmányozva ismert szerkezetű hatóanyagok aktivitását, a *receptorhely „feltérképezhető"*. Példaként bemutatjuk az ópiumos narkotikumok (szerkezetük a 7. ábrán látható) receptorának térképét (lásd a 8. ábrán), amelyet részletes vizsgálatok alapján határoztak meg. A feltérképezést ebben az esetben megkönnyítette, hogy a fenti vegyületcsoport váza viszonylag merev, feltételezhető, hogy jelentősen nem deformálódik a receptorhoz való kötődés esetén. Az elektroneloszlást kiszámítva meghatározták a fenti molekuláknak a receptorhelyhez való kötődésének erősségét, amelyet arányosnak találtak a kísérletileg megállapított hatékonysággal [11].

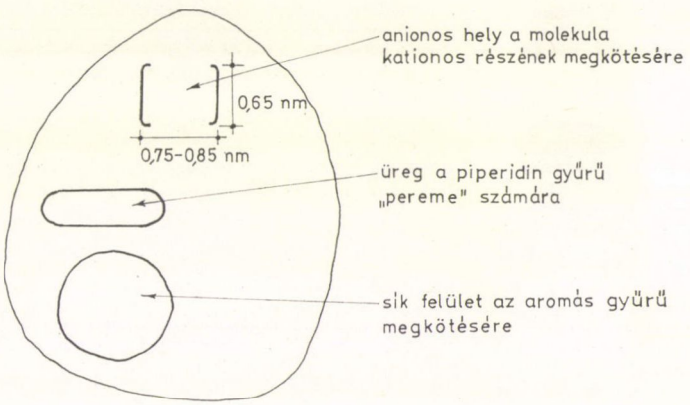
Felhasználják a kvantumkémiai módszerekkel számított paramétereket (atomok töltése a molekulában, ionizációs energiák, gerjesztési energiák stb.) *kvantitatív szerkezet-hatékonysági összefüggések* megállapítására. Ez a módszer szintén a racionális gyógyszertervezés eszköze. Nem vizsgálja a hatás mechanizmusát (receptor-szerkezet, kötődési folyamat), hanem a molekuláris paraméterek és a kísérletileg észlelt hatékonyság között keres összefüggést statisztikai módszerekkel.

A magyar kutatók úttörő szerepet játszottak a kvantumkémiai módszerek biológiai alkalmazásában. Eredményeiket széles körben ismerik és sokat idézik a nemzetközi szakirodalomban. Sajnos a hazai számítástechnikai



	R_1	R_2	R_3
morfin	-H	-H	-H
kodein	-H	-H	$-CH_3$
heroin	$-CO-CH_3$	-H	$-CO-CH_3$
6-monoacetil morfin	$-CO-CH_3$	-H	-H
2-amino morfin	-H	$-NH_2$	-H

7. ábra. Ópiumos narkotikumok szerkezeti képlete



8. ábra. Ópiumos narkotikumok receptorának „térképe", amelyet a hatóanyagok szerkezetéből vezettek le

kapacitás eddig erősen korlátozott volt, a nagy számítási munkát igénylő biológiai vonatkozású alkalmazásokra, csak külföldi kooperációban nyílt lehetőség. Az MTA új IBM 3031 számítógépe, amennyiben kvantumkémiai számításokra is hozzáférhető lesz, nagy lendületet ad a hazai kutatásoknak.

FÜGGELÉK

Jelenleg hazánkban az alábbi intézményekben foglalkoznak biológiai problémák tárgyalására is alkalmazható kvantumkémiai módszerek fejlesztésével:

MTA:
Központi Kémiai Kutató Intézet, Elméleti Kémia Csoport
Egyetemek:

BME:
Fizikai Intézet, Kvantumelméleti Kutató Csoport,
Fizikai Kémia Tanszék,
Szervetlen Kémia Tanszék

ELTE:
Általános és Szervetlen Kémia Tanszék,
Szerves Kémia Tanszék

JATE
Általános és Fizikai Kémia Tanszék,
Elméleti Fizika Tanszék

KLTE:
Elméleti Fizika Tanszék,
Szerves Kémia Tanszék

SOTE: Gyógyszer Tanszék

Ipari Intézmények:
Chinoin Gyógyszerárugyár,
Kőbányai Gyógyszerárugyár,
Magyar Vegyipari Egyesülés Mérnöki Iroda
Műanyagipari Kutató Intézet

IRODALOM

1. Christoffersen, R. E.: Int. J. Quant. Chem. **16,** 573 (1979).
2. Del Re, G., Ladik J. and Biczó, G.: Phys. Rev. **155,** 997 (1967).
3. Kapuy, E. és Török, F.: Az atomok és molekulák kvantumelmélete, Akadémiai Kiadó, Budapest (1975).
4. Ladik, J.: Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. **S1,** 5 (1974).
5. Loew, G., Weinstein, H., Srebrenik, S. and Berkowitz, D.: In Quantum Biology and Quantum Pharmacology, Proc. 7th Jerusalem Symp., Eds. Bergman, E. D., and Pullman, B., Reidel, Rordrecht, Holland (1974).
6. Náray-Szabó Gábor: Alkalmazott kvantumkémia, Műszaki Könyvkiadó, Budapest (1979).
7. Pethig, R. and Szent-Györgyi, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74,** 226 (1977).
8. Pullman, B.: in Quantum mechanics of molecular conformations, Ed. Pullman, B., Wiley-Interscience, London (1976).
9. Pullman, B.: Advan. Quant. Chem. **10,** 251 (1977).
10. Richards, W. G.: Quantum Pharmacology, Butterworths, London (1977).
11. Sklenar, H. and Jäger, J.: Int. J. Quant. Chem. **16,** 467 (1979).
12. Suhai, S. and Ladik, J.: Theoret. Chim. Acta (Berl.) **28,** 27 (1972).
13. Szent-Györgyi, A.: Nature **148,** 157 (1941).
14. Szent-Györgyi, A.: Bioelectrics **4,** 535 (1973); Acta Bichem. et Biophys. Acad. Sci. Hung. **8,** 117 (1973).

SZÁMÍTÓGÉPES KARDIOLÓGIAI MÓDSZEREK

SZLÁVIK FERENC

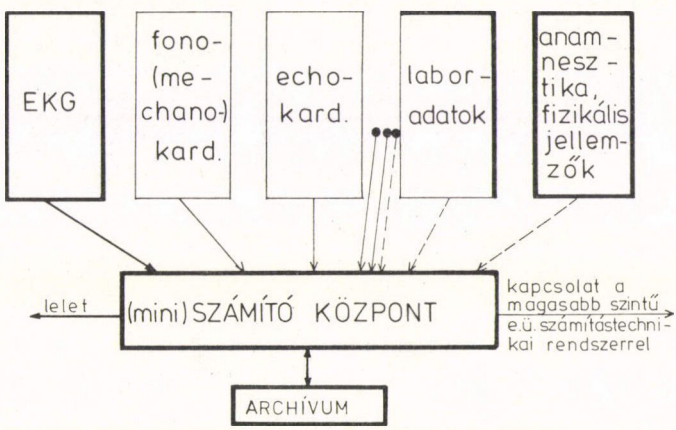
MTA Központi Fizikai Kutató Intézete, Budapest

A rövidségre és a hitelességre való törekvés okán a következőkben főként arról a munkáról adunk tájékoztatást, amelyet a számítógéppel segített elektrokardiológia terén a Központi Fizikai Kutató Intézet több hazai és külföldi gyógyító- és kutatóhellyel — közöttük elsősorban az Orvostovábbképző Intézettel — együttműködve végez.

Hogy mindezt jobban azonosíthassuk, idézzük most az 1. ábra segítségével a jelenbe a jövő számítógépekkel segített, integrált kardiológiai-diagnosztikai rendszereinek egy lehetséges realizációját.

A számítástechnikai intelligencia előreláthatólag megoszlik az egyes készülékek között: az EKG-, a fonokardiográfiai stb. egység az általa mért, adattá konvertált jeleket saját mikroszámítógépével fel is dolgozza, sőt elő is állítja az „EKG diagnózist", elvégzi a kvantitatív szívhang-analízist stb. A teljes értékű kardiológiai diagnózishoz e partikuláris jellemzőknél természetesen általában többre is szükség van, pl. a betegről nyert anamnesztikai, fizikális és egyéb információkra, laboratóriumi adatokra, s mindezeknek egymással, valamint a korábbi adatokkal, leletekkel való egybevetésére.

Az ábrán azokat a funkcionális egységeket és kapcsolataikat jelöltük vastag vonallal, amelyek fejlesztésében kutató közösségünk említésreméltó



1. ábra. Integrált, számítógépes kardiológiai diagnosztikai rendszer

eredményeket ért el, s amelyek tökéletesítésén a továbbiakban is intenzíven dolgozni kívánunk. (Pl. a kérdőíves anamnézis-felvételt is számítógépesítettük, s a KFKI üzemorvosi mintarendszerében sikerrel próbaüzemeltetjük.) A „labor-adatok" blokkja félig van kiemelve; ez arra utal, hogy pár éve néhány — ma is jól működő — példányban létrehoztunk egy automatizált, diszkrét rendszerű, fotometrikus laboratóriumi sorozatelemzőt, amely csekély továbbfejlesztéssel az elkövetkező évtized, illetőleg az integrált rendszerek számára is adekváttá tehető.

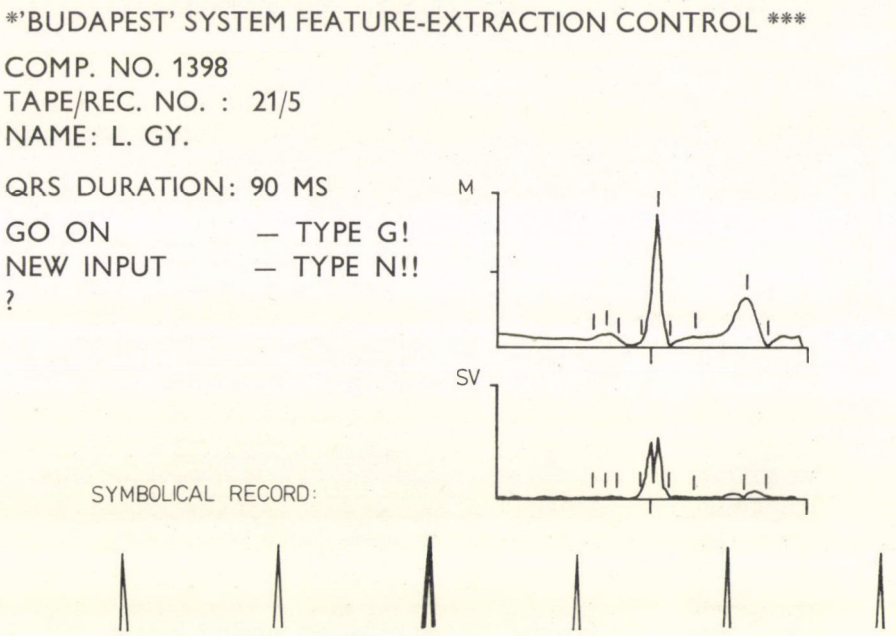
Koncentráljunk most az „EKG"-blokkra, s ennek kapcsán tekintsük át a főként a KFKI és az Orvostovábbképző Intézet II. Belklinikája, valamint a Központi Állami Kórház és Rendelőintézet együttműködésében fejlesztett számítógépes EKG diagnosztikai rendszert, amely már a jelenlegi, kutatási stádiumban is segítséget ad a klinikai rutinmunkákhoz, s amelynek kidolgozása során az orvosbiológiai jelfeldolgozás szélesebb körében is jól hasznosítható módszerek és tanulságok születtek.

Az EKG-jelek jó minőségű erősítése, az x-y-z projekciók rögzítése, kalibrációs jellel és azonosító információval való kiegészítése orvosi partnerintézményeinkben a betegágy vagy a vizsgáló asztal mellett levő ún. felvételező egység segítségével történik, minden esetben 10 sec-os időtartammal. Jelenleg analóg FM mérőmagnetofonnal biztosítjuk a jelek átmeneti tárolását, de a KFKI-ban már fejlesztés alatt állnak az analóg tárolási fázist kihagyó, s a közvetlen digitalizálást, az adatelőkészítést, (jel-zaj viszony vizsgálatot, impulzus zajjal szennyezett szakaszok kitiltását, digitális szűrést, kalibrációt, alapvonal helyreállítást), valamint a továbbiakban az egyszerűbb diagnosztikai értékelést is ellátó, mikroprocesszoros készülékek.

Az adatelőkészítés után végzi a feldolgozó egység — amely a jelenlegi konfigurációban egy 32 k operatív memóriával ellátott TPA-i miniszámítógép — a „tipikus" szívciklus kiválasztását. Ismeretesek olyan eljárások, amelyek az átlagolt ciklus alapján diagnosztizálnak, a mi vizsgálódásaink azonban azt mutatták, hogy az átlagolás során értékes elektrokardiológiai információ mehet veszendőbe.

Az EKG görbe automatikus kiértékeléséhez szükséges amplitúdó- és idő-adatok mérése a görbe ún. karakterisztikus pontjainak, az egyes rész-hullámok (P, QRS, T) kezdő-, csúcs-, ill. végpontjainak gépi meghatározásán alapul. A bázis-pontok kijelölésének eredménye a grafikus megjelenítő egység ernyőjén ellenőrizhető — lásd a 2. ábrán a szív elektromos vektora magnitúdójának s ún. térbeli sebességének grafikonja fölött levő marker vonalakat —, és interaktív üzemmód esetén manuálisan befolyásolható. Ez utóbbira csak kivételes esetekben van szükség, az EKG rutinmunkát számítógépünk automata üzemmódban végzi. (Példaként említjük, hogy a QRS szakaszt 8, időben ekvidisztáns momentán vektorral jellemezzük.)

A diagnózis számítása statisztikus és logikai eljárások kombinációjával megy végbe. Például a vizsgált szívciklus QRS szakaszának adatait a program a memóriában tárolt, összesen 25, 1—1 betegségosztályt statisztikusan jellemző adatcsoport mindegyikével összehasonlítja, s megállapítja, hogy mely esetben a legkisebb az eltérés. Ezt az ún. előzetes QRS diganózist az algoritmus kiegészítő eljárásokkal, egyes amplitúdó- és időértékek súlyozott tekintetbevételével ellenőrzi, ill. módosítja.



2. ábra. A magnitudó és a térbeli sebesség görbe karakterisztikus pontjainak jelölése

Mindezzel együtt EKG diagnosztikai programrendszerünk, az ún. BUDAPEST program kifejlesztésének jelenlegi fázisában az algoritmus összesen 43 féle „QRS-döntést" tesz lehetővé (pl. különféle lokalizációjú infarktusok, vezetési zavarok, kamrai hipertrófiák s az eddig említettek lényeges kombinációi).

A gépi diagnózis-alkotás folyamatának mozzanatai közül aritmia-elemző szubrutinunkat is szeretnénk kiemelni, amely a clusterezési és a döntési fa típusú eljárásokat együttesen alkalmazva 28 féle döntés meghozatalára képes. (A „diagnózis", illetőleg a „döntés" szó természetesen mindenütt idéző jelek között értendő, hiszen a számítógép, illetőleg a számítástechnikai rendszer — a jelenlegi orvosi etikai gyakorlatnak megfelelően — csak diagnosztikai véleményt nyilvánít, a végszó kimondásának joga az orvosé.

*** 'BUDAPEST' COMPUTERISED SYSTEM FOR ECG ANALYSIS ***

COMP. NO.	T/R NO.	FLP/SER. NO.	DATE OF REC.	DATE
1176	23/51	18/6	800320	800409

NAME: G. J.
COMMENT:

ECG DIAGNOSIS

QRS:
POSTERO-DIAPHRAGMATICAL MYOCARDIAL INFARCTION

ST:
NORMAL:

T:
LATERAL INTRAMURAL ISCHAEMIA
POSTERO-INFERIOR INTRAMURAL ISCHAEMIA

RHYTHM:
HEART RATE: 85
NORMAL SINUS RHYTHM

QRS MOMENTARY VECTORS (UNIT = 0.1 MV)

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
X:	−0.6	0.1	7.9	14.1	2.8	−1.1	−1.7	−1.8
Y:	−0.5	−1.4	−0.3	2.1	3.3	1	0.6	−0.4
Z:	−0.2	−3.5	−6	−1.7	8.3	4.5	1.7	0.3

MEASURED VARIABLES: (UNIT = 0.1 MV OR MSEC)

QRS	PQ	RX	RY	MMAX	PX	PY	PZ
98	132	14.1	3.3	14.3	1.7	1.1	0.5
STX	STY	STZ	TX	TY	TZ	TYP. PER.	NO. OF CL.
−1.4	0.1	−0.4	−0.9	−1.2	−3.3	3	1

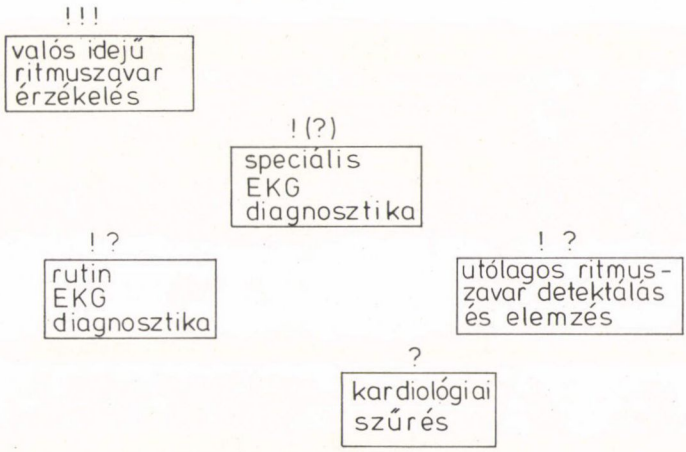
COMMENT: OK!
OVERREADER: WT

3. ábra. Nyomtatott számítógépes EKG diagnosztikai lelet, az adatfeldolgozás során meghatározott jelfeszültség- és időtartamértékek listájával együtt

Az EKG diagnózis a számítástechnikai rendszer 1 vagy több megjelenítő egységén olvasható le, s természetesen nyomtatott l e l e t is készül (3. ábra). Ez utóbbi, kívánságra, az adatfeldolgozás során meghatározott jelfeszültség- és időtartam értékeket is tartalmazhatja, ami megkönnyíti az utólagos ellenőrzést.

A BUDAPEST program jelenleg használt változatának eddigi v a l i d i z á l á s i eredményei azt mutatták, hogy rendszerünk helyes diagnosztikai

véleményeinek gyakorisága, s kiváltképpen következetessége meghaladja az átlagos kardiológusét. Ezen túlmenően, a gépet egyenesen szeretetreméltóvá teszi az a tulajdonsága, ami a jó kardiológusból sem hiányzik: a szerénység. Az algoritmus ugyanis nem akar minden EKG felvételt valamelyik klasszikus EKG kategóriába beerőltetni, — ha az adott esetet EKG-paraméterei a diagnosztikai clusterek közötti „senki földjére" utalják, akkor a gép az orvost további vizsgálatok szükségességére figyelmezteti.



4. ábra. Számítógéppel segíthető főbb EKG elemzési feladatok

A lelettel együtt, számítógépi adathordozón — jelenleg mágneses tárcsán — kerülnek tartós tárolásra az analizált EKG felvétel legfontosabb jellemzői. Ennek a módszernek főbb előnyei a következők:

— az archív EKG anyagok kis helyet foglalnak el és gyorsan előkeresheték,
— a napról-napra növekvő adatbankból kényelmesen készíthetők el a kutatási és egészségügyi célból szükséges statisztikák,
— új felvételek a régiekkel igen precízen egybevethetők, így pl. morfológiai trendek állapíthatók meg, s ezek alapján megelőző célzatú javaslatok adhatók, vagy pl. post mortem esettanulmányok végezhetők.

Az eddigiekben egy számítógéppel segített, ún. rutin EKG diagnosztikai berendezést és eljárást mutattunk be. Vessünk most egy pillantást a 4. ábrára, amelyen a számítástechnika segítségét igénylő elektrokardiológiai feladatok többi főbb csoportja is látható. A felkiáltójelek a beteg veszélyeztetettségének jellemző mértékére utalnak abban a szituációban, amelyben az adott vizsgálat alkalmazásra kerül. (A kérdőjel azt jelenti, hogy a szívbetegség ténye kérdéses.)

E téglalapok nagyobb részét — több-kevesebb joggal — az előbb említett jelentéssel vastagon bekeretezhettük volna, itt most végezetül mégis főként a speciális EKG diagnosztika (ahová pl. a terheléses EKG- vagy a His EKG-vizsgálatok is tartoznak) egyik eszközéről, ill. módszeréről, az ún. felületi térképezésről szólunk, amit a KFKI szintén az OTKI II. Belklinikájával együttesen művel.

Ahhoz, hogy elfogadható becslést végezhessünk a mellkasfelszín bármely pontján fellépő elektromos potenciál időbeli alakulására, meglehetősen sok — általában 100-nál több — pontról kell, lényegében egyidejűleg, EKG-felvételt készíteni. A teljes potenciálkép meghatározásának azért van értelme, mert a szívműködés által keltett elektromos tér információtartalmának egy része a hagyományos EKG-ból nem állapítható meg, márpedig vannak esetek, amikor ez a többlet-információ igen értékes.

A valóban egyidejű felvételezést csak költséges berendezéssel lehet megvalósítani. Ezért az EKG jeleket a mellkasfelszín 120 pontjáról 12-es parallel csoportokban szekvenciálisan vesszük fel, s a számítógépi program a monitorelvezetés jelének folyamatos formaanalízise révén rendeli egymáshoz a közel azonos körülmények között keletkezett, tehát egyidejűnek tekinthető hullámalak-részleteket.

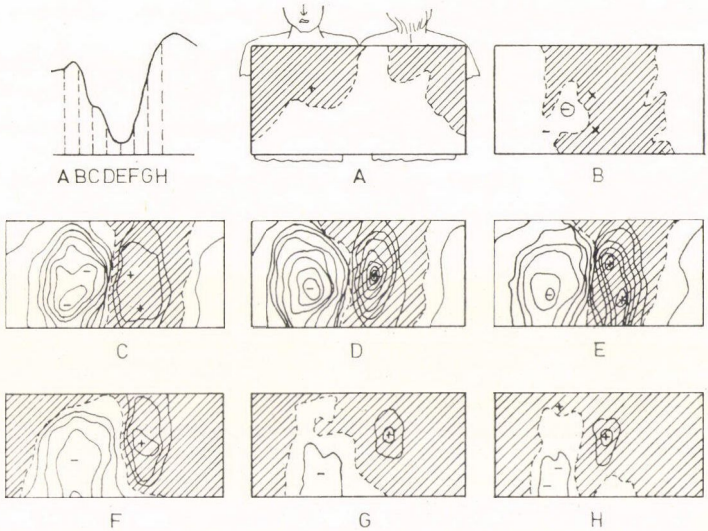
Az 5. ábrán a TPA-i számítógéppel feldolgozott adatokból származtatott és vizualizált eredményre látunk egy példát.

Az ábrán levő „pillanatfelvételeken" a mellkasfelszín azonos potenciálú pontjai vannak néhány potenciálértéken összekötve. A bal felső ábrán látható monitorgörbén és az egyes „szintvonalas térképek" alatt levő betűk együttesen azt mutatják, hogy az egyes potenciáleloszlás-képek a szívciklus mely időpontjához tartoznak.

Az 5. ábrán bemutatott kóreset kitűnő illusztráció a felületi potenciáltérképezés diagnosztikai hasznosságára. Ez a beteg egyidejűleg szenved vezetési zavarban (ún. Tawara-szár blokkja van) és, amint az a térképek alapján kimutatható, mellső fali szívinfarktusban. A beteg hagyományos EKG-ján az infarktus jellegzetes jegyeit elnyomta, elfedte a vezetési zavar okozta jelformáció.

A mellkas felszínére, általában ugyancsak 100-nál több ponton, időnként parányi gyorsulás-érzékelőket rögzítünk. Kidolgoztuk és rendszeresen alkalmazzuk, tudomásunk szerint a világon elsőként, a felületi gyorsulás térképezés, vagyis a szív lüktetése által keltett teljes mechanikai rezgéstér számítógépes meghatározásának módszerét. Ezt a felületi potenciáltérképezéssel együtt alkalmazva az ok és az okozat összefüggéseiben vizsgálható, s így a kardiológusok előtt a szívműködés mégjobb megismerésére nyílik lehetőség.

Hazánkban a halálozások mintegy 50%-áért a szív- és érrendszeri megbetegedések a felelősek. A műszer- és számítástechnika is igyekszik azokat



5. ábra. Bal Tawara-szár blokk I. típusára jellemző potenciáltérképek

a lehetőségeket feltárni, amelyek kihasználásával valamelyest hozzá lehet járulni e fenyegetően nagy szám csökkentéséhez.

HÍREK

Biológiai Tudományok Osztályának Titkársága
1051 Budapest, Münnich Ferenc u. 7.
Tel.: 172-796

Az osztály tagjai

Osztályelnök

Tigyi József r. t.

Osztályelnök-helyettes

Jermy Tibor lev. t.

Tudományos titkár

Dezső Gyula

Rendes tagok

Ábrahám Ambrus
Ádám György
Balogh János
Ernst Jenő
Farkas Gábor
Kaszab Zoltán
Krompecher István
Straub F. Brunó
Szabolcsi Gertrud
Szentágothai János
Tigyi József
Törő Imre
Zólyomi Bálint

Levelező tagok

Dénes Géza
Flerkó Béla
Jakucs Pál
Jermy Tibor
Keleti Tamás
Salánki János
Szabó Gábor

Tiszteleti tagok

Bajev, Alekszandr Alekszandrovics
Braunstein, Alexander Jevszejevics
Gaillard, Pieter Johannes
Giljarov, Merkurij Szergejevics
Hotchkiss, Rollin D.
Mothes, Kurt
Pullmann, Bernard
Rapoport, Samuel Mitja
Roche, Jean
Szent-Györgyi Albert

Tanácskozási jogú tagok

Alföldi Lajos, a biol. t. dr.,
az SZBK Genetikai Int. ig.
Berczik Árpád, a biol. t. dr.,
az MTA Botanikai Kut. Int. ig.
Bihari István, az EGYT ig.
Damjanovich Sándor, a biol. t. dr.,
a DOTE Biofizikai Int. tszv. egy. t.
Gergely János, az orvostud. dr., egy. t.
Zicsi András, a biol. t. dr.

A BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK SZAKMAI BIZOTTSÁGAI

Antropológiai Bizottság

Elnök

Farkas Gyula, a biol. t. kand.;
JATE Embertani Tansz.;
6722 Szeged, Táncsics M. u. 2.

Titkár

Pap Miklós, a biol. t. kand.;
KLTE Állattani és Embertani Tansz.;
4010 Debrecen

Tagok

Eiben Ottó, a biol. t. kand.
K. Éry Kinga muzeológus
Erdélyi István, a történettud. dr.
Harsányi László, az orvostud. kand.
Lipták Pál, a biol. t. dr.
Nemeskéri János, a biol. t. kand.
Szemere György, az orvostud. kand.
Tauszik Tamás, a biol. t. kand.
Tóth Tibor, a biol. t. dr.

Biofizikai Bizottság

Elnök

Damjanovich Sándor, a biol. t. dr.
DOTE Biofizikai Int.;
4012 Debrecen

Titkár

Niedetzky Antal, a biol. t. kand.;
POTE Biofizikai Int.;
7624 Pécs, Szigeti út 12.

Tagok

Banczerowski Januszné, a biol. t. kand.
Berényi Dénes lev. t.
Damjanovich Sándor, a biol. t. dr.
Gyarmati István, a fizikai t. dr.
Keszthelyi Lajos, a fizikai t. dr.
Papp Elemér, a fizikai t. kand.
Párdutz Árpád, tud. mt.
Rontó Györgyi, a biol. t. dr.
S. Rózsa Katalin, a biol. t. dr.
Szalay László, a fizikai t. dr.
Sztanyik László, az orvostud. kand.
Tarján Imre r. t.
Tigyi József, r. t.

Biokémiai Bizottság

A Biológiai Tud. Oszt. és Orvosi Tud. Oszt. közös bizottsága 1980 szeptemberétől. Működteti a Biológiai Tud. Oszt.

Elnök

Előd Pál, a biol. t. dr.
DOTE Biokémiai Int.
4012 Debrecen

Titkár

Závodszky Péter, a biol. t. kand.
SZBK Enzimológiai Int.
1113 Bp., Karolina út 29.

Tagok

Alkonyi István, a kém. t. kand.
Antoni Ferenc, lev. t.
Boross László, a biol. t. dr.
Dénes Géza, lev. t.
Dévai Márta, a biol. t. dr.
Fonyó Attila, az orvostud. dr.
Gárdos György, a biol. t. dr.
Gráf László, a biol. t. kand.
Guba Ferenc, a biol. t. dr.
Hegyi György, a biol. t. kand.
Hidvégi Egon, a biol. t. dr.
Horváth István, a biol. t. dr.
Jobst Kázmér, az orvostud. dr.
Lengyel Imre, a biol. t. kand.
Mányai Sándor, a biol. t. kand.
Muszbek László, az orvostud. kand.
Németh Csóka Mihály, az orvostud. dr.
Somogyi János, az orvostud. dr.
Szabolcsi Gertrud, r. t.
Szentirmai Attila, a biol. t. dr.
Tanos Béla, az orvostud. kand.
Venetianer Pál, a biol. t. dr.

Botanikai Bizottság

Elnök

Simon Tibor, a biol. t. dr.;
ELTE Növényrendszertani Tansz.;
1088 Bp., Múzeum krt. 4/a

Titkár

Szabó Mária, a biol. t. kand.;
ELTE Növényrendszertani Tansz.;
1088 Bp., Múzeum krt. 4/a

Tagok

Borhidi Attila, a biol. t. dr.
Czimber Gyula, a biol. t. kand.
Dános Béla, a biol. t. kand.
Fekete Gábor, a biol. t. dr.
Jakucs Pál, lev. t.
Kárpáti István, a biol. t. dr.
Kecskés Mihály, a biol. t. dr.

Kovácsné Láng Edit, a biol. t. kand.
ifj. Máthé Imre, a biol. t. kand.
Pócs Tamás, a biol. t. dr.
Précsényi István, a biol. t. dr.
Szodfridt István, a mg. t. kand.
Szujkóné Lacza Júlia, a biol. t. kand.
Terpó András, a biol. t. kand.
Zólyomi Bálint, r. t.

Citológiai és Biológiai Struktúra Bizottság

Elnök

Törő Imre, r. t.;
SOTE II. Anatómiai Int.;
1094 Bp., Tűzoltó u. 58.

Titkár

Gyévai Angéla, a biol. t. kand.;
MTA KOKI;
1083 Bp., Szigony u. 43.

Tagok

Benedetzky István, biol. t. kand.
Fridvalszky Loránd, a biol. t. kand.
Fülöp Zoltán, a biol. t. kand.
Kapp Pál, az állatorvostud. dr.
Kádár Anna, az orvostud. dr.
Kelényi Gábor, az orvostud. dr.
Kondics Lajos, egy. doc.
Kovács János, a biol. t. kand.
Krompecher István, r. t.
Mess Béla, az orvostud. dr.
Zs. Nagy Imre, a biol. t. dr.
Pályi István, a biol. t. kand.
Rappay György, az orvostud. kand.
Röhlich Pál, az orvostud. dr.
Sétáló György, az orvostud. kand.

Genetikai Bizottság

Elnök

Szabó Gábor, lev. t.;
DOTE Biológiai Int.;
4012 Debrecen

Titkár

Orosz László, a biol. t. kand.;
JATE Genetikai Tansz.;
6726 Szeged, Középfasor 52.

Tagok

Alföldi Lajos, a biol. t. dr.
Bálint Andor, a biol. t. dr.
Barabás Zoltán, a mg. t. kand.
Csányi Vilmos, a biol. t. dr.
Cholnoky Eszter tud. oszt. vez.
Dohy János, a mg. t. kand.
Ferenczy Lajos, a biol. t. dr.
Méhes Károly, az orvostud. dr.
Maliga Pál, a biol. t. kand.
Kiss Ibolya, a mg. t. kand.
Papp Zoltán, az orvostud. kand.
Petrányi Győző, az orvostud. dr.
Raskó István a biol. t. kand.
Sik Tibor, a biol. t. kand.
Tigyi András, a biol. t. kand.
Vida Gábor, a biol. t. dr.

Hidrobiológiai Bizottság

Elnök

Berczik Árpád, a biol. t. dr.;
MTA Botanikai Kut. Int.;
2163 Vácrátót

Titkár

Tölg István igazgató;
Temperáltvizű Halszaporító Gazd.;
2440 Százhalombatta

Tagok

Abaffi Jenőné a biol. t. kand.
Biró Péter, a biol. t. kand.
Dévai György, a biol. t. kand.
Entz Béla, a biol. t. kand.
Hajdu Lajos, a biol. t. kand.
Hortobágyi Tibor, a biol. t. dr.
Oláh János, a biol. t. kand.
Szépfalusi József osztályvezető
Soós Árpád, a biol. t. dr.
Tóth László tudományos főmts.
Ponyi Jenő, a biol. t. kand.

Neurobiológiai Bizottság

Biológiai Tud. Osztály és az Orvosi Tud. Osztály közös bizottsága 1980 szeptemberétől. Működteti a Biológiai Tudományok Osztálya

Elnök

Ádám György r. t.;
ELTE Összehasonlító Élettani Tansz.;
1088 Bp., Múzeum krt. 4/a

Titkár

Halász Norbert ig. h.
SZBK Biofizikai Int.;
6701 Szeged, Odesszai krt. 62.

Tagok

Csillik Bertalan, a biol. t. dr.
Fehér Ottó, az orvostud. dr.
Grastyán Endre, az orvostud. dr.
Hámori József, a biol. t. dr.
Karmos György, az orvostud. kand.
Lábos Elemér, a biol. t. kand.
Lissák Kálmán r. t.
Obál Ferenc, az orvostud. dr.
Palkovits Miklós, az orvostud. dr.
Réthelyi Miklós, a biol. t. kand.
Salánki János lev. t.
Székely György, az orvostud. dr.
Tömböl Teréz, az orvostud. dr.
Vizi E. Szilveszter, az orvostud. dr.
Wollemann Mária, az orvostud. dr.

Sport és Mozgásbiológiai Bizottság

A Biológiai Tudományok Osztálya és az Országos Testnevelési és Sporthivatal közös bizottsága 1980 szeptemberétől. Működteti a Biológiai Tudományok Osztálya

Elnök

Antoni Ferenc lev. t.
SOTE I. sz. Kémiai Biokémiai Int.
1088 Bp., Puskin u. 9.

Titkár

Nádori László, a biol. t. kand.
Testnevelési Főiskola
1123 Bp., Alkotás u. 44.

Tagok

Bálint Miklós, a biol. t. kand.
Biró Péterné, a ped. tud. kand.
Eiben Ottó, a biol. t. kand.
Frenkl Róbert, az orvostud. kand.
Guba Ferenc, a biol. t. dr.
Kontra György tud. fmtárs
Kutassi László, a történettud. kand.
Nagy Tamás, az OTSH elnökhelyettese
Nemessuri Mihály, az orvostud. kand.
Pócsik István, a biol. t. kand.
Rókusfalvi Pál, a pszichológiai t. dr.
Szöőr Árpád, a biol. t. kand.
Török Attila, a biol. t. kand.

Természetvédelmi Bizottság

A Biológiai Tudományok Osztálya és az Országos Környezet- és Természetvédelmi Hivatal közös bizottsága. Működteti a Biológiai Tudományok Osztálya 1980 szeptemberétől

Elnök

Balogh János r. t.;
ELTE Állatrendszertani T.;
1088 Bp., Puskin u. 3.

Társelnök

Rakonczay Zoltán, az OKTH általános elnökhelyettese;
Országos Környezet- és Természetvédelmi Hiv.;
1121 Bp., Költő u. 21.

Titkár

Horánszky András, a biol. t. kand.;
ELTE Növényrendszertani T.;
1088 Bp., Múzeum krt. 4/a

Tagok

Berdál Béla főosztályvezető
Bényei Zoltán főosztályvezető
Csapody István
Fadgyas Kálmán, a MÉM Erdőrendezési Szolg. vezetője (Eger)
Gozmány László, a biol. t. kand.
Jánossy Dénes, a föld- és ásványt. dr.
Kemény Bertalan főmérnök
Kovács Margit, a biol. t. dr.
Máté Ferenc, a mg. t. kand.
Milkovits István adjunktus
Nagy Béla mg. tud. dr.
Szabó Lajos főosztályvezető
Thuránszky Zoltán
Tóth János, a biol. t. kand.
Tóth Károly igazgató KNP
Uherkovich Gábor, a biol. t. kand.

Zoológiai Bizottság

Elnök

Kaszab Zoltán r. t.;
Természettudományi Múzeum;
1088 Bp., Baross u. 13.

Titkár

Zicsi András, a biol. t. dr.;
ELTE Állatrendszertani Tansz.;
1088 Bp., Puskin u. 3.

Tagok

Andrássy István, a biol. t. dr.
Balogh János r. t.
Gallé László a biol. t. kand.
Csutorné Bereczky Magdolna, a biol. t. kand.
Holdas Sándor, a mg. t. dr.
Jermy Tibor lev. t.
Matskássy István főoszt. vez. h.
Mahunka Sándor, a biol. t. dr.
Móczár László, a biol. t. dr.
Papp László, a biol. t. kand.
Sey Ottó, a biol. t. kand.
Szalay-Marzsó László, a mg. t. kand.
Vargha Zoltán, a biol. t. kand.

Biológiai Tudománytörténeti Témabizottság

Vezető

Kádár Zoltán, a műv. tört. t. dr.;
1088 Bp., Szentkirályi u. 35.

Titkár

Nagy István Zoltán, a biol. t. kand.;
TTM Őslénytár;
1088 Bp., Múzeum krt. 14.

Tagok

Birtalan Győző, az orvostud. kand.
Frenyó Vilmos, a biol. t. dr.
Juhász Nagy Pál, a biol. t. dokt.
Karasszon Dénes, az állatorvostud. kand.
Katona Ferenc, az orvostud. kand.
Matolcsi János tud. fmtárs
Megyeri János, a biol. t. kand.
Priszter Szaniszló, a biol. t. kand.

AZ OSZTÁLY FOLYÓIRATAINAK SZERKESZTŐ BIZOTTSÁGAI

Acta Biochimica et Biophysica szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Straub F. Brunó r. t.

Szerkesztő

Tigyi József r. t.

Tagok

Bot György, a biol. t. dr.
Damjanovich Sándor, a biol. t. dr.
Elődi Pál, a biol. t. dr.
Farkas Gábor r. t.
Keleti Tamás lev. t.
Rontó Györgyi, a biol. t. dr.
Szabolcsi Gertrud r. t.
Szalay László, a fiz. t. dr.

Acta Biologica szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Salánki János lev. t.

Tagok

Csányi Vilmos, a biol. t. dr.
Dudits Dénes, a biol. t. kand.
Elekes Károly tud. mts.
Flerkó Béla lev. t.
Kovács János, a biol. t. kand.
Krompecher István r. t.
Rappay György, az orvostud. kand.
Szabó Gábor lev. t.
Székely György, az orvostud. dr.
Tigyi András, a biol. t. kand.
Törő Imre r. t.

Acta Botanica szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Jakucs Pál lev. t.

Tagok

Borhidi Attila, a biol. t. dr.
Fekete Gábor, a biol. t. dr.
Hortobágyi Tibor, a biol. t. dr.
Juhász Nagy Pál, a biol. t. dr.

Fridvalszky Loránd, a biol. t. kand.
Máthé Imre r. t.
Pócs Tamás, a biol. t. dr.
Simon Tibor, a biol. t. dr.
Zólyomi Bálint r. t.

Acta Zoologica szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Balogh János r. t.

Tagok

Gozmány László, a biol. t. kand.
Jermy Tibor lev. t.
Kaszab Zoltán r. t.
Mahunka Sándor, a biol. t. dr.
Móczár László, a biol. t. dr.
Soós Árpád, a biol. t. dr.
Szelényi Gusztáv, a biol. t. dr.
Vargha Zoltán, a biol. t. kand.

Biológiai Tudományok Osztálya Közleményei

Szerkesztő

Tigyi József r. t.

Tagok

Alföldi Lajos, a biol. t. dr.
Balogh János r. t.
Farkas Gábor r. t.
Jermy Tibor lev. t.

Technikai szerkesztő

Dézsi László, a biol. t. kand.

Antropológiai Közlemények szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Eiben Ottó, a biol. t. kand.

Tagok

K. Éry Kinga muzeológus
Farkas Gyula, a biol. t. kand.
Lipták Pál, a biol. t. dr.
Horváth László orvos
Nemeskéri János, a biol. t. kand.
Pap Miklós, a biol. t. kand.
Tóth Tibor, a biol. t. dr.

Állattani Közlemények szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Andrássy István, a biol. t. dr.

Tagok

Bognár Sándor egy. tanár
Holdas Sándor, a mg. t. dr.
Keve András, a biol. t. kand.
Kovács János, a biol. t. kand.
Ponyi Jenő, a biol. t. kand.

„Biológia" szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Csaba György, az orvostud. dr.

Tagok

Balázs András a biol. t. dr.
Csányi Vilmos, a biol. t. dr.
Faragó Anna, az orvostud. kand.
Gánti Tibor, a biol. t. kand.
Hegyi György, a biol. t. kand.
Kiszely György, az orvostud. kand.
Komáromi László, a biol. t. kand.
Vida Gábor, a biol. t. dr.

Botanikai Közlemények szerkesztő bizottsága

Szerkesztő

Fekete Gábor, a biol. t. dr.

Szerkesztő

Zsoldos Ferenc, a biol. t. kand.

Tagok

Dános Béla, a biol. t. kand.
Isépy István tud. mts.
Kovácsné Láng Edit, a biol. t. kand.
Maróti Mihály, a biol. t. dr.
Priszter Szaniszló, a biol. t. kand.
Sárkány Sándor, a biol. t. dr.
Szujkóné Lacza Júlia, a biol. t. kand.
Vágújfalvi Dezső, a biol. t. kand.

B I O L Ó G I A I L E X I K O N

A legkorszerűbb tudomány

legkorszerűbb lexikona

a négykötetes

BIOLÓGIAI LEXIKON

A biológia hagyományos ágai mellett olyan diszciplínákat is felölel, mint pl.

az űrbiológia
a biometria
a genetika
a molekuláris biológia
a biokibernetika
a biokémia

Főszerkesztő: **Straub F. Brunó**

1. köt. A—F. Kve 165,— Ft
2. köt. G—L. Kve 135,— Ft
3. köt. M—R. Kve 132,— Ft
4. köt. S—Z. Kve 130,— Ft

AKADÉMIAI KIADÓ
BUDAPEST

AZ AKADÉMIAI KIADÓ
GONDOZÁSÁBAN JELENT MEG

BIOFIZIKA

Szerkesztette:
ERNST JENŐ

„Ahogy rég elvesztette hitelét naprendszerünkkel kapcsolatban mindenféle természettudományon kívüli szemlélet, éppen úgy végleg ki kell küszöbölni mindenféle célszerűségi magyarázkodást az életjelenségekkel kapcsolatban. Ezzel szemben alapvető jelentőséget nyer a Földünkön kibontakozó élet automatizmusának kérdése."

(Részlet a könyv előszavából)

533 oldal • Kötve 97,— Ft

AKADÉMIAI KIADÓ
Budapest

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója. Műszaki szerkesztő: Marton Andor
A kézirat nyomdába érkezett: 1980. X. 23. — Terjedelem: 19,95 (A/5) ív
81.8878 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

50,— Ft

ISSN 0025—0333

TARTALOM

Tigyi József: A Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Tudományok Osztálya 1980. évi közgyűlési beszámolója 257
Hozzászólások 265

A MATEMATIKAI ÉS FIZIKAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK, AZ ORVOSI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK VALAMINT A BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

EGYÜTTES TUDOMÁNYOS ÜLÉSE
1980. május 7—8.

ÚJ VONÁSOK A BIOFIZIKÁBAN

Az előadások programja 273
Tarján Imre: Megnyitó 274
Straub F. Brunó: Biológiai makromolekulák szerkezete és funkciója 275
Závodszky Péter: Az immunglobulin — különböző tevékenységek összehangolása egy makromolekulában 289
Cser László: Az immunglobulinok konformációjának vizsgálata 309
Damjanovich Sándor, Somogyi Béla és *Trón Lajos:* A fehérje matrix dinamikája és az enzimfunkció közötti kapcsolat 319
Venetianer Pál: Génműködés és nukleinsavszerkezet 327
Rontó Györgyi: Pontszerű sérülések fágokban 337
Keszthelyi Lajos: Membránhoz kötött fehérjék működése 347
Györgyi Sándor: Szerkezeti átalakulások lipidmembránokban 379
Salánki János: Az idegsejt elektromos aktivitása 389
Fehér Ottó: Tanulás az idegsejt szintjén 403
Lábos Elemér: Neuronális rendszerek analízise és szintézise 421
Zimányi József: Neuronhálózatok önszerveződésének egy matematikai modellje 429
Vámos Tibor: A mesterséges és természetes intelligencia 441
Tigyi József: Távlati lehetőségek 445
Berényi Dénes: Elektronspektroszkópia: Új lehetőségek a biológiai-orvosi problémák kutatására 453
Kapuy Ede: Kvantumkémiai módszerek 463
Szlávik Ferenc: Számítógépes kardiológiai módszerek 471
Hírek 479

Megjelent 1981. VII. 20.

Index: 26.496