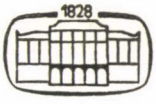
A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI
TIGYI JÓZSEF

XXIV. KÖTET 1—2. SZÁM



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST
1981

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 100,— 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 XXIV. 1—4. SZÁMÁNAK TARTALOMJEGYZÉKE

Megemlékezés 1

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ ELŐADÁSOK

Kaszab Zoltán: Az arid területek faunatörténete 5
Szabolcsi Gertrud: Enzimszerkezet, enzimek lokalizációja 19
Ádám György: Belső szervi működések nagyagyi ellenőrzése 35

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

Löffler Heinz: Adatok az osztrák tavak kialakulásához 49
Daubner Imrich: Dunai vízlépcsők létesítésének biológiai aspektusai 57
Jakucs Pál, Kovács Margit, L. Mészáros Ilona, B. Papp László, Cs. Szabó Mária és *Tóth János Attila:* Tendenciák a „Síkfőkút Project" erdő-ökoszisztéma elem-mozgásaiban 67
Ábrahám Ambrus: Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok a mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szívének elsődleges ingertermelő központján 87
Somogyi Béla, Matkó János és *Papp Sándor:* Fluoreszcencia-spektroszkópiás módszerek alkalmazása biológiai rendszerek vizsgálatában: Förster típusú energiatranszfer 109
Bánfalvi Gáspár, Csuzi Sándor és *Antoni Ferenc:* A bakteriális rekombináció enzimei 129
Kádas Lajos: A nitrát táplálkozásélettani jelentősége zöldségfélékben és termékeiben a methemoglobinémia veszélye szempontjából 143
Kövér György: A proximális tubulus működése 153
Györgyi Sándor: Modellmembránok a membránműködés vizsgálatában 173
Sugár István: Külső tényezők hatása a foszfolipid membránok szerkezetére 177
Báthori György, Holly Sándor, Grandics Péter és *Náray Anikó:* Szerkezet- és funkcióvizsgálatok lipid vezikulákon 187
Szabon János és Tölgyesi Ferenc: Lipid-víz diszperziók fázisátalakulásának vizsgálata termo-depolarizációs analízissel (TDA) 195
Szőgyi Mária, Cserháti Tibor és *Szabon János:* Membránműködést befolyásoló anyagok vizsgálata mesterséges membránon 201
Cserháti Tibor, Szőgyi Mária és *Kanyár Béla:* Kromatográfiás módszerek alkalmazása a membrán-biokémiában 209
Blaskó Katalin: Primycin hatása membránok alkáli kation transzportjára 219
Zsoldos Ferenc: Gyökér iontranszport változások környezeti stresszhatásokra 227
Erdei László: Szenzitivitás és rezisztencia: iontranszport és ATPáz aktivitás sótűrő növényekben 239
Cseh Edit és *Bujtás Klára:* Környezetszennyezés: nyomelem — toxicitás 247
Maderspach Katalin: Neuron és glia sejtek fejlődő tenyészeteiben tapasztalt változások a a membránban elhelyezkedő adenilcikláz enzimnél és béta-receptornál 259
Mészáros István: A foszfolipázok biológiai és patológiai szerepe 267

Tigyi József: Az MTA Biológiai Tudományok Osztályának beszámolója 281
Hozzászólások 293

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK TUDOMÁNYOS ÜLÉSE
1981. ÁPRILIS 22.

Alföldi Lajos: Megnyitó 313
Venetianer Pál: Modern nukleinsavkutatási módszerek felhasználása az alapkutatásban és a gyakorlatban 317
Gausz János: Genom szerveződés *Drosophila melanogaster*ben 325
Maliga Pál: Kloroplasztisz átvitel dohány protoplaszt fúzióval 335
Kondorosi Ádám: A szimbiotikus nitrogénkötés molekuláris genetikája 341
Ormos Pál: Bakteriorodopszin: egy egyszerű proton pumpa 351
Faludi-Dániel Ágnes: A fotoszintetikus pigmentek szerveződése a kloroplasztisz fénybegyűjtő és antennakomplexében 371
Farkas Tibor, Vigh László és *Horváth Ibolya:* Biológiai membránok szerepe a hőmérséklet adaptációs folyamatokban. A növények hidegtűrésének problémái 377

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

Oláh János, M. A. Abdel Moneim és *Tóth László:* Nitrogénkötés a Balaton, víztároló és halastavak üledékében 395
Ábrahám Ambrus: Összehasonlító fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok neuroszekréciós sejteken 433
Trón Lajos és *Damjanovich Sándor:* Membránfehérjék rotációs és laterális mobilitása 451
Gáspár Rezső, ifj.: NMR relaxáció és a fehérjék belső dinamikája 463

MEGEMLÉKEZÉS



ERNST JENŐ
1895–1981

1981. február 27-én Pécsett elhunyt Ernst Jenő akadémikus, a magyar és a nemzetközi biofizika kiemelkedő tudósa. 1895. ápr. 16-án Baján született, szegénysorsú, kereskedősegéd család 8. gyermekeként. Kivételes tehetsége a matematika és a természettudományok iránt már kora gyermekkorában kitűnt. 1913-ban a bajai gimnáziumban érettségizett és utána a Budapesti Egyetem orvosi fakultására iratkozott be, de harcos egyéniségére jellemzően II. éves orvostanhallgató korában önként jelentkezett katonának. 1915-ben orosz hadifogságba esett és 5 éven keresztül hadifogolyként élt; először szimpatizáns szemlélője, majd egyre aktívabb résztvevője lett a bolsevik párt harcainak. Tulajdonképpen ezekben az években kötelezte el magát egy életre a kommunista eszmékkel és mozgalommal. 1923-ban a Pécsi Tudományegyetemen szerzett orvosi diplomát és azonnal meghívást kapott a Mansfeld Géza professzor által vezetett Gyógyszertani Intézetbe, ahol megkezdte a fogság éveiben kiérlelt elgondolásai szerint rendkívül eredeti tudományos munkáját, az életműködések biofizikai törvényszerűségeinek kutatása területén. Első tudományos problémája az izom működés alatti térfogatváltozásának vizsgálata volt. Nagyon egyszerű és eredeti módszerrel megállapította, hogy az izom rövidülésekor törvényszerűen $5 \cdot 10^{-5}$ nagyságrendű térfogatcsökkenés mérhető, mely minden izomműködésnél karakterisztikusan fellép. A később Ernst-effektusnak nevezett jelenség értelmezése körül nagy vitába keveredett az akkor már világhírű, Nobel-díjas O. Mayerhoffal, aki a térfogatváltozási

effektust a tejsav-theoria bizonyítására próbálta felhasználni. A több évig tartó magas szintű vita során, mely a Pflüger's Archiv-ban folyt, Ernst Jenőnek sikerült javítani a berendezések időbeli felbontását és kétséget kizáróan bizonyítania, hogy a jelenség az ingerületi folyamattal függ össze. Véleménye szerint semmi esetre sem függhet össze a tejsavtermeléssel, hanem az ingerület alatt keletkező K-ionok elektrostrictios effektusa. A vita végül is 1933 körül Ernst teljes győzelmével záródott le.

1928-ban magántanári képesítést szerzett „Az életműködések fizikai elemei" című értekezésével. 1930-tól az Orvosi Fizikai Intézetben Rhorer László professzornál folytatta tudományos munkáját. 1935-ben c. rendkívüli tanári címet kapott. A 30-as évek elején nemzetközileg az egyik legelismertebb magyar biológus kutatóként tartották számon, elsősorban az izomműködés és a folyadéktranszport kutatásában elért eredményei alapján. Megalkuvást nem tűrő egyéniségére jellemző, hogy — ha az akkori rendszer által követelt kompromisszumokat teljesíti — egyetemi katedrát is felkínáltak neki, de ő 1945-ig megmaradt fizetéstelen tanársegédi állásban. Külföldi kollégái, akik nagy érdeklődéssel olvasták, alkalmazták, vagy vitatkoztak eredeti tudományos eredményeivel, nem is sejtették, hogy mindezeket a ragyogó eredményeket Ernst Jenő rendkívül mostoha körülmények között — sokszor a mindennapi létfenntartás elemi gondjaival küzdve —, szerény laboratóriumában 2—3 lelkes és tehetséges orvostanhallgató tanítványával együtt dolgozva teremti meg. A fasizmus következményeként 1939-ben még a fizetéstelen tanársegédi állását is elvették tőle. Akkor a már Nobel-díjas Szent-Györgyi Albert hívja meg szegedi laboratóriumába, hiszen ő éppen akkortájt tervezte, hogy áttér az izom biokémiájának vizsgálatára. Ernst Jenőnek így jelentős szerepe lett az azóta világhírűvé vált, Szent-Györgyi izomkutatási iskola elindulásában.

A II. világháború utolsó éveiben munkaszolgálatra kényszerítve nem tudta folytatni kísérletes munkáját, de csodálattal mesélik bajtársai, hogy a legmostohább külső körülmények sem akadályozták meg abban, hogy elméleti tudományos munkálkodását ne folytassa.

Az 1944-es felszabadulás idején szökött és halálra keresett munkaszolgálatos volt. Egyéni problémáival mit sem törődve azonnal hozzálátott a magyar értelmiség, a magyar tudományos élet újjászervezéséhez. 1945-ben számos magyar vezető értelmiségivel együtt belépett a Magyar Kommunista Pártba. Hatalmas lendülettel és rendszerességgel szervezte az idő tájt a magyar értelmiség szocialista irányba való átalakítását városi, megyei és országos szinten. Jelentős szerepet játszott a MTA átszervezésében és a hazai tudományos kutatóhálózat kialakításában. 1946-ban választották az Akadémia rendes tagjává.

1945-től 1972-ig vezette a Pécsi Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézetét, melyet mindjárt működése elején szervezett át orvosi fizikából biofizikává, megelőzve ezzel számos fejlett nagy országot. Az 50-es évek elején

kialakította a Pécsi Biofizikai Kutatóiskolát, megszervezve az MTA Biofizikai Tanszéki Kutatócsoportját is, mely a magyar biofizika kifejlesztésének bázisa lett.

Ő szervezte meg 1961-ben a Magyar Biofizikai Társaságot, melynek első elnöke, majd tiszteletbeli elnöke lett.

1961-ben jelentős szerepe volt a Nemzetközi Biofizikai Unió létrehozásában, két periódusban e szervezet tanácsának tagja volt. Létrehozásától betöltötte az MTA Biofizikai Szakbizottságának elnöki tisztét. E testületnek is nagy szerepe volt és van a magyar biofizikai tudomány létrehozásában és irányításában.

Megindulása óta egyik főszerkesztője az MTA Acta Biochimica et Biophysica című folyóiratnak.

3 éven át volt a MTA Biológiai Csoportjának titkára. A Biológiai Osztály megszervezésében kiemelkedő érdemei vannak.

Tudományos és politikai szervező munkája mellett sohasem hagyta el a laboratóriumát és élete végéig kitartó, rendszeres tudományos munkás maradt. Bár évtizedeken át a Pécsi Orvostud. Egyetem szellemi irányítója volt, sem rektori, sem dékáni funkciót sohasem vállalt.

Tudományos munkásságának legfontosabb területe az izomműködés kapcsán, az élő anyagban fellépő fizikai jelenségek elemzése. Az izomműködés biofizikájának számos területén végzett úttörő és maradandó eredményű vizsgálatokat: a térfogatcsökkenés és ingerület összefüggése, a K—Na-csere, a kötött víz és kötött K kérdésében, a mechanikus feszülés és polymer kristályosodás mechanizmusának felderítésével, az ingerület félvezető hipotézisének kidolgozásával. Munkásságának másik jelentős területe a transzportfolyamatok fizikai alapjainak, a víztranszport törvényszerűségeinek és a thermoozmózis és thermodiffúzió biológiai szerepének kidolgozása.

Tudományos munkásságát 3 monográfiában és 200 tudományos dolgozatban publikálta. Biofizika tankönyve 3 kiadást ért meg és generációk tanulták belőle a modern biofizika alapjait.

Tudományos, tudományszervező és politikai munkáját a Magyar Népköztársaság Kormánya nagyra értékelte; 1948-ban Kossuth-díjjal, 1953-ban és 1955-ben a Munka Érdemrend arany fokozatával, 1956-ban a Kossuth-díj II. fokozatával, 1965-ben Semmelweis Emlékéremmel, 1970-ben újra a Munka Érdemrend arany fokozatával és Felszabadulási Jubileumi Emlékéremmel tüntették ki. 1971-ben megkapta a Pécsi Orvostudományi Egyetem Pro Universitate Emlékérmének arany fokozatát. Ugyancsak 1971-ben az MTA elnöksége neki adományozta az 1971. évi Akadémiai Aranyérmet, kiemelkedő tudományos és oktató munkájának elismeréséül. 1975-ben a Munka Vörös Zászló Érdemrendjét kapta és 1980-ban a Pécsi Orvostudományi Egyetem díszdoktorává avatta.

Ernst Jenő kivételes emberi tulajdonságokkal rendelkezett. Nem mindenki tudja róla, hogy egész életét a laboratóriumában levő szerény, szerzetesi cellához hasonló, szobájában élte le, legendás egyszerűségben. Még 86 éves korában is naponta fél ötkor kelt és szigorú rendszerességgel megszabott napirendje szerint dolgozott, tanult, alkotott szakadatlanul. Legszigorúbb saját magához volt, de ennek megfelelően magas mércét követelt meg munkatársaitól is. Szókimondása, fejlett kritikai érzéke, felhalmozott erkölcsi tőkéjének tudata, meggyőződése életcéljának helyességében olyan kivételesen határozott belső tartást adott számára, mely joggal tette őt a magyar tudományos élet egyik legmarkánsabb egyéniségévé. Ernst Jenő mindig kemény, határozott harcos ember volt, környezetében mindig valami különös szellemi feszültség vibrált, de tudott megfontolt, higgadt bölcsként is viselkedni. Éleslátásával, fejlett igazságérzetével töltött tanácsai mindannyiunk számára igen fontos segítséget jelentettek. Életének egyik fő jellemvonása a tudományos tények prioritásának megőrzését célzó harc volt, az áltudomány és látszattudomány ellen. Ezirányú tételeit foglalta össze pár héttel elhunyta előtt befejezett könyvében, a „Facts and texts" (Tények és szövegek) című munkájában.

A tudományos kutatásról vallott elveit talán az első tankönyvéből vett idézet foglalja össze legtömörebben: „Az egyenes, tiszta tapasztalaton alapuló és elfogulatlanul következtető emberi értelem az eredményes — a fogalmakkal labdázó szellemi működés, bármilyen tetszetős légvárat épít is, a történelem tanítása szerint csak meddő szószaporításnak bizonyult . . ."

Ernst Jenő halálával a magyar tudományos élet igen eredeti, színes, nagy egyéniségét, a magyar biofizika élő klasszikusának elvesztését gyászoljuk.

TIGYI JÓZSEF

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ ELŐADÁSOK

AZ ARID TERÜLETEK FAUNATÖRTÉNETE*

KASZAB ZOLTÁN

Természettudományi Múzeum, Budapest

Sok országban központi kérdés ma a területeket borító szavannák, pusztaságok, sivatagok ariditásának fokozódása és a sivatagi övezet állandó térnyerése. Még napilapjainknak is állandó témája az elsivatagosodás, ennek következményei, az amúgy is kezdetleges mezőgazdasági termelés visszaesése, az állatállomány pusztulása és az éhhalál. A kérdést globális kiterjedésében kell vizsgálni, mert a Földön lejátszódó természeti folyamatok rendkívül összetettek, megértésükhöz, helyes interpretációhoz csak más tudományterületeken elért modern kutatások eredményeinek felhasználásával jutunk előre. Legfontosabbak ezek között a geológia, paleoklimatológia, paleontológia, ökológia, származástan, genetika, faunisztika, biogeográfia, rendszertan stb. által nyújtott ismeretanyag.

Kiindulási alapként el kell fogadnunk, hogy Földünk ma élő állatvilága keresztmetszete egy fejlődési szintnek, amelyet ez az élővilág sokmillió éves fejlődés során a legkülönfélébb utakat bejárva és különböző időtartam alatt ért el. Minden ide tartozó vizsgálat alapja a faunisztikai és rendszertani kutatás. Ebbe természetesen a kihalt állatok tanulmányozása is beleértendő. A filogenetikai összefüggések értékeléséhez szorosan kapcsolódik a leíró állatföldrajz és az egyes faunaegyütteseket globális szinten feltáró biogeográfia, valamint az életközösségeket alkotó populációk ökológiai vizsgálata. Az így nyert eredményeket térben és időben, a földtörténet fejlődési szakaszaival kell összhangba hozni.

Ez utóbbi téren van a legnagyobb bizonytalanság. A szinkronizációs kísérletekben igen sok az ellentmondás, ami az ismereteink hiányosságait jelzi; világhírű kutatók is, olykor ugyanazokat a jelenségeket eltérő, sokszor homlok egyenest ellenkező módon magyarázzák. A másik nehézséget a paleontológiai leletek hiánya vagy hiányossága okozza; legkirívóbb a szilárd vázzal nem rendelkező gerincteleneké és rovaroké. A kihalt rovarfajok száma pl. sokszorosa lehet a ma élő mintegy másfél millió fajnak, ezzel szemben alig ismerünk néhány ezret, azok többsége is az oligocén borostyánkőből került elő; ez pedig már modern fauna. Nemzetségei, sőt olykor még fajai is, többnyire trópusainkon, ma is élnek.

* Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémián 1980. március 27-én

Annak ellenére, hogy sok bizonytalansággal kell számolnunk, az elmúlt néhány évtizedben felmérhetetlenül sokat fejlődött az a tudományos alap, amire a faunatörténet épülhet. Új módszereket vezettek be, mint a C^{14}, az O^{18} és O^{16}, az U-Tho és K-Ar, Rb-Sr és nem utolsósorban a paleomágnesesség. Bár ezek a módszerek is csak bizonyos hibahatárral és nem mindenütt használhatók, sőt olykor ellentmondó adatokat is szolgáltatnak, mégis forradalmasították az erre épülő tudományterületeket. Sokat fejlődött módszereiben a paleoklimatológia, a glaciológia. A biogeográfiára valamennyi között legnagyobb hatást a WEGENER-féle „kontinens vándorlás" elmélete, ill. lemeztektonikai beigazolása jelentette. Ennek eredményei még annyira újak, hogy alkalmazásuk messze nincs kiaknázva minden szakterületen.

Még napilapjaink is megemlékeztek WEGENER születésének 100 éves évfordulójáról. Most 50 éve, hogy Grönlandon, utolsó kutatóútján nyoma veszett. A Pangea, valamint a kontinensek elúszásának és mai elrendeződésének elmélete sok zoogeográfus képzeletét ragadta meg és számos olyan elterjedési típusra adtak magyarázatot, melyet korábban mindenféle földhidak feltételezésével kívántak megoldani. Lásd IHERING elméletét Lemuriáról, Archatlantisról, Archhelenisről, Archiboreisről stb. WEGENER általánosan ismert elméletének legnagyobb hiányossága az volt, hogy nem tudta bizonyítani az erőt, ami a kontinensek elsodródásához vezetett. Erre a kérdésre egyértelműen csak a lemeztektonikai elmélet megalkotása válaszolt. Ez az elmélet ma már széles körben elfogadott, bár még vannak ellenzői. A kontinensek egymástól való elszakadásának sorrendjére vonatkozóan is meglehetősen egységesek a nézetek, de kronológiájukban még sok a vitás pont.

Bármiféle képen képzeljük el a Föld őskorát, azon a pólusok és az egyenlítő elhelyezkedése alapján, valamint az orográfiai viszonyoknak megfelelően már kezdetben ki kellett alakulnia különböző típusú klimatikus övek-nek. Amint az élővilág a szárazföldön megjelent, a szárazulat klímája, orográfiai viszonyai, a geológiai felépítése és talajviszonyai meghatározók lehettek mind a növény, mind az állatvilág fejlődéstörténetében. A sivatagi klíma jelenléte is kétségtelen, amit bizonyítanak a konyhasó, kálisó és gipsztelepek. Ez az övezet a földtörténet során az északi félgömbön jól kimutathatóan tolódott el fokozatosan a mai mérsékelt és mediterrán övezet területére, és a pleisztocénben kb. megfelel annak az övezetnek, ahol ma az arid zóna a Holarktiszban elhelyezkedik. A kontinensek fokozatos elúszásával, ill. rotációjával, szétválásukkal kapcsolatban megindult hegyképződés, az ezekkel járó globális klimatikai változások, a tengeráramlások, az északi és déli féltekén hatalmas kiterjedésű horizontális, ill. vertikális elhelyezkedésű sivatagokat hoztak létre. Az állandóan változó, hosszabb-rövidebb ideig tartó pluviális és arid szakaszokban ezek lokális elhelyezkedése, az ariditás mértéke nagyfokú ingadozásnak, változásoknak volt kitéve.

A Föld szárazföldi ökoszisztémáinak biomjait, nem számítva a még

nagymértékben ismeretlen asztrológiai kutatásokat, a csapadék mennyiségén és időbeli eloszlásán kívül alapvetően meghatározza az egyenlítőhöz, ill. a sarkokhoz viszonyított helyzete, a hegyvonulatok iránya, a tengerszint feletti magasság, az uralkodó szélirány és a tengeráramlatok.

Ökológiai értelemben véve az arid területek rendkívül szélsőséges életterek, amelyeken csak e szélsőségeket tűrő életformák maradhatnak fenn. Ahol élet egyáltalán lehetséges, nem egyes fajok állnak szemben egymással, hanem organizmusok életközösségei, amelyek egymást kölcsönösen befolyásolják, sőt egymás létezését kölcsönösen feltételezik. A természetes társulásoknak jellegzetes faji összetétele van, amelyek mennyisége is szabályozott. Nemcsak az élőhely van hatással az életközösségre, hanem az életközösség is hat a biotópra, a kettő együtt elválaszthatatlan egységet, az ökoszisztémát képezi. Mennél szélsőségesebb környezeti tényezők között él egy életközösség, annál fajszegényebb az, s bármely faj kiesésével az ökológiai egyensúly felbomolhat, mivel a kieső szervezetek szerepe nehezen helyettesíthető. A környezeti tényezők megbomlásával az ökoszisztéma leggyengébb tagjai esnek ki először. A helyükre lépők között azok maradnak meg, amelyek az adott életközösségben a legjobban tudnak alkalmazkodni, ill. beilleszkedni. A sivatag mint környezet és mint ökoszisztéma egyaránt rendkívül érzékeny, könnyen sebezhető és különösen emberi környezeti hatásokra azonnal reagál.

A sivatagi ökoszisztéma, mivel viszonylag egyszerű és az életközösségeinek, fajpopulációinak létét viszonylag kevés tényező befolyásolja, ideális modell ökológiai vizsgálatokra.

Majd minden állatcsoportban találunk a szélsőséges sivatagi viszonyokat eltűrő vagy speciálisan alkalmazkodott formákat. A faunatörténetet azonban leghűbben a talajfauna tagjai, ezek között is a rovarok őrizték meg. Az arid övezet talajfaunájában az egész világon, egy bogárcsalád, a *Tenebrionidae* játssza a főszerepet. Mivel ezek arid talajlakó fajai nagyrészt még szárnyatlanok is, mind állatföldrajzi, mind faunagenetikai kiértékelésre igen alkalmasak. Jelentőségét fokozza az is, hogy az arboreális ökoszisztémákban is mindenütt jelen vannak. Az eddig leírt mintegy 20 000 faj magasabb taxonómiai egységei jól tükrözik az elmúlt geológiai-klimatikai változásokat és a „continental drift" sokmillió éves történéseit.

Eleve természetes, hogy az arid területek szárnyatlan Tenebrionidáinak elődeit a szárnyas, arboreális formák közt kell keresni. Ezek között ősmaradványok is ismeretesek, mégpedig az első, kétségtelenül a Tenebrionidákhoz tartozó ősök az ausztráliai triaszból kerültek elő, de joggal feltételezhetjük, hogy kialakulásuk a permben már végbement. A jura és a kréta leletekben nagyon szegény, ezért csak a triasz jelent számottevően újat; ezek már rendszertani értékelés számára is alkalmasak. A paleocén leleteket még csak magasabb szupragenerikus rendszertani kategóriák szerint lehet besorolni a

Tenebrionidák közé, ezzel szemben az oligocén borostyánkő-zárványok már modern nemzetségek.

Az alsóperm vörösfekü képződésének időszakában, amely keletkezését száraz, sivatagos klímának köszönheti, megkezdődött a növényi hulladékon élő Blattidák lassú regressziója. Helyüket az ökoszisztémában a hasonló életmódú, de fejlettebb Tenebrionidák veszik át, amelyek rendkívüli morfológiai változatosságukkal és adaptációs képességükkel alkalmasak az arid vagy sivatagi fülkék (nicheé) benépesítésére. Ez az az időszak, amikor a Tenebrionida törzs, kialakulása kezdetén, a család legfontosabb bélyegeit megtartva, különválik egy arid talajlakó és egy arboricol vonalra. Az arid vonal alcsalád és tribus szintű teljes szétválásának a paleocén folyamán meg kellett történnie, mert a rendkívül specializált szárnyatlan formáik előfordulását a különböző kontinenseken másként nem lehet megmagyarázni. Ezek későbbi transzgressziója sem aktív, sem passzív terjeszkedéssel nem magyarázható meg.

Az arid talajlakó fauna az egyes kontinenseken ma rendkívül változatos képet mutat. Legősibb formáik az ún. *Tentyrioid Tenebrionidae* alcsaládba tartoznak, amelyek igen különböző arányszámban, de valamennyi kontinensen előfordulnak. Ausztráliában azonban mindössze 2 olyan tribus van, melyek Amerikában, Ázsiában és Afrikában is elterjedtek. Ausztráliában ezek az arid Tenebrionida fauna legősibb reliktum elemei. Különösen jellemző a *Zopherini* tribus elterjedése. Ausztráliában egyetlen monotipikus faja él. Nyugat-Afrikában egy nem 3 faját ismerjük, rokonsága délamerikai; a palearktikus Ázsiában is egy nem 3 faját találjuk, e nem további fajai kaliforniaiak; a csoport többi faja, mintegy 50, nagyrészt a középamerikai és nyugatamerikai hegyvidék xerophil faunájához tartozik. Ez a csoport Pangea eredetű reliktum.

Az igazi *Tentyriinae* alcsaládban mindössze egyetlen tribus van, amely szárnyas formákat is megőrzött, s fajai az eremiálban élnek, nevezetesen az *Epitragini*. Elterjedésüknek és fejlődéstörténetüknek 2 ősi központja van: Az egyik Dél-Afrika, a másik Dél-Amerika. Jelenlétük az ázsiai sivatagokon, valamint a Szaharában és Arábiában csak sokkal későbbi időszakra, a miocén végére tehető. A *Tentyriinae* alcsalád többi tribusa mind Afrikában, mind Amerikában külön-külön differenciálódott nemzetségekre; ezek között találunk olyanokat, amelyek testvércsoportoknak, Hennig kifejezésével „Schwestergruppe" tekinthetők, mint pl. a jellegzetesen afrikai *Molurini* és a délamerikai kontinens arid övezetében és hegyvidékein ugyancsak jellegzetes *Nycteliini*. Más elterjedési típust képvisel az *Asidini* nemzetség, amely ma reliktum areákban Észak- és Közép-Amerikában, Dél-Amerikában, a Mediterráneum nyugati felében és Dél-Afrikában, valamint Madagaszkáron fordul elő. Ez az elterjedési típus még más Tenebrionida nemzetségekben is megtalálható. A Palearktikum zonális arid övezetének talajfaunájában igen nagy szerepet játszanak a *Tentyriini* nemzetség nemei. Ezek ősi laurázsiai elemek, kialakulásuk központja a

Tethys, ill. a Mediterráneum, amelynek környezete az egész földtörténet során az arid fauna kialakulásában döntő fontosságú. Ugyanennek a nemzetségnek van egy délafrikai—madagaszkári központja is. A csoportok közötti távoli rokonság azonban arra utal, hogy kapcsolatuk nagyon régen megszakadt, mindkét fauna önállóan fejlődött tovább.

A Tenebrionidák másik alcsaládjában, a *Tenebrioid Tenebrionidae*ban is vannak az arid körülményekhez alkalmazkodott nemzetségek, még a Pangea szakaszra visszavezethető csoportok is. Ezek egy része kifejezetten laurázsiai, mások Gondvana elemek, s vannak közöttük közös ősre visszavezethető csoportok, melyek az Újvilágban és az Óvilágban külön-külön nemzetségek kialakulásához vezettek. Így a laurázsiai formák közül a palearktikus *Blaptini* nemzetségnek Észak-Amerika hasonló övezetében az *Eleodini* nemzetség felel meg. A mediterrán és délafrikai *Scaurini* nemzetségnek a délamerikai *Scotobiini* a „testvérnemzetsége". A ma jelentős fajszámú és a talajfaunában, az arid területeket jellemző csoportok önállóan is kialakultak, mint pl. a tágabb értelemben vett mediterrán *Erodiini* és *Akidini*, valamint a fajgazdag *Pimeliini*, továbbá az afrikai eredetű *Adesmiini*, *Eurychorini*. Az ausztráliai sivatagi fauna nagyon ősi arboreális elemekből vezethető le. Legtöbbjük igen fajgazdag nemeknek az arid környezethez alkalmazkodott endemikus tagja.

Az arid területek faunájáról elfogadható szintézist csak világanyag tanulmányozásával lehet készíteni. Ezzel kapcsolatban sikerült biztos alapot teremteni azzal, hogy szinte valamennyi nagy sivatagi és trópusi arboreális faunát tanulmányoztam. A világ arid területeiről az utóbbi években óriási anyag gyűlt össze, melyek tudományos feldolgozásában és kiértékelésében 40 éve veszek részt. Jelentős sivatagi területeken, mint pl. a Góbi, Afganisztán, az arábiai félsziget, Szomália stb. csak a II. világháborút követő évtizedekben vagy napjainkban nyílt meg a kutatás lehetősége. Sok tapasztalatra tettem szert magam is a Magyar Tudományos Akadémia által támogatott 6 mongóliai expedícióm során, amikor a Góbi-sivatagot jártam be. Több arid területről elsőként közöltem összefoglaló adatokat. A számok önmagukért beszélnek. Kutatásaim előtt pl. Mongóliából mintegy 30 Tenebrionida volt ismeretes. Máig több mint 180 fajt ismertettem. Afganisztánból az 50-es évekig mindössze 36 fajt tartottunk nyilván, de az új kutatások több mint 400 fajt eredményeztek. Az arábiai félsziget Tenebrionidáinak kiértékelését most végeztem el; mind ez ideig csak szórvány adatokkal rendelkeztünk, elsősorban a tengerpart közeli területekről. A félsziget belsejének sivatagi faunáját szinte alig ismertük. Ma már közel 300 fajról tudunk.

Az egyes sivatagok faunájában igen sok a közös vonás; a világ különböző területein a hasonló fülkék életközösségeit hasonló életmódú fajok alkotják. Ugyanakkor azonban igen nagy a d i v e r z i t á s. Ez abban jelentkezik, hogy a sivatag növényzete, a talaj borítása, minősége, a domborzat, a sivatag kora és kialakulása, a helyi klíma hallatlan változatossá teszi a sivatagi biomot.

A biotópok, bár olykor hatalmas kiterjedésűek, mégis elszigeteltek egymástól, a fajok populációi is mozaikszerűen helyezkednek el az areában, ez az elszigeteltség könnyen vezet a talajlakó szárnyatlan fajok esetében alfaji vagy faji szintű morfológiai változáshoz. Magam is jutottam ilyen eredményekhez a mongóliai Nagytavak, ill. az Altáj hegység és a Hangáj közt elhelyezkedő medencesor faunájának kutatásakor, vagy a nyugatnepáli és kasmiri arid magashegyi Tenebrionida anyag vizsgálatakor. Ezeknek a fajoknak, alfajoknak a kora, geológiai értelemben, rendszerint nagyon fiatal, hiszen a jelenkori viszonyokat létrehozó klimatológiai és orográfiai tényezők is azok.

Egy rövid előadás keretében sajnos nincs arra lehetőség, hogy a földkerekség valamennyi arid területének faunatörténetét külön-külön elemezzem, meg kell elégednem néhány részlet ismertetésével.

Az Atlanti-óceántól Indiáig és a Mediterráneumtól a Csendes-óceánig, egy csaknem összefüggő széles sivatagi övezet húzódik. Földtörténeti kialakulását a kontinensek régi összefüggésének és későbbi sodródásának tükrében kell vizsgálnunk.

Afrika a Pangea időszakában sokkal délebbre helyezkedett el mint ma. Paleoklimatológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az Eokambriumban 500 millió évvel ezelőtt a Szahara mai területén hatalmas jégsapka volt, kiterjedt gleccserekkel. Ennek azonban az afrikai szárazföldi állatvilág mai kialakulására még nem volt hatása. A triasz-jura fordulóján, 180 millió évvel ezelőtt az egyenlítő Afrikában a mai Libéria—Szuez vonalán húzódott. A mezozoikum-neozoikum fordulóján, mintegy 65 millió évvel ezelőtt a Szahara központi területe már az egyenlítőtől északra a 20. szélességi körben helyezkedett el. A kontinensek mozgásával együttjárt a hegyképződés, az Alpok, Kárpátok felgyűrődése; az indiai szubkontinens csatlakozása Ázsiához felgyűrte a Tethis geoszinklinálisában felhalmozott üledékeket és megkezdődött az ázsiai felföld és a Himalája kialakulása is. Ezt a folyamatot követően alakult ki évmilliók során Észak-Afrikában és Ázsiában is az összefüggő arid övezet és sivatag.

A sivatagok és arid övezetek élővilágának kialakulásában igen nagy szerepet tulajdonítanak Belső-Ázsiának. Sokan úgy vélik, hogy ez a terület játszotta a legfontosabb szerepet a palearktikus arid övezetben, amennyiben igen sok csoport keletkezési centrumát teszik az ázsiai magasföldre. E tekintetben a vélemények mind a botanikusok, mind a zoológusok közt nagyon megoszlanak és végletesek. Széles körben elterjedt az a nézet, hogy Belső-Ázsia sivatagjai rendkívül ősiek, jóval régebbiek, mint a Palearktikum többi sivatagja. Ezzel éles ellentében áll az a nézet, hogy e sivatagok nagyon is fiatal képződmények, melyek mindössze a pleisztocén vége óta léteznek, de legfeljebb a pliocénben alakultak ki.

Az ariditás már a kréta után kezd kialakulni Belső-Ázsiában. Ezt a világtengerektől való nagy távolság és minden valószínűség szerint már az akkor is

meglevő orográfiai viszonyok okozták. Az ariditást és az elsivatagosodást folyamatosan okozta a Himalája felgyűrődése, a belsőázsiai felföld kialakulása, az északi és déli transzverzális és a keleti longitudinális hegyláncok kiemelkedése, melyek felfogták az északról, keletről és délről jövő páradús légtömegeket és kialakult a Góbi sivatag. Alapjaiban ez az állapot már az eocén során létrejött, ami távolról sem jelenti azt, hogy a Góbi és a középázsiai sivatagok mai kiterjedésének minden pontján p e r m a n e n s e n arid körülmények uralkodtak. A miocénben határozottan kirajzolódnak a mai sivatagok központjai, ettől a korai pliocén paleoklimatológiai térképe csak annyiban tér el, hogy a központok ariditása jelentősen fokozódott, és élesen kirajzolódik a belső- és középázsiai, valamint a turáni és arábiai a r i d k ö z p o n t o k h a t á r a.

A f a j k e l e t k e z é s i c e n t r u m o k kérdésében sok az ellentmondás. Sokan úgy vélik, egy csoportnak ott van a keletkezési helye, ahol ma legnagyobb diverzitással van képviselve, s esetleg legprimitívebb fajai maradtak fenn. A másik álláspont szerint ott van sok faj, ahol a jelenlegi környezeti viszonyok a legjobban megfelelnek a fajkeletkezés centrumának. Mindkettőre lehet igazolható példákat hozni, de egyik sem általánosítható. Ugyanígy vitás a fajkeletkezés üteme.

Egyesek szerint a biológiai e v o l ú c i ó olyannyira gyors, hogy a Palearktikum valamennyi sivatagjának élővilágát az utolsó jégkorszak utáninak tartják. Ez nyilvánvalóan olyan szélsőséges álláspont, ami elfogadható néhány alfaj keletkezésére, de nem egy ökoszisztéma endemikus fajainak összességére. A sivatagi faunában is vannak rendkívül konzervatív, többnyire elszigetelt areában élő, monotipikus vagy oligotipikus fajok, melyeknek morfológiai variabilitása minimális és ősi csoportok reliktum elemei. Ilyenek az említett Pangea vagy ősi Gondvana, ill. laurázsiai elemek. Ezeknek a generikus és specifikus szétrobbanása régen, évmilliókkal ezelőtt megtörtént.

A palearktikus sivatagi fauna távolról sem egységes. Lényeges különbség mutatkozik a belsőázsiai és középázsiai, valamint a szaharo-szind, ill. szaharo-turáni elemek összetételében. A belsőázsiai hideg sztyeppek és sivatagok faunája viszonylag szegény, kevés a szupraspecifikus endemizmusa. A középázsiai, különösen a turáni központ lényegesen gazdagabb, amit pl. a Tenebrionidák fajszáma is tükröz: Mongólia másfél millió km^2-nyi területén 180 Tenebrionida faj él, míg Afganisztán 650 ezer km^2-én több mint 400. Endemikus nemzetség Mongóliában egy se, Afganisztánban is csak 1 található. Ezzel szemben mindkét területen a fajok nagy száma endemikus. Ha nem országhatárokat veszünk figyelembe, hanem állatföldrajzi egységeket, a fajszám aránya nem sokat változik, de az endemikus szupraspecifikus taxonok aránya mindkét területen meglehetősen magas.

A középázsiai és mediterrán jellegű közelkeleti sivatagok a nyugatindiai Thar sivatagig alapjában véve meglehetősen egységes képet tükröznek. Természetesen igen sok a helyi adottságot jellemző eltérés az egyes sivatagi egysé-

gek faunájában, ami főképp abban nyilvánul meg, mennyi az etióp és mediterrán elemek részesedése, meddig hatolnak ezek észak-, ill. keleti irányban és fordítva. A legerősebb afrikai és mediterrán hatást a délturáni és indiai sivatagok faunájában találjuk; ugyancsak igen erős középázsiai-belsőázsiai hatás érezhető a délturáni faunában. Ez teszi annyira gazdaggá, változatossá Irán és Afganisztán arid faunáját.

A legtöbb kutató a palearktikus arid övezet legfiatalabb tagjának a Szahara-Arábia területet tekinti. Jelenlegi faunájában kevés a szupraspecifikus endemizmus. Az északi Szahara mediterrán, a déli Szahara etióp elemekkel tarkított. A Tasszili és Hoggar hegységek 3000 m fölé magasodó tömbje valamit megőrzött a régmúlt faunából. 1000 m magasságig az etióp elemek, e fölött a mediterrán faunarokonság az uralkodó. Ennek kialakulásában és elszegényedésében azonban már belejátszott a jégkorszak és a legújabb időszak klímaváltozásai is.

Arábia mind klimatikailag, mind geológiai felépítésében két eltérő területre oszlik. Délnyugati része kifejezetten etiópiai, míg a nagy sivatagi területei a Szaharával vannak közeli rokonságban. Mind ez ideig erről vizsgálati anyag hiányában alig volt adatunk, s csak a legújabb kutatások tükrében látjuk világosan, hogy az arab sivatag szerves folytatása a Szaharának, ahol sikerült felfedezni eleddig szaharai szupraspecifikus endemizmusoknak hitt számos taxont; mindkét területen azonos nemzetségek endemizmusokkal képviselt fajai élnek, ami bizonyítja ugyan a területek szoros kapcsolatát, de azt is, hogy a Vörös-tengeri árok több millió éves jelenléte az Arab-félsziget biotáinak önálló fejlődését is eredményezte.

A lemeztektonikai elmélet szerint Arábia Afrika részeként sodródott észak felé, ill. a Vörös-tengeri árok kialakulása után Arábia elvált a kontinenstől és ma folyamatban van e keskeny tenger óceánná válása. Dél-Arábia és Szomália között szoros faunisztikai kapcsolat van. Kifejezetten etióp eredetű, faji szinten vagy generikusan azonos szárnyatlan Tenebrionidák élnek Dél-Arábiában és Szomáliában. Ez az elterjedési típus egyes esetekben nagyon ősi kapcsolatra utal. Más, szárnyas fajok esetében, e kapcsolat minden valószínűség szerint újabb korú, a tenger jégkori, eusztatikus változásaival függ össze, amikor Afrika és Dél-Arábia között rövid ideig tartó szárazföldi összeköttetés állott fenn, bár az is elképzelhető, hogy a szűk tengerszoros szigetein keresztül aktív vagy passzív terjedéssel jutottak el ezek a fajok a Szahel-övezethez nagyon hasonló délarábiai területekre, az arid övezet legújabb kori terjeszkedésének időszakában.

Az egyenlítő a triász-jura határán Észak-Afrikát érintve húzódott. A kréta és paleogén határán, 65 millió évvel ezelőtt mintegy 15 szélességi fokkal délebbre és a pliocén táján hozzávetőleg a mai helyzetét foglalta el, tehát az afrikai kontinens ennyivel úszott északabbra. A kontinensek elúszásával és az orogenezissel együtt megváltoztak a klimatikai viszonyok is. A fokozatos lehű-

l é s már az oligocénben megkezdődött és folyamatosan tartott a pliocén végéig, amikor is beköszöntött a nagy változásokat hozó j é g k o r s z a k.

Nem ez volt az első jégkorszak a Föld életében. A kambrium végi eljegesedést több, mint 200 millió év múlva követte a karbon-perm jégkorszak, s ezt ismét több mint 200 millió évre a negyedkori eljegesedés.

Sok vita folyt és folyik a Föld utolsó 2 millió éves történetéről, a konkrét kronológiáról, a pliocén-pleisztocén határáról, mikor, hogyan és hol is kezdődött el tulajdonképpen a n e g y e d k o r. Ma már tudjuk, hogy ez nem egy mindent megsemmisítő és folyamatos k a t a s z t r ó f a volt, de az tény, hogy mélyreható változásokat hozott a jelenkor élővilágának kialakulásában, nemcsak a jégárakkal közvetlenül borított területeken, hanem az e g é s z f ö l d k e r e k s é g e n.

A leglényegesebb talán annak a felismerése volt, hogy a mintegy másfél millió évig tartó jégkorban rövidebb-hosszabb jeges korok váltakoztak melegebb szakaszokkal. Ezeket a váltakozó szakaszokat a kontinensek, ill. a tanulmányozott területek szerint másként és másként nevezeték el, amelyeknek szinkronizálása, kronológiája rendkívül nehéz feladat. Sokféle módszerrel próbálkoztak. A MILANKOVICS által számított csillagászati adatok, bár jól összeegyeztethetők a jeges és meleg szakaszokkal, de nem fedik a valóságot. A modern módszerekkel kapott eredmények nem igazolták feltevéseit. A másik igen lényeges felismerés, hogy a glaciális és interglaciális szakaszok rendkívül különbözőképpen zajlottak le az egyes kontinenseken és igen sok helyi hatás érvényesült. Egy tény: az északi féltekének mai mérsékelt övezetében a harmadkori fauna jórészt megsemmisült. A jégtakaróval és gleccserekkel együttjárt az örökké fagyott föld (p e r m a f r o s z t) kiterjedése, valamint eleddig nem tapasztalt flóra- és faunacsere.

A paleoklimatológiai vizsgálatok igen érdekes tényanyagot tárnak fel mind a glaciális és interglaciális, mind a postglaciális szakaszok klímaváltozásairól. Ennek a legfőbb jellemzője a hosszabb-rövidebb ideig tartó szakaszosság, az oszcilláció. A nagy eljegesedések szakaszaiban is volt ingadozás az évi középhőmérséklet és csapadék vonatkozásában. Az utolsó, Würm eljegesedés mintegy 50 ezer évig, a megelőzők, a Riss, Mindel és Günz fokozatosan hosszabb ideig tartottak. A Würm klímaingadozását jól szemlélteti a grönlandi jégből vett mintában az 0^{18} és 0^{16} izotópjainak aránya. A postglaciális időszakban, az eltelt 12 000 évben is nagyfokú klímaingadozást tapasztalhatunk. Általában 2500 évenként volt egy-egy melegebb, ill. hidegebb korszak. A hidegebb szakaszokban a gleccserek kiterjedése elvezetett egy-egy jeges kor határáig. Ezeken belül még kisebb időtartamú periódusok is vannak ismétlődő jelleggel.

A jégtakaró sehol sem érte el a sivatagokat, de hatása, a csapadékosabb, hűvösebb klíma igen. Feltűnő valamennyi sivatag esetében a valamikori nagyobb csapadék, folyómedrek, tavak terraszainak nyoma. Az arid övezetben 100—200 mm-es évi csapadéktöbblet gyökeresen más vegetációtípust hoz létre.

Kialakulhat időszakosan vagy tartósan is folyórendszer, a lefolyástalan medencékben nagy tavak vagy oázisok. A szárazságtűrő xerofil vagy pszammofil fajok egy része ezt az időszakot csak a reliktumként megmaradt kisebb fészkekben vészelhetik át, kipusztulnak vagy areamódosítással válaszolnak a megváltozott környezeti tényezőkre. A megváltozott környezetű területekre újabb fajok özönlenek be, amelyek számára a környezet alkalmassá vált a betelepedésre.

A helyi viszonyok döntő szerepet játszottak az eredeti sivatagi fauna megváltozásában. Mongóliában, ahol a magas fennsík és a körülzáró hegyek már a jégkor beköszöntével megvoltak, bár mai magasságukat még nem érték el, továbbá az a körülmény, hogy Szibériát nem fedte jégpáncél, csupán a permafroszt déli szegélye érte el a sivatagot és csak a magas hegységekben alakultak ki a glaciális időszakban kisebb-nagyobb gleccserek, a sivatagi faunában lényeges változást nem okoztak. A gleccserekkel a sivatagi és egyben hidegtűrő fauna ma is együtt él, a gleccserhatás csak a közvetlen közelükben érvényesül. Ez a rendszeres, kisebb méretű vagy erőteljes oszcilláció a sivatagi fauna tagjait állandó alkalmazkodásra kényszeríti és egyik *fő szelekciós faktor a szélsőséges viszonyok eltűréséhez.*

A sivatagi környezet sajnos nem alkalmas a talajlakó rovarok fosszilizációjára, így ilyeneket sehonnan sem ismerünk. Hogy a rovarok a klímaváltozásokra miként reagálnak, azt csak a periglaciális területek vizsgálatának eredményeiből következtethetjük, feltételezve, hogy a változásokat előidéző ok, amely hasonló volt, az arid területen is hasonló választ váltott ki.

C^{14} vizsgálatokkal pontosan datált, pollenanalízissel is vizsgált rétegekből az angliai, skandináviai és dániai tőzeglápokból igen nagyszámú rovarmaradvány került elő az utolsó eljegesedés korszakaiból. A 23 000 éves staruniai lelőhelyen, amely a gyapjas orrszarvút őrizte meg, ugyancsak gazdag rovaranyagot tártak fel. A rovaranyag vizsgálata egyértelműen bizonyította, hogy ezek mind modern fajok, valamennyi ma is él, mégpedig boreális, boreomontán, ill. boreoalpin elterjedési típusokban. *Jégkori lelőhelyeikről kipusztultak, a jégtakaró visszahúzódásakor követték azt a klímahatárt, amely a fosszilizáció időszakában és helyén uralkodó volt.* Az interglaciális és postglaciális rétegekben is maradtak fenn rovarmaradványok; ezek között jelentős számú a ma kifejezetten mediterrán, atlanto-mediterrán faunaelem; ezek mai areája és jelenlegi klímája bizonyítja, hogy a melegebb időszakokban mennyire hatolt északra a mediterrán fauna. Olyan fajt is ismerünk, amely ma csak a Himalájában fordul elő és fosszilis leletét Angliában találták meg.

Ezek az adatok bizonyítják, hogy a rovarok mennyire érzékenyek a klíma, a környezet változásaira és a hosszabb-rövidebb ideig tartó környezetváltozásra areájuk is megváltozik. Ez a *dinamikus areaváltozás* az arid fajokra is jellemző.

Az arid területek zonális kiterjedése, méretei, rendkívüli változatosságuk, a sztyepptől a félsivatagon át a szélsőségesen sivatagos területekig való mindenféle átmenet, mozaikszerű felépítésük mégis igen sok lehetőséget nyújt a klímaváltozások átvészelésére. Mongóliai kutatásaim arról győztek meg, hogy a sztyepp és a sivatag közt van egy átmeneti félsivatagi, helyenként szűk, másutt több 100 km széles sáv, amelyben mind a sztyepp, mind a sivatagi fajok egyaránt megtalálják életfeltételeiket. Ebben a sávban mindkét faunatípus elszegényedett és extrazonális társulásokban, exklávékban él. Fennmaradásukat éppen az biztosítja, hogy a klímaingadozások folytán beálló areamódosulások során kapcsolatba kerülnek a faj populációjának összefüggő areájával. Ha ez az összefüggés tartósan megszakad, kisebb-nagyobb morfológiai változások léphetnek fel, amelyek végső soron fajkeletkezéshez is vezethetnek.

Az extrazonális társulásokban élő, morfológiai bélyegeikben eltérő és taxonómiailag túlértékelt formák vizsgálata alakíthatta ki sokakban azt a véleményt, hogy a fajkeletkezés a természetben gyors ütemben lejátszódó jelenség a rovarok esetében is. Az nem vitás, hogy az adaptációs bélyegek kialakulása, pl. a homokos talajhoz való alkalmazkodás, viszonylag gyors. Ezt euriök fajok nagy sorozatain, melyek az arid övezetben szélesen elterjedtek és különböző talajtípusokon fordulnak elő, magam is vizsgáltam. A már éles jellegekkel eltérő, adaptációs bélyegekben gazdag sztenök fajok azonban egész areájukban rendkívül stabilak. Ezek a taxonok szigorúan követik a klimatikai, talaj vagy más tényezők által megszabott környezetet, s areájuk ezekkel együtt változik.

Az arid övezet a pluviális időszakban összeszűkül, a szárazabb időszakokban ismét tért nyer. Ennek mértéke az oszcillációt kiváltó tényezők hatásainak rövidebb vagy tartósabb szakaszaitól függ. Igen szembetűnő ennek a jelenségnek a hatása a Szahara esetében. Általánosan elfogadott, hogy a palearktikus sivatagok között a Szahara a legfiatalabb arid övezet. Paleontológiai leletek, sziklarajzok, pollenanalitikai elemzések bizonyítják, hogy a Szaharában évezredekkel ezelőtt kiterjedt szavanna, nagy tavakkal tarkított, a mai Kelet-Afrika élővilágának megfelelő klíma és növényzet uralkodott. Az kétségtelen, hogy a glaciális időszakokban a Szahara klímája pluviális volt, a pliocénban pedig a mai Csád-tó helyén egy hatalmas belsőafrikai tóvilág helyezkedett el. Ugyanakkor azonban a mai hatalmas homoksivatagok, a Grand Erg Occidental és Oriental már a miocénban létrejöttek; a kontinentális klíma eredményeként a folyómedrek és a tavak parti finom homokját terelte össze a szél ezekbe a homoktengerekbe. A homoknak adaptációs bélyegekben mindenütt gazdag egyéni endemikus faunája van. A Szahara homoksivatagjainak endemikus faji szintű vagy szupraspecifikus endemikus faunája mediterrán eredetű, melynek rokonságát ma az arábiai sivatagokban is megtaláljuk. Kialakulásukat a miocénba kell helyezzük, még akkor is, ha a pleisztocénban hosszan tartó plu-

viális időszakokkal számolunk. A sivatagi fauna nem semmisült meg, csak refugiumokba szorult, s a fokozatos kiszáradással, a pluviális időszak faunájának eltűnésekor ez a viszonylag elszegényedett, arid fauna vált uralkodóvá.

A pluviális szakaszokban az etióp trópusi őserdőterület is hatalmas mértékben északabbra tolódott, míg a legszárazabb szakaszokban olyannyira visszahúzódott, hogy a Kongó-medencén át a Szahel-övezet kapcsolatba került a délafrikai arid zónával. Ennek faunisztikai nyomai ma is kimutathatók. A Szahel-övezet és a Szahara jelenleg a további kiszáradás szakaszában van. A sivatag térhódítása és a Szahel-övezet délre való tolódása évenként a 100 métert is elérheti. Ez a folyamat klimatikus tényezők függvénye, az utóbbi 2 millió év során többször megismétlődött és még nem ért véget. Kétségtelen, hogy az elsivatagosodáshoz hozzájárul az ember is. A túllegeltetés, a kiszáradt füves puszták felégetése nyilván még gyorsítja és súlyosbítja is a folyamatot, de alapjaiban mégis globális és regionális klimatikai tényezők okozzák.

A sivatag térnyerése a délafrikai Namib sivatagban is megfigyelhető. Itt a Benguela hideg áramlat hatására egy keskeny parti sávban az Orange folyótól északra, Angola déli részéig egy olyan homokdünés sivatag alakult ki, amely állatvilágát tekintve páratlan a maga nemében. E sivatagnak nincs növényzete, a homokdünék, melyek a 300 m magasságot is elérik, örök mozgásban vannak. Az itt kialakult endemizmusokban gazdag szárnyatlan talajlakó rovarvilágnak nincs egyéb táplálékforrása, mint a szél által besodort detritusz. Megfigyelések szerint a sivatag terjeszkedése északi irányban az évi 20 m-t, délen a 8 m-t is eléri. Ez az ultrapszammofilnek nevezett endemikus rovarfauna természetesen csak akkor fejlődhetett ki, amikor létrejöttek azok a globális klímahatások, melyek a déli féltekén a hideg-meleg tengeráramlatokat és szélirányokat meghatározták.

Néhány évtizede még ezt a faunát éppen rendkívüli endemizmusainak alapján a világ legősibb sivatagjának tekintették, amelynek a kialakulása már a krétában megkezdődött. Újabb vizsgálatok tükrében ez korántsem így van. Az endemizmusok nagy száma a speciális élőhelyi adottságok miatt, a talajlakó Tenerbrionidák rendkívüli adaptációja útján, a délafrikai xerofil fauna tagjaiból sokkal később alakult ki. Ennek kronológiai meghatározása ma még nem bizonyítható, de az tény, hogy a tengerparti sávban települő Namib sivatag homokdünéi fiatal képződmények. A homokdünéktől körülzárt, de a kavicstalajon élő fajok egymástól elzárt populációiban semmi jele sincs alfajképződésnek; ez is annak a jele, hogy a hatalmas homokdünék fiatalok. A dünék egymástól elszigetelve a tengerpart közelében keletkezhettek, ott alakult ki a parti xerofil faunából elszigetelten fejlődött endemikus talajfauna, amelynek fajai ma a sivatagi homokdünék kiterjedésével az egész növényzet nélküli terület dünéin előfordulnak, így a

valamikor allopatrikus keletkezésű fajok ma sok esetben szimpatrikus elterjedési képet tükröznek.

A paleoklimatológusok szerint a földtörténet során csak a hosszabb-rövidebb ideig tartó eljegesedések szakaszaiban volt a sarkokon jégsapka. Ma kiterjedt jégmezők borítják mind az északi, mind a déli sark környékét. A legutolsó eljegesedés óta is csak 12 000 esztendő telt el. Jelenleg tehát még interglaciálisban élünk, mégpedig a felmelegedés és a további sivatagosodás irányába mutató szakaszban. Az természetesen nem jósolható meg, hogy a törvényszerű oszcilláció melyik fázisa következik be; a „kis jégkorszak" tanúságai, az elmúlt 12 000 év klímatörténete azonban kizárja, hogy az eddigi periodicitást figyelembe véve újabb jeges korszak 2000 éven belül várható lenne; ezzel szemben kisebb-nagyobb hideg kilengéseket eltekintve összességében inkább melegebbre fordul a klíma, ami elsősorban a kontinentális és arid területeken okoz mélyreható változásokat. Az ariditás kiterjedése, a sivatagok területének bővülése alapos átalakulásokat okozhat a természetes növény- és állatvilág elterjedésében és további evolúciójában.

Az arid területek várható kiterjedése mélyrehatóan érinti az egész emberiség jövőjének alakulását. Az arid zónában élő legszegényebb népek további sorsa szükségessé teszi, hogy minél szélesebb körben tanulmányozzuk ezt a még mindig kevés figyelemre méltatott s a szárazföldjeink csaknem felét kitevő, világrészeket érintő biómot.

IRODALOM

Bonarescu, P. és Boscau, N.: Biogeographie. Fauna und Flora der Erde und ihre geschichtliche Entwicklung. — VEB G. Fischer Verlag, Jena 392 pp (1978).

Coope, G. R. és Brophy, J. A.: Late glacial environmental changes indicated by a coleopteran succession from North Wales. — Boreas **1,** (2) 97—142 (1972).

Coope, G. R., Morgan, A. és Osborne, P. J.: Fossil Coleoptera as indicators of climatic fluctuations during the last glaciation in Britain. — Palaeogeography, Palaeoclimatol. Palaeoecol. **10,** 87—101 (1971).

Darlington, Ph. J., Jr.: Zoogeography: The geographical distribution of animals. — New York, John Wiley & Sons, INC. I—XI + 675 pp (1957).

Darlington, Ph. J., Jr.: Biogeography of the South End of the World. Distribution and history of far-southern life and land, with an assessement of continental drift. — Harward Univ. Press, Cambridge 236 pp (1969).

Emeljanov, A. F.: Review of viewpoints on origin of desert biota of Central Asia. — Insects of Mongolia, **1,** 11—49 (oroszul) (1972).

Endrődy—Younga, S.: Coleoptera. — on Wegner, M. J. A.: Biogeography and ecology of Southern Afrika. Hague 797—821 (1978).

Franz, H.: Ökologie der Hochgebirge. — Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 495 pp (1979).

Franz, H. és Beier, M.: Die geographische Verbreitung der Insekten. — in Handbuch der Zoologie, Berlin **4,** (2) 1/6, Lief. 11, 1—139 (1970).

Gressitt, J. L.: Insect biogeography. — Ann. Rev. Ent. **19,** 293—321 (1974).

Hatch, M. H.: Palaeocoleopterology. — Bull. Brooklyn Ent. Soc. **21,** (4) 137—144 (1926).

Haupt, H.: Die Käfer (Coleoptera) aus der Eozänen Braunkohle des Geiseltales. — Geologica, Berlin, Akademie Verl. **6,** I—VIII + 1—168 (1950).

Hsu, K.: Als das Schwarze Meer austrocknete. — Spektrum der Wissenschaft, Weinheim **5,** 30—41 (1979).

Illies, J.: Die Wegenersche Kontinentalverschiebungstheorie im Lichte der modernen Biogeographie. — Die Naturwissenschaften **52,** (18) 505—511 (1965).

JOHN, B. S.: The Ice Age. Past and Present. — W. Collins Sons & Co Ltd. Glasgow: 254 pp. Plate 32 (1977).
KASZAB, Z.: Az arid zóna állattani problémái. — MTA Biol. Oszt. Közl. **11,** 73—89 (1968).
KOCH, C.: Zur Ökologie der Dünen-Tenebrioniden der Namibwüste Südwest-Afrikas und Angolas. — Lunds Univ. Arskr. N. F. Acd. 2, **58,** (5) 1—25 (1962).
KOCH, C.: The Tenebrionidae of Southern Africa. XXXI. Comprehensive notes on the Tenebrionid fauna of the Namib desert. — Ann. Transvaal Mus. **24,** 61—106 (1962).
KRYZHANOVSKIJ, O. L.: The principal regularities of geographical distribution of Coleoptera in Middle Asia. — Proc. XIII. Int. Congr. Ent. London 1964, 449—450 (1965).
SCHWARZBACH, M.: Das Klima der Vorzeit. Eine Einführung in die Paläoklimatologie. — F. Enke Verlag, Stuttgart: I—XI + 275 pp (1961).
WOLDSTEDT, P.: Das Eiszeitalter. Grundlinien einer Geologie des Quartärs. I. Die allgemeinen Erscheinungen des Eiszeitalters. — F. Enke Verlag, Stuttgart: I—VII + 374 pp (1954).
WOLDSTEDT, P.: Das Eiszeitalter. Grundlinien einer Geologie des Quartärs. III. Afrika, Asien, Australien und Amerika im Eiszeitalter. — F. Enke Verlag, Stuttgart, I—VII + 328 pp (1965).

ENZIMSZERKEZET, ENZIMEK LOKALIZÁCIÓJA*

SZABOLCSI GERTRUD

SZBK Enzimológiai Intézete, Budapest

A 60-as években a biokémia eljutott odáig, hogy meghatározza a kismolekulasúlyú, 120—150 aminosavból álló fehérjék kémiai szerkezetét, aminosav-sorrendjét. A biokémikusok és biofizikusok együttműködésével már meghatározható volt ezen fehérjék térszerkezete is. Sőt, mi több, szerény hozzájárulásunkkal a fehérjeszerkezet dinamikus volta is bizonyítást nyert.

Minthogy azonban, a biológiailag aktív fehérjék (enzimek, transzport- és immun-fehérjék stb.) döntő többsége nagymolekulasúlyú, több polipeptidláncból álló egység (oligomer fehérjék), ezután került napirendre ezen nagyobb egységek kémiai és fizikai sajátságainak felderítése. A 60-as évek végén határozták meg Cambridge-ban az első 143 000-es mólsúlyú oligomér fehérje, a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (továbbiakban GAPD) aminosav-sorrendjét (DAVIDSON és mtsai 1967, HARRIS és mtsai 1968). Ez a fehérje 4 azonos kémiai szerkezetű alegységből áll, melyek egyenként 333 aminosavat tartalmaznak és 10 évvel az elsődleges szerkezet leírása után tartunk ott, hogy jó közelítéssel ismerjük ennek a fehérjének térszerkezetét is (OLSEN és mtsai 1976). A 70-es években került napirendre a nagymolekulasúlyú fehérjék megismerése. Az oligomér fehérjéknek az a közös sajátsága, hogy az egyes alegységeket összetartó erők nem kovalens kötések, mint pl. a peptidkötések vagy a diszulfid hidak, hanem úgynevezett „másodlagos erők" (H-hidak, hidrofób kölcsönhatások, sókötések).

Ezekkel a kutatásokkal szinte egyidejűleg, egy új irányzat is előtérbe került. A biokémikusok és biofizikusok már nemcsak az egyedi fehérjéket vizsgálták, hanem kölcsönhatásaikat egyéb fehérjékkel, a sejt egyéb alkotó elemeivel, lokalizációjukat a sejten belül. Ismeretessé vált pl., hogy olyan enzimek, melyek az élő szervezetben egymás utáni reakciókat katalizálnak — gyakran komplexet alkotnak egymással. Felépítésük azokhoz az egyedi fehérjékhez hasonló, melyek azonos vagy néha különböző polipeptid láncból alakulnak oligomér szerkezetűvé.

Az elmúlt évek során az én érdeklődésem is a fenti két témakörben mozgott. Ebből a két témakörből szeretnék egy-egy munkát bemutatni.

* Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémián 1980. április 12-én.

Az egyik munka során, kristályosan előállítható, nagy molekulasúlyú, oligomér fehérjét vizsgáltunk. Nagyon leegyszerűsítve, azt a kérdést vetettem fel, hogy vajon „meddig enzim egy oligomér fehérje". Ismeretes, hogy a fehérje szintézis során kialakulnak a polipeptid lánc peptidkötései és kialakul az aminosavsorrend által meghatározott, az aktív centrum működését biztosító natív térszerkezet. A kérdés az volt, hogy oligomér szerkezetű fehérje esetén, megbontható-e a kész polipeptidlánc anélkül, hogy az alegységek szétesnének és vajon az egész, *intakt* szerkezet szükséges-e a katalitikus aktivitáshoz, az aktív centrum szerkezetének fenntartásához.

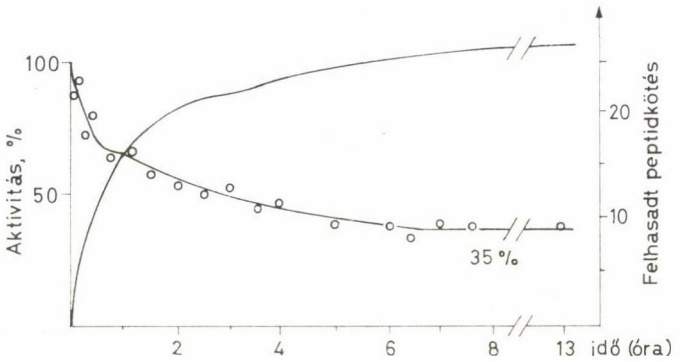
Mikor ezeket a vizsgálatokat elkezdtem, már volt példa arra, hogy egy *kisméretű*, kovalens kötésekkel stabilizált szerkezetű enzimet meg lehet bontani. Ez az enzim a 124 aminósavból álló ribonukleáz. An enzim, azon kívül, hogy kisméretű, térszerkezetét *négy* helyen stabilizálják diszulfid (—S—S—) hidak. RICHARDS és VITHAYATHIL (1959) tudott olyan körülményeket találni, amelyek között a szubtilizin nevű proteolitikus enzim hatására a ribonukleáz nem bontódott le teljesen, hanem csak ún. limitált proteolízis következett be: a fehérje 20. és 21. aminósava között, *egyetlen* peptidkötés hasadt fel. Ezáltal keletkezett egy 20-tagú peptid (1—20 aminosavak), melyet kovalens kötés már nem tartott össze a fehérje többi részével. Ennek, akkori tudásunk szerint, oldatba kellett volna mennie. Ez a peptid mégis kötve maradt a fehérjén, bár csak az úgynevezett „gyenge erők" kötik a fehérjéhez. Ez a módosított enzim aktív marad. A peptidet el lehet távolítani a fehérjéről anélkül, hogy azt denaturálnák. Ekkor a csonka enzim inaktív. Ha azonban visszaadják a fehérjéhez az eltávolított peptidet, az „megtalálja eredeti helyét", visszakötődik és az enzim újra aktív lesz.

Merrifield laboratóriumában érdekes vizsgálatokat végeztek ezzel az enzimmel, amelyek azt mutatják, hogy a jelenségek nem olyan egyszerűek (TEPLÁN 1974, HODGES és MERRIFIELD 1975). Ismeretes volt, hogy a ribonukleáz C-terminális részéről, egymás után le lehet hasítani néhány aminosavat és ekkor az enzim inaktív lesz (Aufinsen 1955). Merrifield laboratóriumában 6 aminosavat hasítottak le az enzimről, majd szintetizálták a hiányzó peptidet, de ez nem „talált vissza" a helyére és a fehérje inaktív maradt. A fehérje C-terminális részének 14-tagú peptidjét kellett szintetizálni ahhoz, hogy az a csonka enzim megfelelő helyére kötődjék vissza. Tehát egy átfedő peptidrészlet kellett ahhoz, hogy a polipeptid lánc kiegészüljön és visszanyerje enzimatikus aktivitását.

Mi nagy fába vágtuk a fejszénket, nem kis fehérjét vizsgáltunk, hanem mint már említettem, több alegységből álló, oligomér enzimet: az aldolázt. Az aldoláz minden élőlényben megtalálható, mi nyúlizomból vontuk ki és kristályosítottuk. Az enzim nagyon érdekes reakciót katalizál, nevezetesen C—C kötés hasítását — ami a vegyésznek semleges pH-n és 37 °C-on nem megy. Korábban, munkatársaimmal sokat foglalkoztunk az enzim és az aktív centrum

szerkezetével. Az aldoláz 4 alegységből áll (KAWAHARA és TANFORD 1966) és *egy* alegység is 364 aminosavat tartalmaz. Tehát már egy alegység is nagy fehérjének számít. Szeretném felhívni a figyelmet arra is, hogy *az enzim térszerkezetét nem stabilizálják diszulfid kötések.* Bár a munka megkezdésekor távol álltunk az aminosavsorrend ismeretétől, mind SAJGÓ, mind LAI előzetes vizsgálatai arra utaltak, hogy az alegységek kémiai szerkezete azonos és ezt később be is bizonyították (SAJGÓ és HAJÓS 1974, LAI és mtsai 1974). Az aldoláz térszerkezete még ma sem ismeretes, az enzimkristályok nem alkalmasak röntgen diffrakciós vizsgálatokra, tehát csak kémiai és fizikai-kémiai módszerekkel tudjuk közelítőleg leírni.

Sikerült olyan körülményeket kidolgoznunk, melyek között, ha az aldolázt kevés tripszinnel emésztjük — ez nem emésztődik meg teljesen, azaz limitált proteolízist idéztünk elő (BISZKU és SZABOLCSI 1964, BISZKU és mtsai 1964, BISZKU és mtsai 1973, SOLTI és mtsai 1975).



1. ábra. Az aldoláz-T keletkezésének időfüggése. A kihúzott vonal a felhasadt peptidkötések számát jelenti a tetramér aldolázra számítva (automatikus kiíró szerkezettel felvett görbe); o, az aktivitás csökkenés folyamata. A vonal kétlépéses konszekutív reakció elméleti görbéje

Az 1. ábrán látható, hogy a limitált proteolízis során az enzimaktivitás az emésztési elegyben 35%-ra csökken, majd állandó marad. Az emésztés 26 peptidkötés/tetramer felhasadása után áll le, azaz később, mint az aktivitás csökkenés. A csonka enzimet gélszűréssel izoláltuk az emésztési elegyből és aldoláz-T-nek, azaz tripszinnel kezelt aldoláznak neveztük el. A fehérje homogénnek bizonyult (vö. 2. ábra, A, B, és C elektroferogram) és stabilis volt. Minthogy a csonka enzim keletkezése során a polipeptid láncok tekintélyes része kihasadt, az izolált aldoláz-T *specifikus aktivitása* az eredeti aktivitás 50%-a lett. Tehát egy erősen megcsonkított, de még félig aktív enzim volt a kezünkben.

Az aldoláz-T, azaz a csonka enzim keletkezési mechanizmusának és szerkezetének felderítése sok izgalmat és örömet szerzett csoportunknak, mely szövetkezett Sajgó Mihály fehérje analitikus és Závodszky Péter fizikus kollegákkal.

1. táblázat

Az aldoláz-T keletkezése során kihasadó peptidek. A peptideket jellemző aminosav tartalmuk alapján neveztük el. Az N*t* peptid a fehérje 27-tagú N-terminális peptidjét jelöli. A C_1, C_2 és C_3 peptidek nem tartalmaznak olyan aminosavat, melynek alapján kvantitatíve meg lehetne határozni. A zárójelben levő számok becsült értékek.

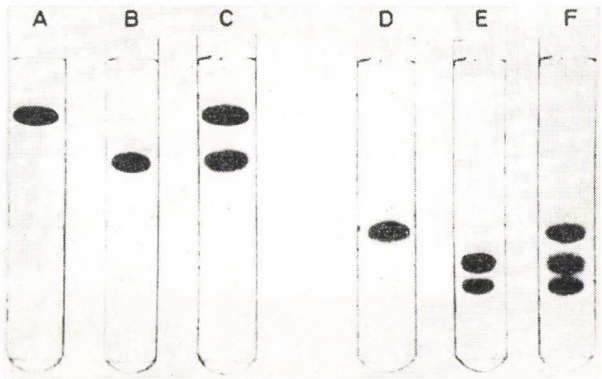
A peptidek elnevezése	TYR-A	TYR-B	TYR-C	TRP	CYS	N_t	C_1	C_2	C_3
mól peptid / tetramer aldoláz	4	2	2	2	2	4	(2)	(2)	(2)

Az aktivitás csökkenés, a kinetikai analízis alapján, két lépéses konszekutív reakciónak bizonyult. Egy gyors lépésben az aktivitás 70%-osra csökken és egy sokkal lassúbb, konszekutív lépésben áll be a 35%-os végleges aktivitás. Tehát *két* meghatározott helyen történő hasítás hozza létre a csökkent aktivitást. Ezzel szemben a felhasadt peptidkötések száma 26. Ez a szám először is túl nagy, ezenkívül pedig nem osztható néggyel — és az enzim 4 alegységből áll. A jelenség értelmezését még bonyolította, hogy Sajgó 9 különböző peptidet izolált az emésztési elegyből. Ezek az adatok sehogyan sem voltak összeegyeztethetők, minthogy ahhoz, hogy 9 peptid lehasadjon egy tetramerből, minimálisan 36 kötés kell felszakadjon. Már a peptidek kvalitatív analízisénél azonban kiderült, hogy szerencsénk van.

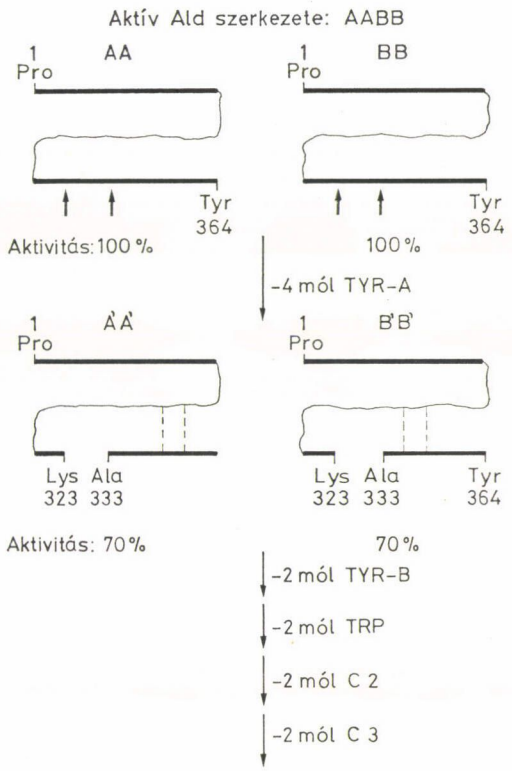
A 9 peptid közül 6-nak a kihasadása kvantitatíve meghatározható (1. táblázat) és a kihasadás kinetikája analizálható. Az elegyben 3 tirozin-, 1 triptofán- és 1 cisztein-tartalmú peptidet találtunk. Lehasadt továbbá a fehérje 27-tagú N-terminális peptidje is (N_t-peptid). Az emésztési elegy csak 3 olyan peptidet tartalmazott, melynek kihasadását nem lehetett kvantitatíve követni, a C_1, C_2 és C_3 peptidek.

A kvantitatív analízis furcsa eredményt adott. Az analizálható peptidek közül csak kettő hasad ki *mind a 4 alegységből:* A TYR-A és az N_t peptidek. A többi csak *két alegységből* hasad ki. Az emésztés tehát nem egyformán érinti a négy alegységet. Az 1. táblázatban, a C-peptidek alatt zárójelben levő számok azt jelentik, hogy feltételeztük, hogy ezek is csak két alegységből hasadnak ki. Ezekkel az adatokkal és egy feltételezett peptid szekvenciával, már el tudtunk számolni a 26 peptidkötés felhasadásával. A feltételezett szekvencia helyességét Sajgó és Hajós (1974) később igazolta.

A jelenségben az volt a megdöbbentő, hogy annak ellenére, hogy az aldoláz alegységei azonos primér szerkezetűek, mégis tripszines emészthetőségük páronként különbözőnek bizonyult. Ezt a következtetést alátámasztották a gélelektroforézis vizsgálatok is. Az aldoláz-T homogén fehérje, jól elkülöníthető a natív enzimtől. Natrium dodecilszulfátban végzett gélelektroforézissel pedig, *két*, különbözőképpen megcsonkított alegység mutatható ki (2. ábra, D, E és F elektroferogram).



2. ábra. Az aldoláz és aldoláz-T poliakrilamidgél elektroforézises vizsgálata. A, B és C, rendre: intakt aldoláz, aldoláz-T és a kettő keveréke. D, E és F, Na-dodecilszulfátban végzett elektroforézis, rendre: intakt aldoláz, aldoláz-T és a kettő keveréke



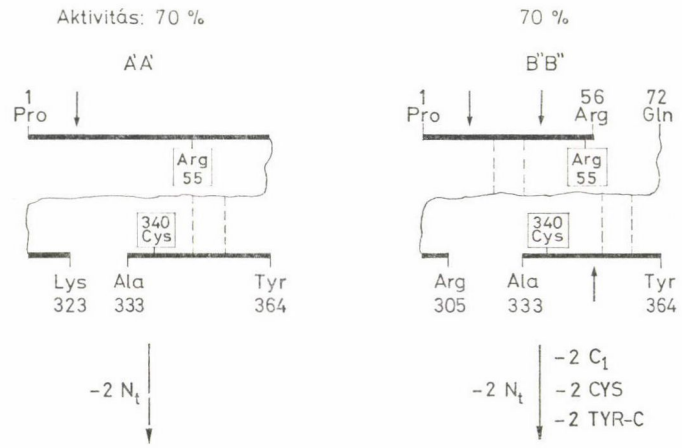
3. ábra. Az aldoláz-T keletkezésének sémája (a hasítás első lépése). A páronként különböző viselkedésű alegységekből csak egyet-egyet ábrázoltunk. Szaggatott vonalakkal jelöltük, hogy az Ala-333—Tyr-364 peptid nem-kovalens kötésekkel kapcsolódik a fehérje többi részéhez

A bonyolult kinetikai és peptidanalitikai vizsgálatokból, amelyek megmutatták, hogy mi minden történhet egy fehérjével, csak a jellemző sémákat szeretném ismertetni.

Az eredményeket csak úgy lehet értelmezni, ha az aktív aldoláz térszerkezetéről feltételezzük, hogy a négy azonos alegység — *térben* — páronként különböző helyzetű, mondjuk AABB térszerkezetű (3. ábra). Az ábrán az A és a B helyzetű alegységekből csak egyet-egyet tüntettünk fel. Tripszin hatására először egy 9-tagú peptid hasad ki, a fehérje C-terminális részén. Ez az a bizonyos TYR-A peptid, amely mind a négy alegységből kihasad. Ekkor egy 70%-os aktivitású csonka enzim keletkezik, ami izolálható. Ennek egy láncrészlete már nem-kovalens kötésekkel kapcsolódik a fehérje többi részéhez (Ala-333 — Tyr-364).

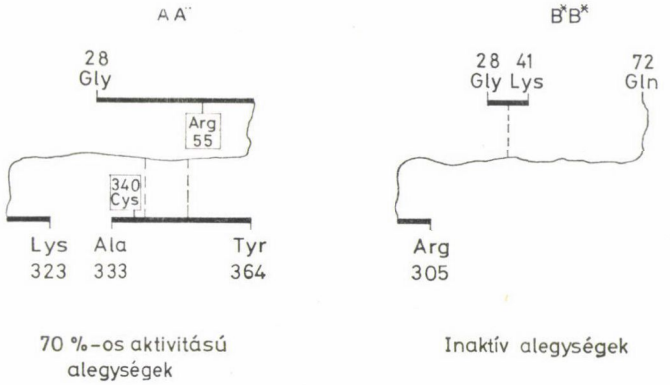
A TYR-A peptid kihasadása után, több lassúbb konszekutív és párhuzamos lépésben számos peptid hasad ki — *de csak a B-helyzetű* alegységekből. A peptid-kihasadás és az aktivitás csökkenés kinetikai analíziséből egyértelműen kiderült, hogy ez a csonkítás nem befolyásolja az enzim maradék aktivitását. A 4. ábra egy olyan közti terméket mutat, amelyben a B-helyzetű alegységek már nagyon meg vannak csonkítva és az aktivitás mégmindig 70%-os. Az ábrán bejelöltük a 340-es helyen levő ciszteint, amiről korábban már kimutattuk, hogy az aktív centrum része (SZAJÁNI és mtsai 1969, 1970), az Arg 55-ről pedig PATTHY és mtsai (1979) az elmúlt évben mutatta ki, hogy a szubsztrát-kötő helyen van.

Ebbe a közti termékbe, a nyíllal jelölt helyeken további hasítások következnek be — de csak a B-helyzetű láncokban. Ekkor kihasadnak az aktív centrumban levő Cys-t és Arg-t tartalmazó peptidek. Ezzel a *B-helyzetű alegységek inaktiválódnak*. Ezzel egyidejűleg az emésztési elegyben leáll az aktivi-



4. ábra. Az aldoláz-T keletkezésének egyik, még 70%-os aktivitású közti terméke. A bekeretezett aminosavak az aktív centrum részei

tás csökkenése. *Az aktivitás csökkenés leállása után* még lehasad a fehérje N-terminálisa felől egy 27-tagú peptid, az N_t-peptid — még hozzá *mind a négy alegységből.* Úgy látszik, ez a részlet sem szükséges az enzimatikus aktivitáshoz. Így alakul ki az a furcsa szerkezetű enzim, melyet aldoláz-T-nek neveztünk (5. ábra). Az aldoláz-T két A-helyzetű alegysége csonka — mégis 70%-os aktivitású.A B-helyzetű alegységekből a láncnak majdnem egyharmada hiányzik — ez inaktív. Így az emésztési elegyben mért aktivitás 35%, de az elegyből *izolált* csonka enzim mennyiségére számított ún. *specifikus aktivitás 50%.*



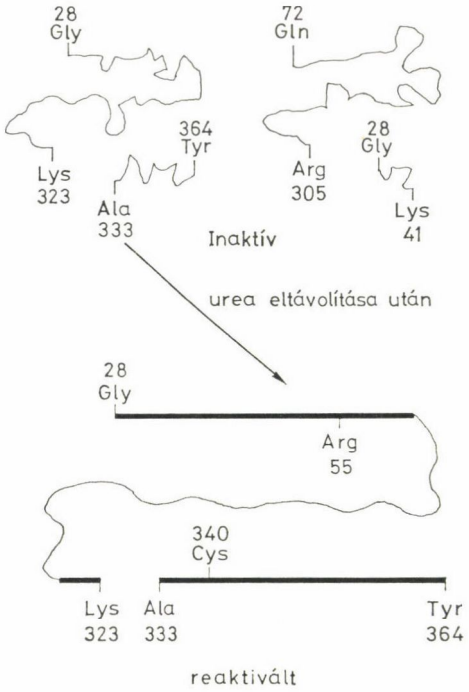
5. ábra. Az aldoláz-T szerkezetének sematikus ábrázolása. Az izolált csonka enzim specifikus aktivitása, az eredeti aktivitás 50%-a

Závodszky és Biszku (1967) vizsgálatai szerint az aldoláz-T kompakt tetramér — bár az ember valamilyen laza, instabilis terméket várna. Az alegységeket összetartó erők tehát olyan erősek, hogy ilyen nagymérvű csonkítás után is megmarad az oligomér szerkezet.

Az 5. ábrán látható, hogy a részlegesen aktív A-helyzetű alegységekben van egy nem-kovalens kötéssel tartott peptid-részlet (334—364). Minthogy ismeretes volt, hogy az aldoláz 4 M ureában *reverzibilisen denaturálható* (Stellwagen és Schachman 1962), megvizsgáltuk, hogy mi történik az aldoláz-T-vel ureában. Mint a 6. ábra mutatja, ureában, amikor a polipeptidláncok kigombolyodnak, a nem-kovalensen kötött részletek oldatba mennek — ezt kísérletesen bizonyítottuk — az enzim inaktív. Ha azonban az ureát eltávolítjuk, de a peptid az elegyben marad, a csonka enzim is reaktiválódik. A 30-tagú C-terminális peptid „visszatalál" a megfelelő helyre és valószínűleg az eredetileg A-helyzetű alegységek állnak össze tetramérré. Nemigen tudnánk elképzelni, hogy az erősen megcsonkított B-helyzetű polipeptid-láncokból denaturáció után még egyszer fehérje lesz.

Az aldoláz-T keletkezésével és reverzibilis denaturációjával bizonyítottuk tehát, hogy:

1. Diszulfid hidakkal nem stabilizált, nagyméretű, tetramér fehérje *megcsonkítható* és kihasítható belőle több részlet anélkül, hogy ez az aktivitást



6. ábra. Az aldoláz-T reverzibilis denaturációjának sematikus ábrázolása. Felső séma: az aldoláz-T-t 4 M ureával kezeltük és aktivitását 4 M ureát tartalmazó pufferben mértük. *Alsó séma:* az ureával kezelt csonka enzimet pufferrel hígítottuk és aktivitását pufferben mértük. Ha az ureát dialízissel távolítottuk el, ami az oldatban levő peptideket is eltávolítja, akkor a fehérje inaktív volt

lényegesen befolyásolná. Nyilvánvaló, hogy a hasítások nem érintették az aktív centrum térszerkezetét.

2. Az erősen megcsonkított fehérje megtartja tetramér szerkezetét. A hasítások tehát nem érintették az alegységek közötti kontakt felszíneket sem.

3. A csonka enzimben egy-egy peptidrészlet nem-kovalens erőkkel is kapcsolódhat a fehérje többi részéhez. Egy 30-tagú peptid még reverzibilis denaturáció után is specifikusan visszakötődik a helyére.

4. A natív aldoláz teljes peptidláncára szükség van ahhoz, hogy az aktív centrum és az alegységek közötti szoros kölcsönhatások kialakuljanak. Ha azonban ezek már kialakultak — a polipeptidlánc számos részlete kihasítható a fehérjéből. Érdemes megjegyezni, hogy az ún. gyenge erők kooperatív kölcsönhatása milyen nagyfokú stabilitást biztosít a fehérjének, hiszen, mint említettem, az aldoláz térszerkezetét nem stabilizálják diszulfid hidak.

Az eddig ismertetett vizsgálatok egyedi, izolált enzim saját magával alkotott komplexéről szólottak. Az elmúlt évtizedben azonban leírtak számos olyan enzimkomplexet is, melyekben különböző funkciójú enzimek létezhetnek szoros kölcsönhatásban, ezek együtt is izolálhatók a sejtből. Ezek az enzimek

általában az anyagcsereutak egymást követő lépéseit katalizálják és az ún. multienzim komplexek képződése nagymértékben fokozhatja az anyagcsere „hatékonyságát". GREEN és mtsai (1965), majd FRIEDRICH (1974) vetette fel, hogy valószínűleg az egyedileg könnyen izolálható glikolitikus enzimek is, a sejtben komplexet alkotnak és nem „úszkálnak" szabadon a citoplazmában. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy a sejtben igen magas a fehérje koncentráció, ami kedvez az asszociációnak. OVÁDI és KELETI (1978), OVÁDI és mtsai (1978), valamint PATTHY és VAS (1978) kísérletei azt bizonyították, hogy az izolált izom aldoláz és a GAPD, tömény oldatban *in vitro* is képez komplexeket. A vörösvértest (továbbiakban vvt) GAPD egyes szerzők szerint a membránnal alkot komplexet, aminek az lenne a fiziológiás jelentősége, hogy a kívülről a sejtbe jutó anorganikus foszfát a „helyszínen" átalakulhatna makroerg foszfáttá (KANT és STECK 1973, YU és STECK 1975). Ezt a nagyon tetszetős elképzelést azonban többen kritizálják. A GAPD ugyanis csak erősen hipotóniás közegből izolált membránhoz kötődik, izotóniás körülmények között a kötődés nem mutatható ki. MARETZKI és mtsai (1974), valamint FUJII és SATO (1975) a komplexet műterméknek tartják.

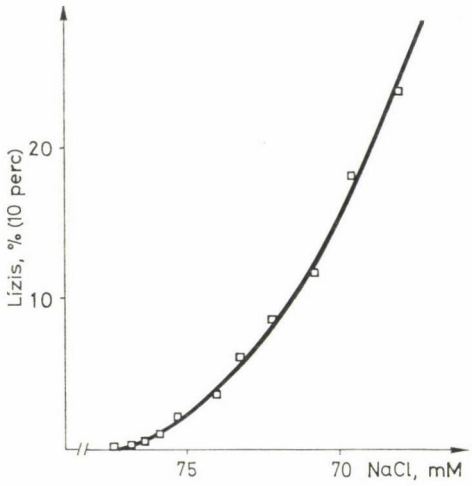
Az új kutatási irányzat és a fenti vitatott eredmények ismeretében tértünk át az egyedi enzim vizsgálatáról az enzimrendszerek vizsgálatára. A továbbiakban nem izom enzimekkel, hanem a vörösvértest enzimeivel foglalkoztunk. Vvt-vel foglalkozott Intézetünkben Friedrich Péter és Solti Magda, valamint Straub Brunó és Biszku Etelka is.

Enzimek, enzimrendszerek lokalizációjának meghatározását próbáltuk megközelíteni — az eddigiektől eltérő módszerekkel, amelyek talán jobban tükröznék a fiziológiás állapotot. — STRAUBnak (1953) egy immár klasszikus eredményéből indultunk ki. Eszerint a vvt membrán — enyhén hipotóniás közegben — átjárhatóvá válik olyan metabolitok számára is, amelyekre nézve egyébként impermeábilis. STRAUBnak sikerült nemcsak „megcsapolnia", de „fel is töltenie" a vvt-t cukorfoszfáttal, GÁRDOSnak (1954) pedig egy különleges trükkel még ATP-vel is.

Megnéztük tehát, hogy a membrán átjárhatóvá válik-e nemcsak kis molekulákra, hanem makromolekulákra, *fehérjékre* nézve is. (CSEKE és mtsai 1978).

Ismeretes, hogy enyhén hipotóniás közegben a vvt-be víz áramlik be és só áramlik ki, a sejt megduzzad. STRAUB és GÁRDOS eredményei szerint a sejt duzzadása megfeszíti a hártyát, amelyen *átmenetileg* pórusok nyílnak és ez teszi lehetővé, hogy a membrán átjárható legyen, egyébként impermeábilis anyagokra nézve. Minthogy a kiáramló sejttartalom lecsökkenti az ozmózis nyomás különbséget, egy idő után a fiziológiás impermeábilitás helyreáll. Hangsúlyozni kívánom, hogy ezen idő alatt a pórusok állandóan nyílódnak és záródnak, a membrán egy pulzáló rendszerhez hasonlítható.

Az enyhén hipotóniás közeg relatív fogalom. Mint ismeretes, az izotónia a 154 mM NaCl oldat ozmózis nyomásának felel meg, mégis az átlagos vvt



7. ábra. Emberi vörösvértest lízisének foka a külső ozmózis nyomás függvényében. Egy térfogat mosott vörösvértestben négy térfogat NaCl oldatot adtunk az abszcisszán feltüntetett koncentrációban és 10 percig tartottuk 0 °C-on, majd a sejteket 900 g-val kiülepítettük. A lízis fokát a sejtmentes felülúszóban található koleszterin tartalomból számoltuk

mintáknál 80—78 mM-os NaCl-dal való kezelés még nem okoz lízist (7. ábra). Amint azonban a NaCl koncentrációt tovább csökkentjük, a lízis erősen növekszik. Megvizsgáltuk, hogy a 80—73 mM NaCl koncentráció tartományban a vvt membrán átjárható-e fehérjékre nézve. A kilenc vizsgált fehérjét és azok mólsúlyát a 2. táblázat foglalja össze. Természetesen vizsgáltuk a K^+ kiáram-

2. táblázat

Vizsgált fehérjék

	Mólsúly
Glikolízis	
3-Foszfoglicerát kináz (PGK)	48 000
Triózfoszfát izomeráz (TPI)	56 000
Tejsav dehidrogenáz (LDH)	140 000
Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPD)	145 000
Aldoláz	160 000
Pentózfoszfát sönt	
6-Foszfoglukonát dehidrogenáz (6-PGD)	105 000
Glukóz-6-foszfát dehidrogenáz (G-6PD)	210 000
Egyéb fehérjék	
Szénsavanhidratáz (CA)	30 000
Hemoglobin (Hb)	68 000

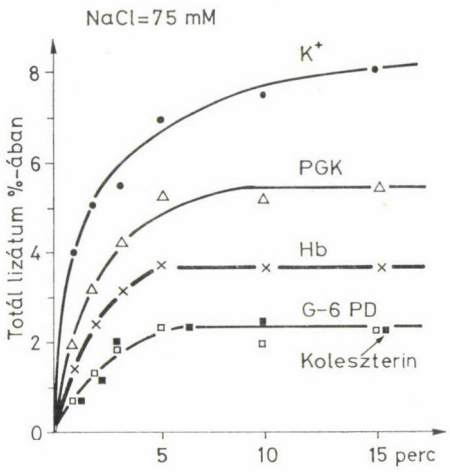
lását is. Mint látható, a 30 000-es mólsúlyú szénsavanhidratáz és a 210 000-es mólsúlyú G-6PD között a legkülönbözőbb méretű fehérjék kiáramlását tanulmányoztuk.

Egy tipikus kísérlet időfüggését mutatja be a 8. ábra. Hogy elkerüljük a túlzsúfolt ábrát, csak három, különböző méretű fehérje kiáramlását tüntettük fel. Mint látható, a fehérjék megjelennek a sejtmentesített felülúszóban, de az eredeti sejttartalomhoz képest, *különböző százalékban*. Tehát a duzzadt sejtek membránja átjárható fehérjékre nézve is. Az elegy egyaránt tartalmazza a lizált sejtekből eredő fehérjéket és a *duzzadt* sejtekből kiáramló fehérjéket. Ezért furcsa jelenség, hogy a G-6PD alacsonyabb százalékban található az elegyben, mint a hemoglobin, hiszen köztudomásúlag a lízis fokát a hemoglobinnal mérik. Ez a jelenség az egész vizsgált NaCl koncentráció tartományban fennáll, ami azt jelenti, hogy a hemoglobin *csak teljes lízis* esetén mértéke a sejt pukkanásnak — egyébként nem az.

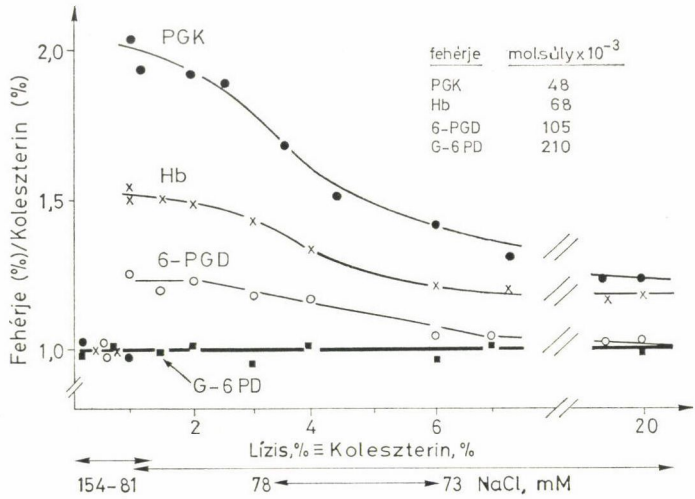
Minthogy a kísérleti körülmények között a lizált sejtek membránja a centrifugálással sejtmentesített felülúszóban marad, úgy véltük, hogy az irreverzibilis sejtpukkanás mértékéül a membrán tartalmat kell vennünk, illetve az ezzel arányos koleszterin tartalmat. A gázkromatográfiás vizsgálatok azt mutatták, hogy a G-6PD a koleszterinnel azonos százalékban található a felülúszóban, tehát *csak* a lizált sejtekből szabadul ki — a duzzadt sejtekből nem.

Itt jegyzem meg, hogy az irodalomban ismeretes egy nem jól deffiniált fogalom — a *praehemolitikus* hemoglobin vesztés jelensége. Valószínűleg ezt a jelenséget észlelte több kutató, csak nem lehetett értelmezni.

A 9. ábrán a lízis fokának függvényében tüntettük fel a kiszabadult fehérjék és a koleszterin arányát. Ebből a kísérlet sorozatból a következők tűnnek szembe:



8. ábra. Részleges lízis időfüggésének tipikus kísérlete. A rövidítéseket vö. 2. táblázat



9. ábra. A kiszabaduló fehérjék és a koleszterin aránya a lízis fokának függvényében. A mosott vörösvértesteket 10 percig inkubáltuk 0°-on különböző, csökkenő koncentrációjú NaCl oldatokban. Minthogy a lízis foka adott ozmózis nyomásnál, a vérmintáktól függően kismértékben változik, az abszcissza alatt jelöltük meg az alkalmazott NaCl koncentráció tartományt. A rövidítéseket vö. 2. táblázat

1. 154 és kb. 80 mM NaCl-dal való kezelés során 0,5 —1,0% lízis észlelhető, azaz valamennyi vizsgált fehérje és a koleszterin azonos százalékban jelenik meg a felülúszóban, arányuk = 1. Ez valószínűleg a manipuláció során megsérült sejtek lízisét tükrözi. A mennyiség függ a vérmintától és saját ügyességünktől. Lehetséges, hogy idetartozik a sejtpopuláció legöregebb frakciója is, amely az ozmózis nyomás csökkenésére nagyon érzékeny (SIMON és TOPPER 1957).

2. Ha azonban az ozmózis nyomást csak csekély mértékben is csökkentjük, a görbe diszkontinussá válik, a 48 000-as mólsúlyú PGK-ból pl. kétszer annyi jelenik meg, mint amennyi a sejtek líziséből várható lenne. A többi fehérje pedig molekulasúlyának megfelelően, rendre egyre kisebb mennyiségben jelenik meg. Úgy tűnik tehát, hogy a vvt membrán — enyhén hipotóniás közegben — *úgy viselkedik, mint egy molekuláris szűrő*, egy molekuláris méretekkel rendelkező szita: minél kisebb egy fehérje, annál nagyobb mennyiségben szabadul ki a duzzadt sejtből.

A jelenséget a következőképpen képzeljük el: ha a fehérjék eloszlása a sejtben egyenletes és az átmenetileg nyitva levő pórusok sugara közel azonos, akkor — első közelítésben — a kiszabadulás valószínűségére a következő lehetőségek vannak: *a)* a fehérje sugara sokkal kisebb, mint a pórus sugara — a kiáramlás valószínűsége igen nagy, *b)* a fehérje sugara közelít a pórus sugár méretéhez — a kiszabadulás valószínűsége egyre csökken és *c)* a két sugár egyenlő, vagy a fehérje sugara nagyobb, mint a pórusé — a fehérje nem szabadul ki. Ebből következik, hogy a *nem-litikus eredetű*, tehát molekuláris szűrésből eredő

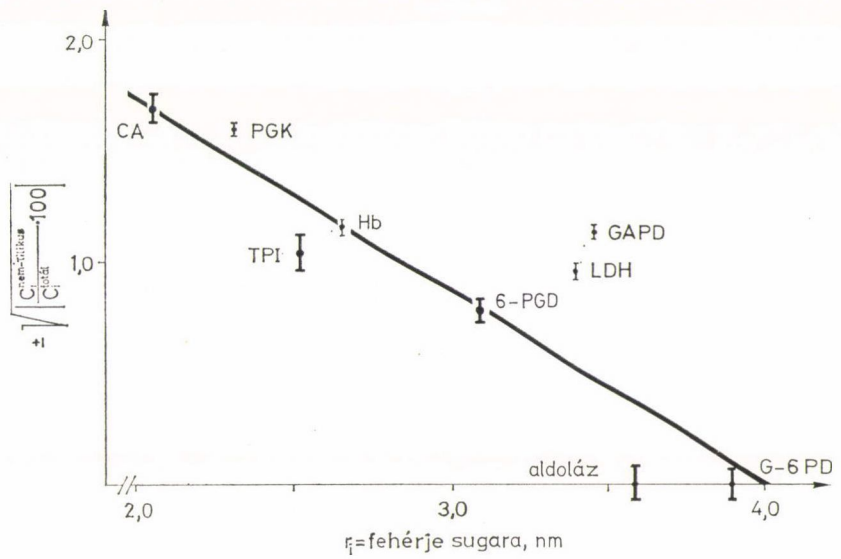
fehérje frakció egyenesen arányos egy olyan kör területével, melynek sugara, a pórus és a fehérje sugarának különbsége (1. egyenlet)

$$\frac{C_i^{\text{nem-litikus}}}{C_i^{\text{total}}} = k\pi(r - r_i)^2 \qquad \text{(1. egyenlet)}$$

ahol k a külső ozmózisnyomás függvénye, r a pórus és r_i a fehérje sugara. Ha tehát a molekuláris szűrésből eredő fehérje frakció négyzetgyökét ábrázoljuk a fehérjesugár függvényében, akkor egyenest kell kapnunk. Mindazon fehérjék pontjai, amelyek egyenletes eloszlásban vannak a sejtben, az egyenesre fognak esni. Azok a fehérjék, amelyek a membránnal vagy egyéb fehérjével komplexet alkotnak, az egyenes alá fognak esni, a komplex K_D-jétől függően. Ha azonban, valamely fehérje a sejtfelület közelében lokalizált, a koncentrációja nagyobb azon a helyen, ahol a molekuláris szűrés bekövetkezik, mint az egész sejtben, az ennek megfelelő pont, ábrázolt összefüggésünkben az egyenes fölé fog esni.

A vizsgált 9 fehérje közül csak *négy* esik az egyenesre, ezek egyike a hemoglobin (10. ábra). Úgy tűnik, ezek a fehérjék egyenletes eloszlásban vannak a vvt-ban és *méreteik* szerinti mennyiségben szabadulnak ki a duzzadt sejtből és a pórus mérete nem nagyobb a C-6PD méreténél.

A vizsgált glikolitikus enzimekkel más a helyzet. Egyik sem esik rá az egyenesre.



10. ábra. A molekuláris szűrés és a fehérjék sugara közötti összefüggés. A függőleges vonalak a standard hibát jelölik. Az ábra értelmezését vö. 1. egyenlet és szöveg. A fehérjék neveinek rövidítését lásd 2. táblázat

1. A PGK-, GAPD- és LDH-ból lényegesen több jön ki, mint amennyi a sugara szerint várható lenne. Ez arra utal, hogy ezek a fehérjék a sejtfelszín közelében a membrán alatt helyezkednek el. Nem valószínű, hogy a membránhoz kötődnek, hiszen akkor várhatóan *kevesebb* lövelne ki belőlük, mint az egyenletes eloszlásban levő fehérjékből. A GAPD-re vonatkozó következtetéseinket újabban megerősítették SOLTI és mtsai (33) eredményei, melyek szerint úgy tűnik, hogy az intakt sejtben triciált jód-ecetsavval jelzett GAPD, a membrán alatt helyezkedik el.

2. Nézzük a TPT-t és az aldolázt. Mindkettőből *kevesebb* szabadul ki, mint amennyi egyenletes eloszlás esetén várható lenne. Az egyenlet értelmezése szerint az aldoláz csak a lizált sejtekből jön ki, pedig a nem sokkal kisebb méretű LDH-ból jóval több áramlik ki, mint mérete szerint várható lenne. SOLTI és FRIEDRICH (1976) egyéb vizsgálatai alapján nagyon valószínűtlen, hogy az aldoláz olyan szorosan kötődne a membránhoz, hogy a duzzadt sejtből ne szabadulhatna ki.

Mint ismeretes, az aldoláz, a TPI és a GAPD egymást követő reakciókat katalizálnak. Mint már említettem, OVÁDI és KELETI (1978), OVÁDI és mtsai (1978), valamint PATTHY és VAS (1978) kimutatta, hogy az izolált izom GAPD komplexet képez az aldolázzal. Plauzibilisnek tűnik, hogy a vvt-ben az aldoláz a TPI-vel és/vagy a GAPD-val alkot komplexet és talán ezért tűnik olyan nagyméretűnek, hogy nem szabadul ki a duzzadt sejtből.

Természetesen, ezeket a komplexeket összetartó erők nem lehetnek olyan erősek, mint pl. a fent említett aldoláz alegységei közötti kölcsönhatások. Az aldoláz, a TPI és a GAPD egy része, a disszociációs állandóknak megfelelően, szabadon kell legyen és kijöhetne a duzzadt sejtből. Ezért lehetséges az is, hogy a kiáramló GAPD mennyisége, ami ugyan az egyenes fölé esik, kevesebb, mint ami helyzetéből adódna, hiszen egy része lehet, hogy komplexben van. Úgy látszik, hogy a szabadon levő aldoláz mennyisége olyan kicsi, hogy nem tudjuk kimutatni.

A 10. ábra adatai tehát *egyrészt* azt mutatják, hogy a vvt membrán enyhén hipotóniás közegben *molekuláris szűrőként* viselkedik, *másrészt* azt is mutatják, hogy a glikolitikus enzimek egy része a sejtfelszín közelében, a membrán alatt helyezkedik el. Két glikolitikus enzim pedig úgy tűnik, hogy komplexet alkot egymással és lehet, hogy egy harmadikkal is.

A vvt-vel végzett vizsgálataink még folyamatban vannak. Azért bátorkodtam belevonni egy akadémiai székfoglaló előadásba nem lezárt munkát is, mert úgy gondolom, hogy mindig az új irányzat az érdekes és előre mutató.

Amikor ezt a munkát összeállítottam, eltűnődtem a fehérje-biokémia fejlődésén az elmúlt évtizedekben. Önkéntelenül is kitört belőlem a „néhai vegyész" és a lebontás és a szintézis analógiája jutott eszembe. Ahhoz, hogy egy vegyület szerkezetét megállapítsuk, ezt mind a lebontás, mind a szintézis

módszereivel igazolni kell. Az enzimek, ill. valamennyi biológiailag aktív fehérje működési mechanizmusának, a működés szerkezeti alapjainak felderítéséhez, a sejteket szét kellett roncsolni. Ebben az időszakban tért át a fehérje-biokémia a jelenségek empirikus leírásáról a tudományos megállapítások korszakába. Ma már ott tart a fehérje kutatás, hogy a szintézis felé tolódhat. Az egyedi fehérje szerkezetének és működési mechanizmusának felderítése mellett, már napirendre került az anyagcsere szabályozása mechanizmusának felderítése, ami a fehérjék egymás közötti és a sejt egyéb alkotó elemeivel való kölcsönhatásokon alapul. Így integrálódik ma a fehérje kutatás a sejtbiológia egyéb ágazataival.

Végezetül nemcsak kutatótársaimnak, hanem laboratóriumunk valamennyi munkatársának (Majzik Illésné, Földi Attiláné, Papp Éva) szeretném kifejezni köszönetemet jó és ötletes munkájukért. Most sem szeretnék megfeledkezni néhai Gróh Gyula professzorról, aki mellett megtanultam dolgozni és szeretve tisztelt mesteremről, néhai Szörényi Imre akadémikusról, aki nemcsak tudományos szemléletre és szigorú kritikára, hanem emberségre is nevelte — az akkori fiatalokat.

IRODALOM

Anfinsen, C. B.: Biochim. Biophys. Acta **17,** 593—594 (1955).
Biszku, E. és Szabolcsi, G.: Acta Physiol. Hung. **25,** 169—178 (1964).
Biszku, E., Boross, L. és Szabolcsi, G.: Acta Physiol. Hung. **25,** 161—167 (1964).
Biszku, E., Sajgó, M., Solti, M. és Szabolcsi, G.: Eur. J. Biochem. **38,** 283—292 (1973).
Cseke, E., Váradi, A., Szabolcsi, G. és Biszku, E.: FEBS Lett. **96,** 15—18 (1978).
Davidson, B. E., Sajgó, M., Noller, H. F. és Harris, J. I.: Nature **216,** 1181—1185 (1967).
Friedrich, P.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **9,** 159—173 (1974).
Fujii, T. és Sato, M.: J. Clin. Chem. **3,** 453—459 (1975).
Gárdos, G.: Acta Physiol. Hung. **6,** 191—199 (1954).
Green, D. E., Murer, E., Hultin, H. O., Richardson, S. H., Salmon, B., Brierly, G. P. és Baum, H.: Arch. Biochem. Biophys. **112,** 635—647 (1965).
Harris, J. I., Davidson, B. L., Sajgó, M. és Noller, H. F.: Enzymes and Isoenzymes. Structure, Properties and Function. Proc. V. FEBS Meeting (1968). Vol. **18,** pp. 1—15. Ed.: D. Shugar. Acad. Press. London—New York (1970).
Hodges, R. S. és Merrifield, R. B.: J. Biol. Chem. **250,** 1231—1241 (1975).
Kant, J. A. és Steck, T. L.: J. Biol. Chem. **248,** 8457—8464 (1973).
Kawahara, K. és Tanford, C.: Biochemistry **5,** 1578—1584 (1966).
Lai, C. Y., Nakai, N. és Chang, D.: Science **183,** 1204—1206 (1974).
Maretzki, D., Groth, J., Tsamakoulas, A. G., Gründe, M., Krüger, S. és Rapoport, S.: FEBS Lett. **39,** 83—87 (1974).
Olsen, K. W., Garavito, R. M., Sabesan, M. N. és Rossmann, M. C.: J. Mol. Biol. **107,** 577—584 (1976).
Ovádi, J. és Keleti, T.: Eur. J. Biochem. **85,** 157—161 (1978).
Ovádi, J., Salerno, C., Keleti, T. és Fasella, P.: Eur. J. Biochem. **90,** 499—503 (1978).
Patthy, L. és Vas, M.: Nature **276,** 94—95 (1978).
Patthy, L., Váradi, A., Thész, J. és Kovács, K.: Eur. J. Biochem. **99,** 309—313 (1979).
Richards, F. M. és Withayathil, P. J.: J. Biol. Chem. **234,** 1459—1465) (1959).
Sajgó, M. és Hajós Gy.: Acta Biochim, Biophys. Acad. Sci. Hung. **9,** 239—241 (1974).
Simon, E. R. és Topper, Y. J.: Nature **180,** 1211—1212 (1957).
Solti, M. és Friedrich, P.: Molec. and Cell Biochem. **10,** 145—152 (1976).

SOLTI, M., BISZKU, E., SAJGÓ, M. és SZABOLCSI, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **10,** 185—199 (1975).
SOLTI, M., BARTHA, F., HALÁSZ, N., TÓTH, G., SIROKMÁN, F. és FRIEDRICH, P.: J. Biol. Chem. (1981. sajtó alatt).
STELLWAGEN, E. és SCHACHMAN, H. K.: Biochemistry **1,** 1056—1068 (1962).
STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Hung. **4,** 235—240 (1953).
SZAJÁNI, B., FRIEDRICH, P. és SZABOLCSI, G.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **4,** 265—272 (1969).
SZAJÁNI, B., SAJGÓ, M., BISZKU, E., FRIEDRICH, P. és SZABOLCSI, G.: Eur. J. Biochem. **15,** 171—178 (1970).
TEPLÁN, I.: MTA Kémiai Oszt. Közleményei **41,** 437—454 (1974).
ZÁVODSZKY, P. és BISZKU, E.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **2,** 109—112 (1967).
YU, J. és STECK, T. L.: J. Biol. Chem. **250,** 9176—9184 (1975).

BELSŐ SZERVI MŰKÖDÉSEK NAGYAGYI ELLENŐRZÉSE*

ÁDÁM GYÖRGY

ELTE Összehasonlító Élettani Tanszék, Budapest

Előadásommal kettős célt tűztem ki magam elé: először is hozzá kívánok járulni a pszichikum és a vegetatívum összefüggéseivel foglalkozó elmélettöredékek, nézet-mozaikok összerakásához, másodszor pedig néhány saját és rokon-adat alapján fel szeretném vázolni a belső szervek nagyagyvelői ellenőrzését célzó kutatások közeli feladatait.

Kiinduló tényként fogadom el egyrészről azt az adatsort, amely igazolja, hogy lelki, magasabb agyi folyamatok mélyrehatóan befolyásolni képesek a vegetatív idegrendszer által szabályozott zsigeri funkciót és hogy a belső szervi viszceroceptív készülék is hatással van a pszichikus tevékenységre. Másrészről szilárd támpontként tekintem azt az igen gazdag, sokrétű, de homályos körvonalú kórcsoportot, melyet neurogén betegségeknek, vagy Wichmann óta vegetatív disztóniáknak, Heténvi szerint vegetatív betegségeknek hívunk.

Sajnos neurobiológus, pszichológus kutatók és klinikusok nagy csoportja e posztulátumoktól még idegenkedik, hiszen tele van az irodalom egymásnak ellentmondó nézetekkel.

A nagy kézikönyvektől kezdve az egyetemi tanfolyamokig tévtanok, torzult nézetek vannak ma is forgalomban az ún. „autonóm" rendszerről nálunk és külföldön egyaránt. Igaza van Szentágothainak, aki így ír: „Az egész idegrendszer, de talán az emberi test egész felépítésében nincs még egy mechanizmus, amelyhez annyi helytelen elmélet, kellőképpen meg nem alapozott vagy éppenséggel zavaros koncepció, látszólagos gyakorlati tapasztalatból leszűrt elgondolás fűződne, mint a vegetatív idegrendszerhez." (SZENTÁGOTHAI JÁNOS: Functionalis anatomia, III. kötet. Medicina, Budapest, 1970.)

A biológia és az orvostudomány történetében, de bízvást állíthatom, hogy egész monista filozófiai szemléletünk fejlődésében történetileg retrográd tendencia volt a pszichikus és a vegetatív funkciók szeparációjáról kialakult 19. és 20. századi felfogás. Miért csak az utolsó évtizedben kezd polgárjogot kapni a pszichovegetaív egység elve? Miért kellett a keleti szemlélet progresszív vonatkozásait „felfedeznünk" (pl. az 1974. évi Új-Delhi-i Élettani Világkongresszus *jóga*, *zen* stb. szimpóziumain) ahhoz, hogy erősítsük azt a tudatunkat, hogy a vérkeringés, az emésztés, a kiválasztás pszichikus ellenőrzés alatt áll? Előadásomban megkísérlem az okokat elemezni.

*Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémián 1980. április 14-én.

A delfoii templom homlokzatára még ez volt felírva: „*Gnóthi szeauton*" — „ismerd meg önmagadat". A humánbiológiai és orvosi tudás gyarapodása az évszázadok során mégis háttérbe szorította e jelmondat által sugallt elvet, azt az egység-szemléletet, mely a pszichikumot a vegetatív és szomatikus működésekkel integrációban tekintette. Számos feljegyzés szól ugyanis amellett, hogy ez a nevezetes felszólítás a saját szervezetünk önismeretét is célozta!

PLATON a „*Charmidész*"-ben Szokratészt idézi:

„. . . Amint a szemeket a fej nélkül és a fejet a test nélkül nem szabad gyógyítani próbálni, éppen úgy a testet sem a lélek nélkül. Hiszen éppen ez az oka annak, hogy a hellén orvosok nem értenek sok betegséghez, mert az *egészet*, amire a legjobban kellene ügyelniök, elhanyagolják; pedig, ha az *egész* van rosszul, lehetetlen, hogy a *rész* egészséges legyen." (PLATON Összes Művei. Stephaneaum Nyomda, Budapest, I. kötet. „Charmides". Ford. Papp János. 177. old.)

Az európai gondolkodás tehát már az ókortól vallotta a vegetatív és lelki működések egységét, méghozzá nemcsak elvont teóriák formájában, hanem a mindennapi gyakorlatban is. Gondoljunk csak a görög és római — egyébként téves — vomitusz-kultuszra, mely nagyon is rokon a mai jógik praxisával! Minden valamire való polgári ház rendelkezett vomitóriummal. A gyomor napi akaratlagos tisztítása éppoly természetes úzus volt a régi Európában, mint a mai Indiában.

A pszichikus folyamatok és a vegetatívum egységének gondolata a közelmúltig sem elvileg, sem gyakorlatilag nem ivódott tehát a biológiai és orvosi köztudatba, méghozzá 4 körülmény miatt:

1. A 19. század közepén fogant és századunkban kiterebélyesedett modern medicina a hallatlanul fontos és sokrétű felfedezések nyomán, óhatatlanul sejt- és szervközpontúvá vált.

2. Ezen organocentrikus szemléletet erősítette a sajátosan párhuzamos, és egymástól szinte hermetikusan elzárt fejlődési vonal, melyet a neurobiológia, a kísérleti pszichológia és a medicina közelmúlt történetében átéltünk. Olyan drámai fordulatot okozó, neurobiológiai felfedezések, mint pl. az alvás és az álom fiziológiai ritmusainak megismerése vagy az agytörzs aktiváló rendszere szerepének feltárása, alig-alig tükröződött a belső szervi funkciókról vallott elméleti és klinikai felfogásunkban, még kevésbé a gyógyításban! Vagy: az emóciók természetének pszichofiziológiai feltárása csak gyér és sporadikus konzekvenciákkal járt a klinikum elméleteiben és gyakorlatában. Sajnos 3 különálló tudományfejlődési vonalról van itt szó, az integráció még várat magára.

3. A szomatikus tartománnyal szemben a vegetatív idegrendszernek nincs képviselete az ún. tudatos szférában. Más szóval a belsőszervi szabályozások általában tudattalanul mennek végbe, ezért a belső környezet állandóságán az ún. homeosztázis biztosításán *kívüli* cerebro-viszcerális kölcsönhatás emberben

nem jár szubjektív élménnyel. E rejtett kutatási területet ezért egyszerűen ignorálták! E kérdéskör elemzésére még visszatérek.

4. Igaz ugyan, hogy a medicina főáramlatába csak megkésve, szinte napjainkban hatol be a cerebrovegetatív egység gondolata, de különböző elméletek már a 30-as években megszülettek. Sajnos ezek a teóriák csak a jelenségek leírásában, a pszichikus történések zsigeri vetületének fenomenológiájában voltak közösek, elvi vonatkozásban egymással homlokegyenest ellentéteseknek bizonyultak. Még a terminológia is különböző volt. Elég, ha a két legnagyobb hatású irányzatot említem: a freudi fogantatású ún. *pszichoszomatikus* tant és a pavlovi gyökerű, ún. *kortikoviszcerális medicinát*. E két nagyhatású elmélet egymást cáfolta: az interferencia-jelenség megakadályozta a pszichovegetatív felfogás bejutását az orvostudomány elfogadott nézet-rendszerébe.

A külső környezet ingereit felfogó és feldolgozó *szomatikus* érző rendszer, valamint a külvilágra ható szomatikus mozgató apparátus nagy- és kisagyvelői képviselete és vezérlése már régóta evidencia számba megy, hiszen a múlt század derekán Fritsch és Hitzig, Flourens és mások úttörő felfedezései éppen a kortikális, cerebrális és kisagyi szomatikus vetületek és lokalizációk terén születtek. Az emberi neurológia és agysebészet empirikus adatai a cerebroszomatikus integráció elvét még csak jobban aláhúzzák, annál is magától értetődőbben, mivel a szomatikus érző- és mozgató működés zöme egyaránt tudatosul emberben.

Másként áll a helyzet a belső szervi szabályozásokat végző vegetatív rendszerrel. Amióta anatómusok leírták és fiziológusok jellemezték a szimpatikus és paraszimpatikus 2-neuronos pályákat, általánossá vált ezt a készüléket (1) kizárólag végrehajtó, centrifugális rendszerként tekinteni, és (2) a cerebroszomatikus tartománytól különállónak tartani, innen a ma is használatos terminus: „autonóm" idegrendszer. Ma már tudjuk, hogy egyik megállapítás sem állja meg a helyét. Gaskell és Langley idejében még nem ismerték fel annak jelentőségét, hogy a zsigerekhez futó efferens kötegeken kívül a belső szervekből gazdag érző pályarendszer visz impulzusokat az agyvelő felé. E viszcerális afferens készülék a szomatikus érzőrendszerrel együtt halad, felépítése és lefutása azzal azonos. E viszcerális receptív apparátus — mint később látni fogjuk — speciális szerepet játszik a belsőszervi funkciók agyi kapcsolataiban.

Ami pedig a viszcerális idegkészüléknek a szomatikus rendszerrel való kapcsolatát illeti, sok előtanulmány és szórványos adat összegyűjtésével Paul Dell 1952-ben megjelent, fontos forrásértékű dolgozatában egyértelműen bizonyította: a vegetatív és a szomatikus szféra a központi idegrendszer minden szintjén, a gerincvelőtől kezdve egészen az agykéregig szét nem választhatóan összefonódik. A két rendszer inkább kiegészíti egymást, semmint elkülönülne és nagyagyi képviseletük folytán mindkettő cerebrális vezérlés alatt áll, egyben mindkettő befolyásolja a magasabb idegi funkciókat. Az agykérgi és kéreg alatti vegetatív projekciókról ugyanis már Bechterev múlt századi megfigyelései óta

gyűlnek az adatok, mára már az egész cerebrális vegetatív neuron-hálózatot feltérképezték, elég, ha a MacLean által „viszcerális agyvelő"-nek nevezett rejtett helyzetű *limbikus* struktúrára gondolunk. Tekintélyes neuroncsoportok képviselik a vegetatív funkciókat az agykéreg frontális és orbitális területein, feltárták a talamusz viszcerális mezőit is. A hipotalamusz pedig köztudottan, egyebek mellett hatalmas vegetatív centrum is.

Adott tehát a szomatikus idegrendszerhez hasonlóan kiépült teljes készülék, mely a belső szervi szabályozást szolgálja. E készülék érző és mozgató pályákkal és hierarchikusan egymásra épülő központokkal rendelkezik. Miért, hogy mégis idegen maradt ezen vegetatív apparátus pszichikus kontrolljának gondolata?

A nyilvánvaló okot az imént érintettem: a vegetatív funkciók direkt élmények nélkül, tudaton kívül zajlanak, jelenségeik csak extrém esetekben válnak tudatosakká. A pszichovegetatív vezérlés eszméjének elfogadása tehát egyben a tudattalan pszichikus tartalom elismerését is jelenti.

A tudat rekesszerű felépítése, tehát egy vagy több tudaton kívül pszichikus tartomány létezése, a pszichológusok többsége által elfogadott elv. A pszichológia történetében Spinozától kezdve Leibnitzon át Pierre Janet-ig nem tudták másképp elképzelni a személyes tudatot, mint hierarchikus tagolt építményt, mely magába foglalja a világos tudati szférát (esetleg több ilyen tudatos tartományt), valamint tudaton kívüli pszichikus területeket.

Ma inkább egymás mellé, mint fölé rendelt tudati rekeszről (kompartimentumról) kell beszélnünk, melyek közül adott pillanatban általában az egyik dominál. Hierarchikusan csak az ún. *„őrpont" (Pavlov)* vagy *„rejtett megfigyelő" (Hilgard)* tekinthető e rekeszek vonatkozásában *állandóan aktív állapotban.* A tudattartalom átjutása az egyik rekeszből a másikba normális, állandó folyamat — enélkül nincs fiziológiás agyműködés.

Pierre Janet írta le először tudományos igénnyel a tudat rekeszeit, bevezette a *tudat alatti* (tudatba hozható) terminust a régebbi (von Hartmann-féle) *tudattalan* mellett. Ő *disszociációt* említ a pszichikumban (az *asszociáció* ellenpárja: disz-asszociáció). Nyomában született meg Sigmund Freud elmélete, ez a nagyhatású, szuggesztív sajátos tudati rekesz-teória a maga *tudatelőttes — tudattalan — tudatos hármas* kategóriájával.

A pszichológiai és pszichiátriai irodalomban szinte mindegyik jól érvelő, egzakt módon dokumentáló tudat-hipotézis több, önmagában zárt egységet tartalmazó tagolt szerkezetet feltételez.

A tudat kompartimentum-szerű felépítését az elmekórtannak a *hisztériás*, valamint a *skizofréniás* tünetcsoportról vallott felfogása is alátámasztja, mindkettőre jellemző a disszociált tudatzavarok egész skálája.

A tagolt tudati blokkok hipotézisét számos morfológiai tudat-elmélet erősíti meg. Donald Hebb sejtegyüttes (cell-assemblies) elvét szinte az egész mai pszichofiziológia átvette. Szentágothai János agyi modulokról szóló elmélete

szintén statisztikusan funkcionáló, izgalmi és gátló egységekből álló neuronblokkokat feltételez.

Tagolt tudati szerkezetre utalnak saját régebbi és újabb vizsgálataink is, mind az alvás és ébrenléti ciklus elemzésében, mind a hipnózis-kutatásban, mind pedig a szubszenzoros tudattalan viszcerális befolyás tanulmányozásában.

Számos adat utal ugyanis arra, irodalmiak is, saját megfigyeléseink is, hogy lélektani szempontból a vegetatív afferens és efferens működés tudaton kívüli pszichikus kompartimentummal áll kapcsolatban. Valószínű, hogy legalább két mechanizmus létezik, melynek segítségével a tudattalan pszichikus tartalmak — így a vegetatívak is — tudatba hozhatók: egyik a *figyelem* funkciója, másik a *tanulás* folyamata.

Előadásomban sorra veszem a ma is ható — sajnos egymásnak sok tekintetben ellentmondó — pszichovegetatív elméleteket, hogy ezek hátterében, néhány saját eredményünk illusztrálásával, megkíséreljem felvázolni a cerebroviszcerális kapcsolatok kutatásának távlatait és korlátait.

Történeti sorrendet követve először a *pszichoszomatikus* irányzatról kell említést tenni, mely századunk első felében a pszichoanalitikus elmélet talaján alakult ki, mely azonban a mai klinikusok többségének nézet-rendszerében azonosult előadásom tágabb témájával a pszichovegetatív kérdés-körrel. Már maga a terminus is, sajnos, sok zavart keltő, hiszen alkotói a „*szóma*" kifejezés alatt az *egész* szervezetet értették, tehát implikálták az élettani értelemben vett „szómán" kívül *a vegetatívumot is*. Már pedig a fiziológia és az egész medicina Bichat óta *szomatikus* funkció alatt a *környezettel kapcsolatos* idegi tevékenységet érti *a belső környezet* szabályozását végző *vegetatív* működéssel szemben.

A „pszichoszomatikus" kifejezés tehát már önmagában helytelen, félrevezető, korszerűtlen! A belső szervek pszichikus ellenőrzésének vonatkozásában a szó valódi értelmében a *pszichovegetatív*, *pszichoviszcerális*, esetleg *cerebroviszcerális* vagy *cerebrovegetatív* terminusok fejezik ki a kölcsönhatásban levő rendszerek alkotóelemeit. De a „pszichoszomatikus medicina" megnevezés egyben mégis informatív és jellemző is, jelzi, hogy eredeti használói, miközben felismerték a belső szervek pszichikus vezérlésének jelentőségét, a „szómát" freudi értelemben inkább szimbólumnak tekintették, semmint konkrét élettani funkciók rendszerének. Nem csoda, hiszen fiziológiai szempontból a pszichoszomatikus irányzat abszurditása épp szimbólum-jellegében rejlik! Flanders Dunbar és Franz Alexander a század derekának e két freudista vezető egyénisége 7, ill. 8 betegséget sorolt a pszichoszomatikus kategóriába, melyek között a csontfrakturákat és a diabeteszt egyaránt megtaláljuk! A bronchiális asztma az anya elvesztésétől való félelem, a gyomorfekély a szeretet iránti vágy, a tireotoxikózis a halálfélelem szimbóluma stb. Így torzult el a „locus minoris resistentiae" józan orvosi elve sajátos mítosz-rendszerré, melyet sajnos a mai pszichoszomatikusok jó része sem korrigált! Ez az extrém, szélsőséges irányzat a maga afiziológiás, misztikus sejtéseivel diszkvalifikálta a pszichovegetatív

komoly törekvéseket és — mint említettem — nagyban hozzájárult ahhoz, hogy a medicina fősodra mindmáig alig vonzotta magához a cerebroviszcerális kutatások áramlatait.

A pszichoszomatikus tan a maga idejében viszont úttörő jelentőségű, nagyhatású teória volt, mely először világított rá a pszichikum és a belső szervek működésének sokszálú kapcsolatrendszerére és amely egyben rámutatott e folyamatok tudattalan jellegére. Felismerte ezenkívül a személyiségjegyek döntő fontosságát a pszichovegetatív folyamatok manifesztációjában. Ma sincs megegyezés arról — sem a pszichoszomatikusok körén belül, sem azon kívül —, hogy mely kórképek tartoznak a patológiás pszichovegetatív funkciókörbe, de a személyiségtípusnak mint vízválasztó tényezőnek szerepét senki sem tagadja.

A belső szervi folyamatok nagyagyi ellenőrzésének problémáját a pszichoszomatikus iskolákon kívüli legtöbb ágazat a *tanulás* oldaláról közelíti meg. Érdekes, hogy a pszichoszomatikusokhoz hasonlóan ezek a *feltételes reflexes viszcerális* elméletek is a gazdag klinikai észleletek nyomán, azok sugallatára születtek. Ezek az irányzatok kiindulásként elfogadják és felhasználják a vegetatív idegrendszer felépítéséről és integratív funkciójáról való anatómiai és élettani adatokat, melyekről az imént volt szó.

Pavlov munkatársa, Citovics még 1918-ban hangingerekre, mint feltételes jelzésekre kondicionált érreflexeket épített ki. Ez volt az első dokumentált kísérlet abban a nagyjelentőségű experimentális és klinikai tevékenység-sorozatban, mely Konsztantin Bikov és munkatársainak nevéhez fűződik és amely az 1950-es években érte el tetőpontját. Bikov először feltételes reflexes vesemőködésváltozást hozott létre kutyákon, a pavlovi klasszikus kondicionálás szabályai szerint, majd ezt a feltételes reflex-eljárást a legtöbb viszcerális szervrendszer tanult funkcióváltozásának bizonyítására használta fel. Külvilági tanult jelzések útján befolyásolni tudta a kardio-vaszkuláris apparátust, a tápcsatorna működését, sőt a hormonális rendszert is stb.

Bikov és széles munkatársi gárdája az akkori idők egzaktnak tűnő élettani módszereivel kísérelte meg a cerebro-vegetatív tanult hatások részletes elemzését, ők fiziológusokként jártak el és — legalábbis főbb vonásaiban — igyekeztek a tanult zsigeri működésváltozások pályáit és agyi szerkezeteit is leírni. Sajnos, e téren nem tudták kivonni magukat az akkori kor szimplifikáló, sémákban gondolkozó áramlatai alól, így az irányzatot *kortiko-viszcerális fiziológia és patológia* terminussal jelölték, a feltételes reflexes zsigeri módosulásokban mindig egyedül csak *agykérgi* mechanizmust kerestek és feltételeztek és megelégedtek a tanult viszcerális mechanizmusok széles körének nagy vonalakban való leírásával, elmulasztván a pontos agyi folyamatok részletes elemzését. Ez a hallatlan szuggesztív és egyben felületesen extenzív pszichofiziológiai irányzat — sajnos — sajátos tudománypolitikai divatáramlat eszköze is lett. Volt idő, amikor nagy szovjet és más országokbeli klinikák és intézetek minden kutatásukat „kortiko-viszcerális"-nak igyekeztek átalakítani!

Érdemes volna és feltétlenül szükséges is a Bikov-féle zsigeri tanulási elmélet történetét és kritikai elemzését elvégezni, hiszen ez az áramlat igen vonzó módon, igaz, nem kevés hivatalos adminisztratív támogatással, magával ragadta a kutatók és klinikusok széles rétegeit. A divatkorszakot — mint annyiszor a tudomány történetében — kiábrándulás, csömör követte. Így aztán, sajnos „a fürdővízzel a gyereket" jólismert séma érvényesült: ma már e problémakör maradék kutatói csak töredék-kérdésekkel foglalkoznak. Pedig ma is érdemes elővenni Bikov, Psonik, Kurcin vagy Csernigovszkij monográfiáit, szinte árad belőlük a félig vagy egyáltalán meg nem válaszolt izgalmas kérdések, ma is aktuális gondolatok sora.

Elég viharosnak jellemezhető három évtizednyi (1926—1955) tevékenység után az ún. kortikoviszcerális irányzat félig kész építményként áll előttünk. Gondolatelemeit, megfigyeléstégláit azonban széles körben felhasználják. Érdemes itt megemlíteni a klasszikus pavlovi irányzatot követő ún. *viselkedésterápiai* irányt a nyugati féltekén, melynek képviselői: Eysenck, Wolpe, Astrup és mások sikeresen alkalmaznak kondicionálási technikákat neurotikus kórképek gyógyításában.

A tudománytörténet epizódjai sokszor ismétlődnek. A pavlovi—bikovi irányzat közvetett módon inspirált egy újsütetű pszichovegetatív tanuláskutatási áramlatot, amely főleg szintén a nyugati féltekén vált széles körű tevékenységgé. Kezdeményezői azt a behaviorista „dogmát" igyekeztek cáfolni, melyet Skinner és követői hangoztattak, melynek értelmében az instrumentális vagy operáns tanulás szabályai csak a szomatikus szférára érvényesek, nem vonatkoznak tehát a vegetatív készülékre, amely úgymond, „autonóm", mentes tehát a pszichikus befolyásoktól.

Az irányzat alapkísérlete a Thorndike-féle effektus-törvény elvén alapszik, mely szerint egy véletlenszerű élettani változás (pl. mozgás) utólagos jutalmazása (megerősítése) a módosulás megjelenésének gyakoriságát növeli. Így pl. Herbert Kimmel 1960-ban emberi bőrgalván-változást „jutalmazott" azzal, hogy az egyébként szubjektív élmény nélkül lezajló bőrellenállás változást műszeres megjelenítéssel visszajelezte a vizsgált személynek. A műszeres visszajelzés a humán operáns viszcerális tanulás egyik alapmetodikája: alkalmazói az egész irányzatot — eléggé félresikerült elnevezéssel — „biofeedback"-elvnek nevezik. A tavalyi év végéig mintegy félszáz állatkísérleti és 200 klinikai „biofeedback" közlemény, tucatnyi monográfia jelent meg, de népszerűségének és divatos vonásainak mai csúcspontján az irányzat csupán az alapok lerakásánál tart. Neal Miller szerint eddig jobbára előkísérletek folytak, a módszeres vizsgálat kilátásainak becslésére, a témakör épp hogy eljutott a jól ellenőrzött kutatási stratégia megalkotásáig. Mindenesetre a klinikai próbálkozás mintegy tucatnyi kórképcsoport zsigeri tanítás által történt befolyásolására terjedt ki a jól ellenőrizhető kardiovaszkuláris változásoktól egészen az epilepsziás görcstevékenység módosításáig.

A „biofeedback"-területet a „kortikó-viszcerális" iránnyal összehasonlítva, számos hasonlóság, ill. érintkezési pont állapítható meg.

1. Mindkét irányzat alapvető fiziológiai tanulási elméletekből alkotta elméleti bázisát: a Pavlov-féle, ill. a Thorndike-i kondicionálási teóriából.

2. Mindkét teória erős klinikai érvcsoportot tudhatott magáénak: az ún. vegetatív betegségek problematikája erősen inspirálta a 2 kutatási irányt, a klinikai kazuisztika motiválta a kutatást.

Ebből a szempontból egyik irányzat sem mentes a pszichoszomatikus felfogás hatásától, bár elveiben mindkettő tagadja a freudi koncepció legtöbb elemét.

3. Mindkét kutatási területet tekintélyes népszerűségi hullám kísérte, mely — a többi tudományos divatáramlathoz hasonlóan — a kutatást serkentette és nehezítette egyben.

4. Mindkét zsigeri tanulási mechanizmus feltárása csak a kezdeti lépésekkel dicsekedhet. A kortikoviszcerális medicinához hasonlóan a „biofeedback"-kutatás is jobbára empirikus stádiumánál tart.

5. Kevéssé ismert e kétféle feltételes zsigeri reflex-mechanizmus egymással való összefüggése, esetleg kölcsönhatása. Valószínű, hogy a klinikai esetek a kétféle folyamatot „kevert" formában, egymással átfedésben produkálják. Lehet, hogy a terápiában is kombinálni kell majd a két megközelítést.

Saját kutatásaink még az 50-es években részét képezték a Bikov-féle vizsgálatoknak, a veseműködés tanulás útján történő glomeruláris és tubuláris változtatási lehetőségeit írtuk le. A későbbiek folyamán az elsők között voltunk, akik a Skinner-féle operáns tanulás mechanizmusát igazolták viszcerális területen.

Jelen előadásomban inkább a jövőbeni pszichoviszcerális kutatás távlatait és korlátait kívánom a különböző irányzatok történeti hátterében felvázolni, semmint elszámolni régebbi eredményeinkkel. Valószínűnek tartom ugyanis, hogy a vegetatív készülék által szabályozott belsőszervi területen tanulási mechanizmusok érvényesülhetnek, de e folyamatok alapvető törvényei nagyrészt ismeretlenek. Előttünk áll tehát a *pszichovegetatív jelenség* a maga fenomenológiai szintjén anélkül, hogy a folyamat számos részfunkcióját ismernénk.

1. Nem ismert a cerebro-viszcerális *mediáció* szerkezeteinek szerepe. Nem tudjuk, létezik-e „tiszta" nagyagyi-vegetatív befolyás vagy minden belsőszervi tanulási folyamat szomatikus közvetítéssel történik.

2. Nem ismeretes, *mely szervrendszerek* működése befolyásolható egyáltalán pszichikus hatásra. Még azt sem tudjuk, hogy létezik-e szervspecifikus zsigeri tanulás, vagy ez csupán egy generalizált homeosztatikus adaptáció része?

3. Nagyrészt ismeretlenek még az optimális tanulás *paraméterei* és programjai és főleg: milyen tartós lehet a tanult működésváltozás?

4. Nem ismerjük *a visszajelzés* lehetséges szerepét. Itt a belsőszervi, viszceroceptív természetes információ részvételére gondolunk elsősorban, de ún. „biofeedback" technika esetén a külső, műszeres jelzés hatékonyságát is elemezni kell.

5. Ismeretlen még a zsigeri tanulási hatékonyság összefüggése *a személyiségtípussal*, nem tudjuk, hogy a szervezet típusjegyei között a viszcerális kondicionálhatóság képessége is szerepel-e?

6. Végül: feltáratlan *a kétféle tanulási* stratégia egymáshoz viszonyított hatékonysága, illetve az előbb érintett probléma a „kevert" tanulási mechanizmusról.

E pontokba szedett „hiánylista" természetesen korántsem teljes, hiszen pl. nem foglal magában klinikai vonatkozásokat, melyek túlnőnek az előadó kompetenciáján. És még azt a leglényegesebb kérdést is megkerüli, vajon a zsigeri funkciók csakis tanulás által módosíthatók-e, avagy elegendő *a relaxáció*, a testi-lelki lazítás tudatos alkalmazása. Mind több közlemény számol be ugyanis arról, hogy a belső szervek nagyagyi befolyásolásában leghatékonyabb az ún. *anti-stressz modell* alkalmazása.

Ezen relaxációs eljárás hívei szerint a stressz-szituáció vegetatív kórképeket vált ki a legkisebb ellenállás helyén és hipertenzió, szorongásos kórképek stb. keletkezhetnek. E vonatkozásban nézetük hasonló a pszichoszomatikusok „betegségbe való menekülés"-elvével, ill. a kortiko-viszcerális patológia konfliktus-neurózis tanával. De a közös vonásokon túlmenően a relaxáció hirdetői szerint az emberek egy csoportja nem képes a megterhelő stresszhatásokat lazítással, pihenéssel, elernyedéssel spontán módon oldani, ezt tréning útján kell gyakoroltatni. Számos lazítási eljárás között a Schultz által ajánlott ún. *autogén tréninget* említem. Sok kutató a relaxációt klasszikus vagy operáns kondicionálással kapcsolja egybe.

Munkacsoportunk pszichoviszcerális vizsgálatai során ezideig nem tudta magát sem a visszajelzéses, instrumentális, sem a klasszikus pavlovi zsigeri kondicionálás mellett elkötelezni, de a vizsgált személynek instrukció útján, tehát kognitív eszközökkel megindított relaxációjának nagyfokú effektivitását sem vonhatjuk kétségbe. Szívritmus-lassítási tréning esetében, a személyek egy részében a puszta lazítás éppoly hatásos, mint a szívfrekvencia folyamatos műszeres visszajelzése. Más szóval az az egyén, aki a műszeres „biofeedback" előtt nem rendelkezett valamely bradikardizáló képességgel (relaxáció, imagináció, esetleg légzési mediáció), az a visszajelzés hatására sem tett szert új képességre. Aki viszont sikeres tréninget produkált „biofeedback" alatt, az megelőzőleg is „tehetséges" szívritmus-lassító volt, a visszajelzés csak segítette a meglevő arzenálból kiválasztani a megfelelő leghatásosabb egyéni módszert. E megállapításunkat számos tény támasztja alá, melyekre itt nem térhetek ki.

Két sejtésünkről viszont szeretnék számot adni, mert nézetem szerint

mindkettő a távlati kutatás kulcskérdései közé tartozik majd. Az egyik az ún. *placebo*-problémára vonatkozik, a másik pedig a zsigeri működés pszichikus befolyásolásának *személyiség*-vonzatára.

Saját humán zsigeri kondicionálási adataink, a velünk partneri viszonyban álló Neal Miller és David Shapiro által vezetett kutatások eredményeivel egybehangzóan azt sugallják, hogy a hatékony kardio-vaszkuláris vagy gasztrointesztinális akaratlagos működésváltozás mögött a vizsgált személynek a procedura iránti várakozása, kívánalma, a remélt — és sok esetben jutalmazott — eredmény *anticipációja* áll. Számos összetevő lehet itt hatékony: a vizsgálatot vezető orvos személyisége, a be- és kikapcsolódó műszerek halmaza, a tréning-eljárás szertartása stb. Mindezek hallatlanul erőteljes *szituációs feltételes ingerek*, melyeket az irodalom „placebo" terminussal jelöl. Némely ortodox „biofeedback" kutatók igyekeznek — igaz sikertelenül — a placebo-hatást kiiktatni vagy csökkenteni, pedig ez elvileg lehetetlen. Hiszen a zsigeri tréning lényegi eleme a vizsgált személy várakozása, óhaja, érdekeltsége, melyet a kísérleti helyzet egésze mint komplex feltételes inger indít meg.

A „placebo" kifejezést a latin igéből képezték, jelentése közismert: „tetszeni fogok" vagy „kellemes leszek". A. K. Shapiro a placebót a következőképpen definiálta: „Bármely olyan szer vagy eljárás pszichológiai, fiziológiai vagy pszichofiziológiai hatása, melyet terápiás céllal alkalmaztak és amely független . . . a gyógyszer farmakológiai hatásától vagy az eljárás specifikus effektusától és amely pszichológiai mechanizmus útján működik."

A placebo-hatás pszeudo-terápia, tulajdonképpen álgyógyítás, de ugyanekkor hallatlanul fontos, mindmáig feltáratlan mechanizmus szerint működő *pszichikus* tényező, mely — meggyőződésünk szerint — a pszichovegetatív folyamat mindenkori fő komponense. Véleményem szerint ezt a tényezőt nem lehet, nem is szabad kiküszöbölni, hanem mechanizmusát egzakt módszerekkel fel kell tárni és adekvát módon meghatározni helyét a cerebroviszcerális kölcsönhatásban. A placebo-reakció némely tényezőjét részletesen tanulmányozták, így az orvos—beteg kapcsolat interperszonális hatását (Goldstein 1962), a szituációs tényezőket (Orne 1962) a szuggesztiós momentumokat (Torrey 1972). Mindezen faktorok feltételes jelzések részei. Meggyőződésünk, hogy a placebo-jelenség a klasszikus feltételes reflex szabályai szerint működő ún. állapot-függő tanulás, szituációs válaszegyüttes. A placebónak kitett személy *anticipációs tevékenysége* az a fő pszichikus tényező, amely a vegetatív változásokat működésbe hozza. Így nem lehetetlen hogy ha akár a pavlovi modell szerint, akár az instrumentális kondicionálás szabályai szerint, akár pedig relaxációs utasítás sémája szerint indítunk meg belsőszervi válaszreakciókat módosító tréning-programot, *a közös nevező mindhárom eljárásban a placebo-effektus*. A kutatók egy része a placebo-hatás generalizált, nem szervspecifikus jellegét állítja szembe a specializált zsigeri kondicionálással. De számos adat utal arra, hogy a kiépülés körülményeitől függ, hogy ez a szituációs válasz meny-

nyire specifikus vagy mennyire generalizált. Több szerző, így mi is, specializált, a pavlovi differenciáló gátlás szabályait követő placebo-választ figyeltünk meg.

A placebo-hatás, mint minden pavlovi típusú feltételes válasz, dekrementumot mutató, kialvó, az idő függvényében csökkenő intenzitású jelenség. Ez a körülmény szab határt vizsgálatának és alkalmazásának, de e tulajdonság szabályainak jövőbeni pontos megismerése egyben módot nyújt arra, hogy a kutató vagy a klinikus finoman, célszerűen variálja az alkalmazandó placebo változásait.

Trousseau-tól származik a szellemes felszólítás: „A lehető legtöbb beteget sietve gyógyítsunk meg az új gyógyszerrel, amíg az még megőrzi gyógyító erejét." Melyik orvos ne tapasztalta volna egy új gyógyszernek, egy új technikának a valódi hatásmechanizmusra ráépült placebo-hatását? És megfordítva: hány és hány szerről utólag derült ki, hogy voltaképpen placebo-gyógyszer és hány sebészi beavatkozásról, hogy placebo-eljárás volt! Több szerző mutat rá arra, hogy a gyógyítástörténet tulajdonképpen placebo-história: elég ha a purgálás vagy az érvágás általános múltbeli gyakorlatára gondolunk!

A placebo-hatás személyiségtípustól függően jelentkezik, vagy marad el. Laboratóriumunkban megvizsgáltuk a placebo-reaktivitás összefüggését egy általunk vizsgált másik személyiségjeggyel a hipnózis iránti fogékonysággal. Egy 48 főből álló csoport álgyógyszeres placebót kapott. 38-an bizonyultak placebo-reaktoroknak, de semmiféle összefüggést a hipnábilitással nem sikerült kimutatni. Nem jelentkezett összefüggés a vizsgált személyek aktuális szorongási szintjével sem. Ellenben szoros korreláció volt a placebo-reakció, valamint a placebót adó és kapó személy interperszonális kapcsolatának szintje között. A placebo elvesztette hatékonyságát, ha a megszokott orvos vagy pszichológus helyett a szert ismeretlen személy adta. Úgy tűnik, hogy a placebo-reaktivitás szituációs jelzései között a személyi relációk döntő jelentőségűek. Meggyőződésem, hogy a placebo-jelenség elemzése a kísérleti pszichológia, a gyógyszerkutatás és az elméleti medicina egyik legsürgetőbb jövőbeni feladata, melynek előrehaladásától függ — többek között — előadásom tárgyának, a cerebroviszcerális kapcsolatok feltárásának szintje is.

A placebo-reakció imént említett személyiség-vonzata egyenesen átvezet bennünket a pszichovegetatív jelenség másik kulcsproblémájához: a zsigeri tanulásnak az alkattól, a személyiségtől való függéséhez.

Saját eredményeink sok más szerző adataival egybehangzóan azt a sejtést igazolják, hogy adott viszcerális tanulási teljesítmény tekintetében vannak „tehetségesebb" és kevésbé „tehetséges" tanulók. Ez a csoportosítási lehetőség minden vizsgálatunkból és külföldi partnereink kísérleteiből is önként adódott. Miután tanszékünkön évek óta folynak hipnózis iránti fogékonyság szempontjából személyiségvizsgálatok, felmerült a lehetőség, hogy talán összefüggés áll fenn a viszcerális kondicionálási teljesítmény és a hipnábilitás között. Példa-

ként említem tizenkét egyén teljesítménynek eredményét, melyből kitűnik, hogy az erősen hipnábilis személyek között vannak jól és kevésbé jól teljesítők a bradikardiás kondicionálás vonatkozásában, mint ahogy a közepesen és gyengén hipnábilisak között is. Úgy tűnik tehát, hogy nincs egyenes korreláció a hipnotikus fogékonyság személyiségvonása és a sikeres pszichoviszcerális reakció típusjegye között. A közeljövő fontos feladata a viszcerális tanulás személyiség-komponenseinek analízise. Valljuk ugyanis, hogy semmiféle klaszszikus feltételes zsigeri válasz, semmiféle „biofeedback"-terápia vagy más viszcerális kondicionálási eljárás nem ültethető át a gyakorlatba a személyiségháttér gondos és alapos tisztázása nélkül. Bizonyos ugyanis, hogy amíg valamely belsőszervi tudattalan folyamatnak műszeres vagy verbális visszajelzés útján történő tudatba hozása *egyes egyénekben gyógyító hatású* és elősegíti az egészséges önellenőrzést, addig más személyekben ugyanez a „tudatosítási" tréning és önmegfigyelés *kóros circulus vitiosus* megindítója lehet. Nem lehetetlen, hogy amit a mindennapi nyelvben *hipochondriának* nevezünk, nem bizonyul majd másnak, mint zsigeri „túltanulási" vagy „túlfigyelési" effektusnak az emberek bizonyos csoportjában, akiknél inkább a tudattalanítás, a felejtetés, semmint a tudatba hozás lesz majd normalizáló hatású! A viszcerális kondicionálási területtől sem idegen tehát a jatrogén ártalom lehetősége, amely minden humán vizsgálat veszélye lehet.

A viszcerális tanulás mechanizmusában már régóta fontos szerepet tulajdonítottunk a zsigeri területről kiinduló afferens visszajelzéseknek, melyek a megfelelő viszceroceptív pályák útján a homeosztázishoz szükséges információkon felül és kívül, esetleg jelzik a felső agyi központoknak a plasztikus módosítás vagy tanult működésváltozás mennyiségi és minőségi viszonyait. Munkatársaimmal együtt évek során át egy központi kérdés foglalkoztatott bennünket: vajon a homeosztázis biztosításán kívül, tehát a belső környezet szabályozásában való jelzőműködéseken felül van-e a zsigeri érző apparátusnak fiziológiai vagy pszichológiai szerepe, *létezike-e extra-homeosztatikus viszceroceptív* hatás? Más szóval: a sokféle állatkísérletben és emberi interoceptív vizsgálatunkban kapott számos adatunk alapján kimondhatjuk-e, hogy a viszceroceptív apparátus sajátos, jól szervezett belső környezeti érzékszerv, vagy pedig az általunk nyert bizonyító adatokat túlbecsültük és a zsigeri afferens rendszer esetében nincs talán másról szó, mint diffúz elhelyezkedésű, kis denzitású, rudimenter, szétszórt végződésekről?

Régebbi adataink 2 fő irányból származtak. *Először:* viszcerális eredetű feltételes reflexeket építettünk ki és kimutattuk a zsigeri jelzés cerebrális diszkriminációs képességét méghozzá mind klasszikus, mind instrumentális kondicionálási, mind pedig elektrográfiás program alkalmazásával. *Másodszor:* vizsgáltuk az emberi viszcerális érző bemenet viszonyát a tudathoz. Ismételten igazoltuk, hogy nem-fájdalmi jellegű viszceroszenzoros impulzusok tudattalanok maradnak, ugyanakkor feljutnak a nagyagyvelő különböző szintjeire.

Azt is kimutattuk, hogy embereket verbális visszajelzés segítségével meg lehet tanítani a zsigeri változások felfogására, detektálására.

Külön gondot fordítottunk — különösen az utóbbi években — a belsőszervi érző impulzusok *intenzitási problémáira*. Ha ugyanis e rejtett zsigeri érző készülék érzékszervként működik, úgy egy *intenzitási kontinuum* mentén a többi exteroceptív érzékszerv pszichofizikai törvénye értelmében intenzitásnövekedéskor hatásváltásnak kell bekövetkeznie. Különböző kísérletsorozatokban vizsgáltuk éber macskák spontán és kiváltott agyi elektromos aktivitását, patkányok és majmok veleszületett és tanult viselkedését, valamint — mint említettem — emberi vizsgálatokat is végeztünk. Mindezek a mozaikkockák egységes képpé kezdenek összeállni. Kiderült ugyanis, hogy akár elektrofiziológiai, akár etológiai, akár az állati tanulás, akár pedig az emberi percepció szempontjából vizsgáljuk a zsigeri érzőapparátus extrahomeosztatikus, tehát a magasabb agyi központokra kifejtett szerepét, minden aspektusban *kétféle, egymással ellentétes* hatással találkozunk. Egy adott *intenzitás-küszöb felett* a viszceroszenzoros inger elektromos ébredési reakciót hoz létre, fokozza az állat agresszivitását és elhárító reakcióit, továbbá lehetővé teszi mind állatban, mind emberben a természetes (de többnyire kellemetlen, negatív előjelű) ingerdetekciót. Ez az az interoceptív hatás, melyet a klinikus orvos is jól ismer, ez a Szecsenov-féle belső „homályos" érzékelés köre, a „rossz közérzet" komponense. Ennél talán izgalmasabb és újszerűbb *az adott küszöb alatti tartomány*, melynek hatására a lassú elektromos hullámokban kifejeződő alvás mennyisége nő, az állat félelmi és agresszív reakciói csökkennek, a jelfelfogás és diszkrimináció pedig csakis és kizárólag tanulás által valósul meg. Ugyancsak kondicionálás útján válnak e tudatküszöb alatti humán zsigeri ingerek tudatos érzékletté.

Ezek az adatok alátámaszthatják azt a hipotézist, hogy a viszceroszenzoros rendszer az extero- és proprioceptív készülékekkel analóg módon hat az agyra egy intenzitási skála mentén, tehát magán viseli egy érzékelő apparátus jegyeit. Adataink amellett szólnak, hogy a gyenge zsigeri ingerek *globális emocionális szintbeállító* effektust fejtenek ki. Hatásukra alvás, szelídülés, agresszivitáscsökkenés jön létre. E megállapítás esetleg egyben megkérdőjelezi azt a régebbi következtetésünket, hogy a viszcerocepció információt-hordozó rendszer, mely ingerdiszkriminációra képes. Valószínű, hogy nem egymást kizáró funkciókról, hanem egymást segítő kétféle viszceroceptív szerepről, szinergista működésről van szó. Az intenzitáskontínuum *küszöb körüli sávjában a* zsigeri bemenet képes differenciális impulzusokat juttatni a nagyagyvelőbe.

Most már a viszceroceptív funkció e kettős szerepének ismeretében a pszichovegetatív befolyás szempontjából elsőrendűen fontos kérdés, hogy az agyvelő—belsőszerv irányában folyó *centrifugális ellenőrzésben* a belsőszerv — agyvelő irányú *centripetális visszajelzés* játszik-e természetes, fiziológiás módón szerepet, illetve tréning útján ki lehet-e fejleszteni a viszceroceptív készü-

lék jelfelismerő és továbbító képességét? Más szóval: a viszceroszenzoros rendszer tekinthető-e az exteroceptív műszeres „biofeedback"-kel homológ, hatékony információs csatornának? E fontos kérdésre a választ jövőbeni kutatások tudják majd megadni.

Igen fontos, hogy a hatalmas, homályos terület, melynek egy részét, néhány vékony próba-fénycsíkkal meg kívántam világítani, a közeljövőben mind világosabbá váljék! Az egzakt alapon folyó szolid, korrekt kutatómunka és klinikai tevékenység folytán világszerte oldódott az a fagyos idegenkedés, mely a pszichovegetatív problémakört övezte. A bizalmatlanság és az újabb keletű felfokozott várakozás okaira rávilágítottam.

Befejezésként, szinte epilógusként csupán két számadatot említek: az Egészségügyi Minisztérium Pszichológiai Bizottsága számára készült egyik friss tanulmányból kiderül, hogy hazánkban az egészségügyi alapellátás iránt folyamodók több mint 30%-a az ún. „neurotikus" panaszokkal fordult orvosaihoz. Bernard Lown legutóbbi amerikai statisztikájából pedig megtudjuk, hogy a malignus, halálos kimenetelű szívaritmiák 20%-ában *dokumentáltan* ki lehetett mutatni olyan pszichológiai tényezőket, melyek kiváltották a fatális ritmuszavart.

Ez a két adat nem kíván kommentárt. Több diszciplína művelőinek *együttes* erőfeszítésére van szükség ahhoz, hogy a *cerebroviszcerális kutatási ágazat* a neurobiológiában, a medicinában és a pszichológiában egyaránt tovább fejlődjön.

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

ADATOK AZ OSZTRÁK TAVAK KIALAKULÁSÁHOZ*

LÖFFLER HEINZ

Osztrák Tudományos Akadémia Limnológiai Intézete, Bécs

Bevezetés

A tavak rövidéletű ökoszisztémák, legalábbis rövidebb életűek, mint a nagyobb vízfolyások vagy akár a tengerek és óceánok. Közülük csak kevésnek az eredete nyúlik vissza a harmadkorig, s ha igen, ekkor ezen belül is valószínűleg legfeljebb az oligocénig (Bajkál-tó). E vizek túlnyomó többsége létét a pleisztocén- vagy holocénkori gleccser-tevékenységnek köszönheti, s ennek következtében koruk a legfiatalabbtól (a Magas-Andok tavai legnagyobbrészt a 20. században keletkeztek!) az i. e. 18 000-re tehető időkig terjed, keletkezésük tehát az utolsó pleisztocén eljegesedés visszavonulásával függ össze. Mivel ez a visszavonulás a földrajzi szélességtől függött, ennek megfelelő korbeosztás adódik.

Ausztria mintegy 9000 állóvize (az 1 : 50 000-es térképanyag alapján kimutatva) nagyobbrészt szintén pleisztocén eredetű (eltekintve mesterséges duzzasztott vagy üdülő-tavaktól, ártéri tavaktól, földcsuszamlás vagy erősen erodáló mellékfolyók által felduzzasztott tavaktól, tektonikus vagy talajvíztavaktól), s ezért koruk 12—18 000 évre tehető. Mindazonáltal kétségtelen, hogy az Alpok előterének nagy tavai közül sok már az azt megelőző, jégkorszakok közti időben is létezett, s nagy részük — mint azt a Mondsee-n végzett legutóbbi kutatások bizonyítják (KLAUS 1975) — gyakran a jelenleginél jóval nagyobb kiterjedésű volt. A pleisztocén tóképződések sokszorosan kapcsolódnak a tektonikus medenceképződésekhez, vagy legalábbis összefüggésben vannak tektonikus jelenségekkel. E tekintetben a különböző tavak üledékanyagának vizsgálata még fontos ismeretekkel szolgálhat. Idevágó adatok ez ideig alig állnak rendelkezésünkre.

Az osztrák tavak keletkezésére vonatkozó adatok — saját kutatásaim megkezdéséig — főként GAMS (1927) és BURGER (1964) vizsgálataira szorítkoznak a lunzi térségre nézve. 1971 óta az Osztrák Tudományos Akadémia Limnológiai Intézete és a Bécsi Egyetem Limnológiai Tanszéke a tavak fejlődéstörténetét vizsgálja. Ennek keretében ez idő szerint (C^{14}-es kormeghatározások mellett) még a durva időrendi besorolás érdekében végrehajtott pol-

* Az MTA Biológiai Tudományok Osztályának 1978. június 26-i tudományos ülésén elhangzott előadás.

lenanalízisek, valamint a szervezetmaradványok (Diatomák, Ostracodák, Cladocerák és Dipterák: különösen *Chaoborus*) vizsgálata folyik, amely utóbbiak a tavak mindenkori állapotáról tájékoztatnak. A legutóbbi időkben pigmentanalíziseket is végeznek az *Oscillatoria rubescens* előfordulásának indikációjaként, továbbá — esetenként — ásványtani (röntgenográfiai) elemzésekre kerül sor. Ez idő szerint kereken egy tucat holomiktikus és meromiktikus tóra, valamint a Fertőre (Neusiedlersee) nézve rendelkezünk kutatási eredményekkel, amelyeket a következőkben ismertetek.

Az Alpok és az Alpok előterének tavai

Holomiktikus tavak

A legtöbb alpi tóban — ugyanúgy, mint az észak-európaiakban is (DIGERFELDT 1972) — létük első fázisában kimutatható bizonyos hajlam az eutrofizációra. Ez az első időben többnyire nagyfokú üledékképződés kísérő jelensége, és az ezzel gyakran együttjáró tápanyag-beáramlásé az akkor még vegetációmentes vízgyűjtő területre. Ausztriában a lunzi Untersee példázza kiválóan ezt a helyzetet (LÖFFLER 1975), ahol a profundális Ostracodák egyedsűrűsége és az üledék bizonyos tulajdonságai (szapropelizálódás) szólnak emellett. (A tó északi vízgyűjtő területén 1965-ben végbement földcsuszamlás következtében itt egyébként újra enyhe eutrofizáló hatás volt tapasztalható, amely azonban egyetlen öbölre korlátozódott a Mayrgraben torkolatának közvetlen közelében.) Ennek az eseménynek jórészt szervetlen üledéke fontos időmeghatározó tényező, amely a tó keleti részének üledékében jelentős vastagságú (több cm-es) allochton anyag részesedésével jelentkezik. Ezek a jelenségek legkésőbb az utolsó driásztól kezdődően ismét megszűnnek, hogy helyet adjanak egy erősen szerves jellegű üledékképződésnek, amely különösen a szubatlantikumban nagyobb mértékű (kb. 4 m). Az említett profundális Ostracodák (mindenekelőtt a *Cytherissa lacustris)* — természetesen változó sűrűségben — az egész fúrómagszelvényben, egészen a jelenkorig megtalálhatók. Valószínűleg érvényes ez a többi oligotróf tóra (pl. Attersee) is.

Merőben más a helyzet azokban a tavakban, amelyeket (főként az utolsó évszázad folyamán), a tókeletkezés kezdeti szakaszában jelentkező, már említett eutrofizációs hatást többnyire felülmúló, erős kultúr-eutrofizációs hatás ért. Még jóval azelőtt, hogy az oxigénfogyasztás üledékközelben vagy az egész hipolimniumban anaerob körülményeket okozna, olyan változások lépnek fel az üledékben, amelyek bizonyos meghatározott fajok eltűnéséhez vezetnek. Ily módon a *Cytherissa lacustris* eltűnik abból a profundális zónából, amelyre az üledékfelszín algákhoz kötött detritusrétege („ooze") jellemző (LÖFFLER 1969, POWELL 1976). A *Cytherissa lacustris* végtagjaival araszolva,

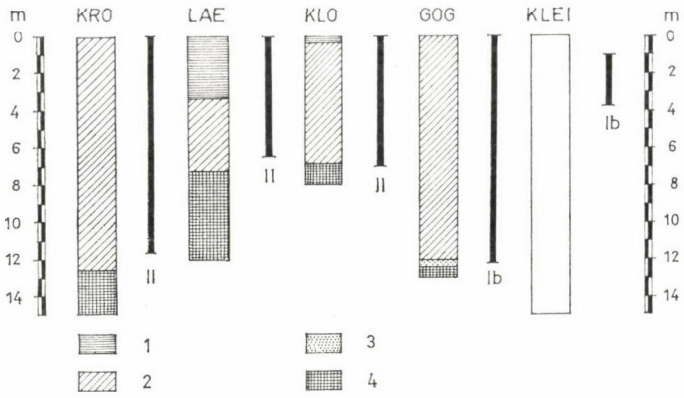
mintegy „gólyalábakon" halad előre, s ezenfelül viszonylag nagy specifikus súlya van (kifejlett állatoké 1,2 felett), ami a fajt a detritus-réteg felszínének elérésében akadályozza. Ezzel szemben az úszni tudó fajokat, mint például a *Cypria opthalmica*, az üledék ilyen jellegű megváltozása nem érinti. A Bódeni-tóban (Zellersee) a Cytherissa-val egyidejűleg eltűnik a Diatomák egész sora, míg mások, mint például a *Synedra acus*, ettől kezdődően lépnek fel. A *Cytherissa* a Mondsee és a Zürichi-tó legfelső üledékrétegéből is eltűnik, e tavakról azonban még túlságosan kevés adatunk van. Égetéses erdőirtás hatására vagy például a hallstatti kultúra cölöpépítményeivel összefüggésben létrejövő kultúr-eutrofizáció Ausztria holomiktikus tavainak esetében nem ismeretes, kisebb és közepes nagyságú tavaknál (Wallersee, Trumer-See stb.) azonban várható.

Karintia meromiktikus tavai

Ausztria területén feltűnően sok meromiktikus tó található. Jó tucatnyi részlegesen áramló vízű tó vált eddig ismertté, amelyek többségének közös vonása a nagyobb tápláló vízfolyás hiánya. Különleges eset a Traunsee, Ausztria legmélyebb tava (191 m), amely a jelentős befolyó vízmennyiség ellenére meromiktikus; bár itt mesterségesen kiváltott meromixisről van szó, amelyet a Solway Művek ma már több mint 50 éve bekötött levezetőcsatornája határoz meg. A jelentékeny eutrofizációs folyamatokat nem tükröző, szinte változatlan profundális faunával rendelkező holomiktikus tavakkal ellentétben a meromiktikus tavaknál általában mélyreható változásokat ismerhetünk fel. A profundális fauna hiánya és a *Chaoborus* nagymértékű előfordulása a meromiktikus fázis kísérő jelensége. A meromixis nincs mindig összekötve az oxigén teljes eltűnésével, a monimolimnionból. Ez különösen érvényes a Traunsee-re, ahol az erős vízbefolyás a monimolimnionban is az oxigénfelvételhez elegendő átrétegződést okoz. Az oxigén egyébként esetenként a Wörthi-tó, a Längsee és a Goggausee legnagyobb mélységeiben is kimutatható. Itt természetesen csak rövid ideig tartó jelenségről van szó, amely az eredeti benthos újra megtelepedéséhez nem elegendő.

Längsee

Míg a krenogén és ektogén meromiktikus tavak időrendi besorolása általában könnyen sikerül, addig a biogén meromiktikusnak tekintett karintiai (és más tartománybeli) tavak esetében nehézségek adódnak. Egyrészt, mert a részleges cirkuláció kezdete könnyen összetéveszthető a hipolimnikus oxigén csökkenésével, másrészt, mert a meromixis fenntartásához szükséges sűrűségkülönbségek minimálisak lehetnek, s ezért gyakran az üledék kémiai analízisei sem mondanak sokat. A Längsee esetében Freyt (1955) félrevezette egy, a legnagyobb mélységből (22 m) származó fúrásminták felső rétegét alkotó, vastag



1. ábra. Fúrásmagok a Krottensee-ből (KRO), Längsee-ből (LAE), Klopeinersee-ból (KLO), Goggausee-ből (GOG) és a Kleinsee-ből (KLEI) és üledékrétegződésük (vázlatosan). Mellette a meromixis mértéke ábrázolva (II = Alleröd, Ib = Bölling). A Kleinsee-ben a meromixis csak a szubatlantikumig tart. 1 = szapropel, 2 = szerves üledék, 3 = szerves gyttja, 4 = szervetlen üledék

(mintegy 1,5 m-es) szapropel réteg, amelyet meromiktikus fázisnak tekintett. Ezzel a meromiktikus fázis mintegy 2000 évre nyúlna vissza, arra az időre, amelyben — a pollenanalízisek alapján — kiterjedt erdőirtásokat feltételeznek. FREY ezenkívül megvizsgálta a Chydorida faunát is, amely azonban nagyrészt csak litorális eseményeket tükröz. Egy későbbi (egyébként FREYjel együtt végzett) saját analízisem, amely a profundális zónát benépesítő Ostracodákra vonatkozik, ezeknek az állatoknak itteni teljes hiányát bizonyította, valószínűleg már az alleröd időszak idején (1. ábra).

Első fellépésük ezzel szemben már a Bölling időszak előtt is megállapítható. Ily módon a Längsee esetében két esemény ismerhető fel. Egyrészt az Ostracodák elmaradása, amely egyébként a *Chaoborus* cf. *flavicans* első megjelenésével esik egybe — a hipolimniumban fellépő oxigénhiány fontos indikációjaként — jelezve a meromixis kezdetét. Másrészt a szapropelizálódás időszaka, amely a telepesek által végrehajtott első nagy erdőirtások idejére nyúlik vissza, s nyilvánvalóan egy még ma is tartó eutrofizációs folyamat következményének fogható fel. Az első oscillaxanthin pigment-elemzések pozitív bizonyítékát szolgáltatták a szapropel szakaszban (a többiekben viszont nem.) Ezért nem zárható ki az a feltevés, hogy a szapropelizáció az *Oscillatoria rubescens* előfordulásával függ össze, egy olyan kékalgáéval, amely Karintia legtöbb meromiktikus tavára jellemző, amelynek fellépését azonban a legutóbbi kultúr-eutrofizációval hozták összefüggésbe. Valóban, az ezután vizsgált karintiai meromiktikus tavak (Klopeinersee, Wörthi-tó, Goggausee) csak csekély, felszíni szapropel-réteggel rendelkeznek, míg a Wörthi-tó nyugati medencéjének 67 cm-es szapropel rétege kivételnek minősül.

Wörthi-tó, Goggausee

Mint a Längsee-t és a még leírásra kerülő tavakat a Klopeiner- és Kleinsee-t, a Wörthi-tavat is a Dráva gleccserrendszere alakította ki, bár — ellentétben a fent említettekkel — itt a meder fejlődésében tektonikus komponenseknek is jelentős szerepük volt. A Wörthi-tó mélyebb medencéi keleten (z_{max} 73 m) és nyugaton (z_{max} 84,6 m) meromiktikus, e kettő között fekvő medencéje ezzel szemben — mindössze 40 m-es maximális mélységgel — holomiktikus. A tó e figyelemre méltó sajátossaga FINDENEGG (1932, stb.) alapvető vizsgálatai óta ismert, mégis itt is felvetődött a kérdés a keleti és nyugati medence mindkét monimolimnikus emeletének korára vonatkozóan. Itt is fontos indikátornak bizonyultak az Ostracodák, mindenekelőtt újra a *Cytherissa lacustris*. Előfordulásuk mindkét medencében a korai driász és a preboreális időszak közötti időre korlátozódik, még a középső medencében e faj előfordulása feltehetően a késői szubatlantikumig tart. Eltűnése ettől az időszaktól kezdődően (ellentétben a Längsee-vel, ahol a *Cytherissa* jelenleg már nem fordul elő, a faj az egész tó mélyebb litorális régiójában ma is megtalálható), valószínűleg megint csak a felszíni üledék eutrofizáció okozta változásaival függ össze. A Längsee-vel való összehasonlításból megállapítható, hogy a Wörthi-tóban legalább 1000 esztendővel később kezdődnek a meromiktikus hatások.

A jóval kisebb Goggausee-ben (z_{max} 12 m) ezzel szemben a meromiktikus stádium még jóval korábban veszi kezdetét, mint a Längsee esetében, nevezetesen a Bölling időszakban vagy akár még azt megelőzően. Ebből adódik a meromiktikus stádiumnak a tó nagyságától független fellépése, amelynek tárgyalására e fejezet végén még visszatérünk. A Goggausee-nek azonban ezen felül is figyelemre méltó paleolimnológiai aszpektusai vannak, amelyek keletkezésével függenek össze. Mint természetes duzzasztott tó, amelyet egy erősen erodáló mellékfolyó hordalékgátja hozott létre, először is egy kezdeti, nyilvánvalóan sekély stádiumot tükröz, amely valószínűleg már a gleccser visszahúzódását követően nagyon hamarosan kialakult (ebben az esetben valószínűleg a Mura gleccserrendszerének egy ága). E feltehetően rövid stádiumot egy időbelileg ugyancsak nagyon korlátozott holomiktikus stádium követte, valószínűleg nagyobb mélységgel, s ezzel összefüggésben jól fejlett zooplanktonnal, mindenekelőtt Bosminával. A tó ezután nagyon hamarosan meromiktikus állapotba került (*Cytherissa* eltűnése, *Chaoborus* első megjelenése).

Klopeinersee és Kleinsee

Mindkét tó — jelenleg közös lefolyással a Drávába — a würm eljegesedéskori Dráva-gleccser visszavonulásakor a Kühnsdorfersee-hez tartozott, amelynek 15—20 m-es vízszinttel az említett tavaknál jóval nagyobb méretei voltak, s 13—14 000 évvel i. e. még létezett. Eredetileg a Vellach által duzzaszt-

va, a Kühnsdorfersee élettartamát egyrészt a Dráva-gleccser visszahúzódása, másrészt a Vellach folyásirányának megváltozása határozta meg. Annak eldöntése, hogy a Klopeinersee és a Kleinsee a Kühnsdorfersee-be való beolvadásuk előtt tengerszemnek tekintendők-e, további vizsgálatokat igényel. Üst formájuk mindenesetre emellett szól. Mindkét tó litorális régiójából vett fúrásminták elemzéséből világosan felismerhető a litorál-profundálisból az infralitorális stádiumba való hirtelen átmenet, mint a Kühnsdorfersee kitörésének következménye. Különben a Klopeinersee legnagyobb mélységéből (46 m) származó üledékfúrásmagok az Ostracodák tekintetében messzemenően megegyeznek a Längsee eloszlási viszonyaival, tehát a meromiktikus viselkedés megkezdődése tekintetében is. Ugyanúgy, mint ott, a lezáruló pleisztocén idején csökkenő tendenciájúvá váló üledéklerakódás itt is rendkívül megnehezíti az időbeni besorolást.

Az annak idején holomiktikus Kleinsee esetében (z_{max} 9 m) — amely felszínét tekintve a Goggausee nagyságának felel meg (10 ha) — a fejlődés teljesen más lefolyású volt. Mint a Goggausee-ban, a meromiktikus jelleg itt is a Bölling időszakban kezdődik, vagy röviddel az előtt, a szubatlantikumban azonban meglehetősen átmenet nélkül végződik, a monimolimnion üledékkel való feltöltődésének egész nyilvánvaló következményeként. Mindkét esemény megint csak az Ostracodák segítségével követhető nyomon: legkésőbb a Bölling időszakkal megszűnik létezni a profundál eredeti Ostracodafaunájának egy része (többek közt *Cytherissa lacustris*, *Ilyocypris* cf. *lacustris*), s egyszer s mindenkorra eltűnik a tóból. A szubatlantikumban azután néhány olyan faj mellett, amely kezdettől fogva létezett a tóban és a profundális régiót nyilvánvalóan a litorális régió felől népesítette be újra, olyan formák is megjelennek, amelyek az első holomiktikus fázisban nem fordulnak elő a profundálban (például *Metacypris cordata*). A „fosszilis" meromixis e jelensége feltételezhető a nagyjából azonos nagyságú, de annak idején még sekélyebb (z_{max} 6,8 m) Jeserzersee esetében a Wörthi-tó ÉNy-i vízgyűjtőjében, ahol a szervetlen üledék és egy vastag szerves réteg (kb. 6 m) között egy, mintegy 108 cm-es szapropelizált szint található. Itt azonban még további elemzésekre van szükség, mindenekelőtt a szapropelizálódás okainak tisztázása érdekében.

Amennyire ez mármost megállapítható (s ebbe a képbe a salzkammerguti Krottensee és a tiroli Piburgersee esetében tapasztaltak is jól beleillenek), az Alpok térségének igen sok tava — amelyek gyenge vagy nagyon diffúz vízgyűjtőhálózattal rendelkeznek — a hideg monomiktikus állapotból a dimiktikus állapotba való átmenetkor csak rövid ideig tartó vagy igen tökéletlen teljes cirkulációt mutatnak. A megemelkedett trófikus szinttel együtt — amint ez a rosszul átöblítődő, hosszú kicserélődési idővel rendelkező medencék esetében várható — a meromiktikus viselkedésre való hajlam adott volt. A kisebb medencék gyorsabban reagáltak, mint a nagyobbak, amelyeknek hosszabb időre volt szükségük egy biogén rétegződés kialakulásához.

Természetesen, még hiányzik két nagy és valószínűleg nagyon is érdekes tó: a Millstätter- és a Weissensee elemzése. Csak ezek elvégzése után dől el véglegesen, hogy a kifejtett feltevések az egész keletalpi térségre érvényesek-e.

Fertő (Neusiedlersee)

Ma már kétségtelen, hogy a jelenlegi Fertő teknője nem a Pannon-tenger maradványa, se nem egy Duna-mellékág képződménye, hanem a würm-időszak végéről származó tektonikus képződmény. A lakusztoikus fázis kezdetének időpontja azonban — amely egyes szerzők (GATTINGER 1974) felfogása szerint korábbra nyúlik vissza — még tisztázatlan. Az eddig tárgyalt tavakkal ellentétben a Fertő üledékei — amelyek maguk is egy hatalmas, majdnem fossziliamentes, többszáz méter vastagságú pannon-üledék alapon helyezkednek el — több lakusztrikus fázis és az erodált pannon alapkőzet kevert üledékei. Allochton terresztrikus anyag befolyását is jelentősnek kell tekintenünk a szárazon álló teknő mindenkori újra feltöltődésében, illetve a jelenlegi areál kétszereséig terjedő transzgresszióban. A különböző lakusztrikus fázisok keveredésének bizonyítékaként említhető a *Cytherissa lacustris* előfordulása a tó közepén, egy olyan fajé, amelynek areája ezzel a térséggel legfeljebb a pleisztocén végén hozható kapcsolatba. Ezzel a fajjal együtt fordul elő egy jelenleg is megtalálható Ostracoda-fauna. Az esetleg többszáz lakusztrikus fázis kevert üledékéből a tó fejlődéstörténete legjobb esetben csak a kereken 110 évvel ezelőtti, legutolsó kiszáradási fázis óta következő nyomon, korábbi periódusokban azonban nem (LÖFFLER 1969).

Az Osztrák Ásványolaj Igazgatóság fúrásai s néhány korábbi lelet a *Limnocythere sancti patricii* (hideg stenotherm faj) és a *Cytherissa lacustris* (hosszú életű, legalább két évig élő faj) olyan elterjedési képét tárják elénk, amely a Fertő-teknő korábbi kiterjedésének — különösen délkeleten, a Fertőzúg és az ahhoz csatlakozó magyar Hanság területén — nagyjából megfelel. Egy Tadten térségéből származó, 130 cm hosszúságú fúrásmag az alleröd/korai driász határától a késői driászig (III/II — I. Firbas szerint) tartó pollenszelvényt szolgáltatott. Ez a szelvény azért érdekes, mert az Ostracoda-társulások olyan egymásutánja ismerhető fel, amelynek legkorábbika az állandóan hűvös vizekre jellemző (többek közt: *Cytherissa lacustris*). Ennek alapján ebben a térségben az első lakusztrikus fázis legalább i. e. 13 000-re tehető. E fúrásmag bázisa (ismeretlen eredetű kavics) 113,7 m-es (?) mélységgel valamivel magasabban fekszik, mint a jelenlegi teknő legmélyebb részei (112,9 m?). Ezzel egybevágna az a feltevés, hogy a legkésőbbi süllyedések a jelenlegi tóteknő déli részében mentek végbe, s ezzel vette kezdetét a Hanság feltöltődése (KÜPPER 1957). A tó magyarországi partszakaszai e feltevéshez további bizonyítékokat nyújthatnának. Ott ugyanis hidegvízi Ostracodák legfeljebb keleten fordulhatnának elő a fúrásmagokban, a tó délnyugati és nyugati részében

azonban nem. Az a kérdés, hogy a jelenlegi tó északi része a hozzá keleten csatlakozó transzgressziós területtel korban a Hanság és a recens tó déli része közé sorolandó-e, még tisztázandó ugyanúgy, mint a legutolsó interglaciális esetleges lakusztrikus fázisainak kérdése.

IRODALOM

BURGER, B.: Results of a pollenanalytic investigation in the Untersee near Lunz in Austria. — Geol. Mijnbouw **43,** 94—102 (1964).

DIGERFELDT, G.: The post-glacial development of Lake Trummen. Regional vegetation history, water level changes and paleolimnology. — Folia Limnol. Scandinavia **16,** 1—104 (1972).

FINDENEGG, I.: Die Schichtungsverhältnisse im Wörthersee. — Arch. Hydrobiol. **24,** 253—262 (1932).

FREY, D. G.: Längsee: A history of meromixis. — Mem. Ist. Ital. Indrobiol. **8,** 141—146 (1955).

GAMS, H.: Die Geschichte der Lunzer Seen, Moore und Wälder. — Int. Rev. Hydrobiol. **18,** 305—356 (1927).

GATTINGER, T.: Das Werden des Seeraumes. — In: Der Neusiedlersee. Ed. H. Löffler, 11—13, Verlag Fritz Molden, Wien—München—Zürich (1974).

KLAUS, W.: Das Mondsee-Interglazial, ein neuer Florenfundpunkt der Ostalpen. — Jb. Oberösterr. Musealver. **120,** I., 315—344 (1975).

KÜPPER, H.: Erläuterungen zur geologischen Karte von Mattersburg — Deutschkreuz. — Geol. Bundesanst. Wien (1957).

LÖFFLER, H.: Recent and subfossil distribution of Cytherissa lacustris (Ostracoda) in Lake Constance. — Mitt. Internat. Verein. Limnol. **17,** 240—252 (1969).

LÖFFLER, H.: Daten zur subfossilen und lebenden Ostrakodenfauna in Wörthersee und Klopeinersee. — Carinthia II, **31,** 79—89 (1971).

LÖFFLER, H.: The distribution of subfossil ostracods and diatoms in pre-alpine lakes. — Verh. Internat. Verein. Limnol. **18,** 1039—1050 (1972).

LÖFFLER, H.: The Onset of Meromictic Conditions in Alpine Lakes. — Quaternary Studies, Royal Soc. New Zealand 21—214 (1975).

LÖFFLER, H. The evolution of ostracode faunas in alpine and prealpine lakes and their value as indicators. — Bull. Amer. Paleont. **65,** 282, 433—443 (1975).

LÖFFLER, H.: The onset of meromictic conditions in Goggausee, Carinthia. — Verh. Internat. Verein. Limnol. **19,** 2284—2289 (1975).

LÖFFLER, H.: „Fossil" meromixis in Kleinsee (Carinthia) indicated by Ostracods. — Sixth Intern. Ostracod. Symp. Saalfelden, Dr. W. Junk Publishers The Hague 321—325 (1977).

LÖFFLER, H., BERGER, F., GLATZ, A., JUNGWIRTH, M., KUSEL-FETZMANN, E., LEW, H., HERZIG, A., POWELL, S., HADL, G., HUMPESCH, U., SCHIEMER, F., HACKER, R., MEISRIEMLER, P.: Arbeitsbericht der limnologischen Exkursion Klopeinersee 1971. — Carinthia **II,** 235—274 (1972).

LÖFFLER, H., BERGER, F., DOKULIL, M., KUSEL-FETZMANN, E., LEW, H., HERZIG, A., NEWRKLA, P., STRNAD, R., POWELL, S., HUMPESCH, U., SCHIEMER, F., HACKER, MEISRIEMLER, P.: Arbeitsbericht über die Limnologische Exkursion 1972 zum Längsee. — Carinthia **II,** 163/83, 331—377 (1973).

LÖFFLER, H., BERGER, F., GROSS, F., HEDRICH, E., DOKULIL, M., STRNAD, R.: Arbeitsbericht der Limnologischen Exkursion Wörthersee 1973. — Carinthia **II,** 164/84, 195—206 (1974).

LÖFFLER, H., SCHULTZE, E., BERGER, F., DOKULIL, M., SCHIEMER, F., DOLEZAL, E., GNAIGER, E., JANTSCH, A., BRENNER, T.: Arbeitsbericht der Limnologischen Exkursion Goggausee 1974. — Carinthia **II,** 165/85, 165—196 (1975).

LÖFFLER, H., BOBEK, M., SCHULTZE, E.: Neue Daten zur Geschichte des Neusiedlersees. — Wiss. Arb. Bgld. (1977).

POWELL, S.: Einige Aspekte der Beziehung zwischen Sedimenteigenschaften und der Fortbewegung benthischer Süßwasser-Ostracoden, mit spezieller Berücksichtigung der Cytherissa lacustris (SARS). Diss. Univ. Wien (1977).

DUNAI VÍZLÉPCSŐK LÉTESÍTÉSÉNEK BIOLÓGIAI ASZPEKTUSAI*

DAUBNER IMRICH

Szlovák Tudományos Akadémia Kísérleti Biológiai és Ökológiai Intézetének Limnológiai Szektora, Bratislava

A legjelentősebb lehetőség, amelyet a Duna a folyam menti országok népgazdasága számára általában nyújthat, az energetikai hasznosítás. Ez ideig ezt a lehetőséget négy országban, éspedig a Német Szövetségi Köztársaságban, Ausztriában, Jugoszláviában és Romániában használták fel. A *Dunabizottság* ajánlására 1963-ban Magyarország, Csehszlovákia és Ausztria javaslatot fogadott el a nemzetközi folyam komplex hasznosítására, amelyben — egyebek között — ezen országok területén létesítendő vízlépcsők is szerepelnek. Ezt az elgondolást a tervezett Duna—Odera—Elba, valamint a Duna—Majna—Rajna vízi közlekedési utak projektjeivel is összhangba hozták, amelynek keretében közös (csehszlovák—magyar) Duna-szakaszunk már 1981-ben a Keleti-tengert a Fekete-tengerrel összekötő, 3500 km-es víziút részévé válik.

Ebből a koncepcióból kiindulva a Magyar Népköztársaság és a Csehszlovák Szocialista Köztársaság kormányai megegyeztek a Gabčikovo (Bős)—Nagymaros térségében létesítendő vízlépcsőrendszer létrehozásában (1. ábra). Az előkészítő munkálatok már folyamatban vannak. Mint ismeretes, ez esetben a terv célkitűzése nem kizárólag az energianyerés, hanem elsősorban a hajózás előmozdítása és a folyam menti területek árvízvédelmének biztosítása. Amint azt az 1976. május 6-án aláírt államközi egyezmény leszögezi, a gabčikovói vízierőmű első egységét 1986-ban, a nagymarosi vízlépcső utolsó egységét pedig 1990-ben kell üzembe helyezni.

A jóváhagyott tervváltozat előírása szerint Bratislava alatt víztározó keletkezik, amely az 1858 és 1842 fkm közé eső szakaszt foglalja magába (2. ábra). A tározó szélessége 1—4 km, hossza 16 km, felszíne 53 km^2. A tározómedence befogadóképessége 243 millió m^3, 4,7 m-es átlagos és 12 m-es maximális mélységgel. A hrusovi (Dunakörtvélyes) duzzasztógát baloldalán torkollik be az üzemvízcsatorna első szakasza, a 17,6 km-es felvízcsatorna, amely a hajózást szolgáló új Duna-medret alkotja. A víz turbinák mozgatásához szükséges esésének biztosítására, a csatornát 18 m-rel a felszín fölött alakítják ki,

* Az MTA Biológiai Tudományok Osztályának 1979. október 11-i tudományos ülésén elhangzott előadás.



1. ábra. A Bős—Nagymarosi vízlépcsőrendszer



2. ábra. A Bős—Nagymarosi vízlépcsőrendszerre vonatkozó Biológiai Projekt érdekeltségi területe

ahol a vízszint 14 m-t ér el. A mesterséges csatorna befogadóképessége 10 millió m^3, és 5000 m^3/s vízmennyiségnél többet képes levezetni (a jelenlegi Duna-meder átlagos vízszállítása Bratislavánál ez idő szerint 20000 m^3/s). A csatorna mederszélessége 283—650 m közötti.

A gabčikovói vízierőműnek 9 Kaplan-turbinája lesz, 3708 GWh/év teljesítménnyel. Bal oldalt két, 34×260 m-re méretezett zsilip készül. A vízierőműből a vizet 7,6 km-es csatornán vezetik el, amely Palkovičovonál (Szap, 1811 fkm) torkollik a Dunába. A régi mederben (1842—1811 fkm közötti szakasz) legalább 50 m^3/s állandó átfolyást biztosítanak. Itt vezetik le azokat az árhullámokat, amelyeket az üzemvízcsatorna már nem tud felvenni, valamint a jégzajlást. Szükség esetén a régi folyammeder a hajózást is szolgálja.

Természetes, hogy egy ilyen méretű létesítmény mélyreható beavatkozást jelent a környező területek természeti, környezeti viszonyaiba. Nagykiterjedésű területek elárasztására kerül sor, amelynek következtében gazdag és típusos ártéri ligeterdők mennek tönkre. A számítások szerint az érintett területen az erdők összterülete 28%-kal csökken. A talajvízszint az üzemvízcsatorna mentén előirányzott 1—3 m-es süllyedése következtében a csatorna és a régi folyammeder közti terület egésze alkalmatlanná válik az erdő jelenlegi életközössége számára. Az ártéri ligeterdőkre nézve fontos következmény az évente ismétlődő vízborítások elmaradása, amelyek a talaj tápanyagkészletét gazdagították.

Közvetett módon korlátozottá válik a faunaelemek előfordulása és fejlődése is. Az ártéri ligeterdőket ért hatás következtében elszigetelt vadpopulációk jönnek létre, s ez a vadállomány genetikai minőségét rontja. Hasonlóképpen, a ragadozómadarak számának csökkenése a rágcsálók tömeges elszaporodását okozhatja, ami a tájképi együttesben is negatívan jelentkezik. A nagy nádasfelületek kiirtása a fácánállományok létszámát csökkenti, hiszen itt búvó- és telelőhelyeik megszűnnek. A gátak várható szivárgása kedvezőtlenül hat majd a földön fészkelő fajokra is. E negatív hatások kiküszöbölésére a vadak és madarak számára mesterséges „pót"-biotópok kiépítését tervezik. A vízlépcsők kiépítése után a területhasznosítás struktúrájában is nagy változások történnek. Az érintett terület egészén a mezőgazdaságilag művelt terület kiterjedése 4762 hektárral csökken. A tulajdonképpeni építési munkálatok 2573 ha szántóföldet vesznek véglegesen igénybe, amely azonban bizonyos mértékben pótolható rétek és legelők szántóföldi művelésbe vonásával. A szántóterület további csökkenését eredményezi a lakásépítés, a települések kialakítása stb. A mezőgazdasági terület felsorolt végleges veszteségein kívül a vízlépcsőrendszer kiépítése viszonylag nagy szántóterület időleges igénybevételét is magával vonja. Ez a terület azonban a rekultiváció után ismét visszakerül a mezőgazdasági termelés szolgálatába.

Limnológiai vonatkozásban elsősorban a tározómedence kialakítása (viszonylag gyors vízcserével), a mesterséges meder kiépítése és a régi Dunameder hidrológiai viszonyainak megváltozásai fontosak. Ezek, a jelenleg uralkodó élőlénytársulások, az öntisztulási folyamatok és egyéb tényezők részére új feltételeket teremtenek, amelyek — egészükben véve — a jövendő kutatások hálás témái lesznek. Ugyanakkor megszűnik a Duna-ágak egészen egyedülálló rendszere, amely ezideig fontos funkciót töltött be, mint a főág számos élő szervezetének jellegzetes trófikus bázisa, a dunai halfajok többségének szaporodási alapfeltétele vagy — árvíz idején — ezek refugiuma.

A bratislavai *Halászati és Hidrológiai Laboratórium* munkatársainak (Ertl, Holčik, Vranovsky) adatai szerint a vízlépcsők építése által érintett Duna-szakaszban található a csehszlovák folyamszakasz zooplankton állományának 98%-a, a zoobenthos 97%-a, az elérhető évi halászati termelés közel

99%-a és az összhalfogás mintegy 92%-a. A bakteriomassza értékei ebben a térségben 0,81—1,54 mg · l^{-1}. A jelenlegi átfolyási vízmennyiségekre átszámítva ez évi 57 000—97 000 tonnát jelez (TRŽILOVÁ 1974). Az előrejelzések szerint az említett vízlépcsők létrehozása következtében — mind relatív (1 hara átszámított), mind abszolút értékekben — az ichthyofauna veszteségeivel számolnak. A teljes ichthyofauna a bratislavai és a nagymarosi tározótérség közötti szakaszon előreláthatóan 57%-kal esik vissza, az elérhető termelés 69%-kal, a halászat pedig 89%-kal. Ezeket a veszteségeket igyekszenek bizonyos mértékig kiegyenlíteni a haltenyésztéssel kapcsolatos intézkedések megvalósításával, különös tekintettel a fajösszetételre. Egyidejűleg a parti zónában olyan mederkialakítást írnak elő, amely a vízi élőlénytársulások optimális összetételének kialakulását eredményezheti.

Ilyen nagy területek igénybevétele, mint amelyet a vízlépcsőrendszer kialakítása tesz szükségessé, természetesen tájvédelmi körzeteket és természetvédelmi területeket is érint. Nagymértékben megváltozik a tájelemek struktúrája és a táj összképe is. Gátak, vízlevezető csatornák épülnek betonból, elektromos távvezetékeket és településeket hoznak létre, amelyek szokatlan és idegen elemek a meglevő tájban. Esztétikai szempontból zavaróan hat majd a régi Duna-meder is, melynek az árvizek biztonságos levezetése céljából vegetáció mentesnek kell maradnia.

Higiéniai szempontból mindenekelőtt a Duna és mellékfolyóinak patogén és fakultatív-patogén csírákkal (beleértve a vírusokat is) történő szennyeződése megfontolandó. Ezek az egész csehszlovák Duna-szakaszon állandóan jelen vannak, és emberre-állatra egyaránt igen jelentős fertőzési veszélyt jelentenek. Fontos tényező továbbá a viszonylag nagyfokú urbanizáció és iparosodás, amellyel jelentős szennyvízprodukció jár együtt; ez a modern mezőgazdaságokat is érinti. A Duna-menti ártéri erdőkben ezenkívül természetes fertőzési gócok találhatók.

A Duna-víz mennyisége és minősége meghatározza a vízlépcsők építése által érintett térségben a talajvíz mennyiségét és hasznosíthatóságát is. Hatalmas, becslések szerint mintegy 10—12 milliárd m^3 jó minőségű ivóvíztartalékunkat azonban nemcsak a Duna-víz, hanem a meder egyre fokozódó szennyeződése veszélyezteti. A higiénikusok tapasztalatai szerint az a talajvízréteg, amelyből jó ivóvizet nyerhetnénk, egyre mélyebbre húzódik, s ez idő szerint általánosságban 30 m-es mélységben található.

A vízlépcsők környékén lakó népesség nagy része egyéni forrásokból van ivóvízzel ellátva, amelyek többsége nem felel meg a higiéniai előírásoknak (nagy nitrát-, szulfát- és vastartalom és bakteriális szennyezettség). Ezen és más okokból feltétlenül szükséges egy központi vízellátási rendszer létesítése, mégpedig megfelelő időbeli előretartással, a vízlépcsők építésének megkezdését megelőzően. Teljesen megalapozott ugyanis az az előrejelzés, hogy a Hrušovnál (Dunakörtvélyes) létesítendő gát térségében, ahol a talajvízszint

1—3 m-es emelkedése következtében a tározóban nyomás alakul ki, az infiltrációs zónában szennyezések intenzívebb átszivárgásával, vagyis a talajvíz minőségének jelentékeny romlásával kell számolni. Ezzel szemben a felvíz- és alvízcsatorna térségében a talajvízszint 1—3 m-es csökkenése a kutakban vízhiányt fog okozni.

Az eddigi tapasztalatok alapján megállapítható, hogy a Duna vizének változatlan mértékű szennyezettsége és a vízgyűjtőterületén folyó emberi tevékenység mellett a tervezett tározótérségekben higiéniai szempontból a vízkincs minőségének romlásával kell számolni, az alapvető kémiai indikátorok, az oxigénháztartás és a mikrobiológiai paraméterek tekintetében egyaránt. A hidrológiai és geomorfológiai viszonyokat értékelve: a zooplankton és fitoplankton, valamint — a meder stabilizálódása után — a zoobenthos tekintetében az értékek mérsékelt emelkedése várható.

A vízlépcső kiépítése azonban másrészről kedvezően befolyásolja a helyzetet a szúnyoginváziók megszűnése szempontjából, az egész — e tekintetben jelenleg katasztrofális — Bratislava—Gabčikovo (Bős) Duna-szakaszon s az alatt is. Az ártéri ligeterdők elárasztásával megsemmisülnek a kullancsencephalitis fertőzési gócai is. A fasciolózis előfordulása is csökkenni fog, mégpedig a mocsaras területek kiterjedésének korlátozása következtében. Joggal várható az is, hogy a vízlépcső közvetlen közelében — legalábbis bizonyos időre — csökkenni fog a szabadon élő „reservoir-állatok" száma is.

A felsorolt, valamint további tények már a projekt előkészítésekor szükségessé tették a táj előrelátható és várható megváltozása biológiai aszpektusainak felmérését annak érdekében, hogy a vízlépcsők építésének realizálásával ne csak az elvárt népgazdasági haszon valósuljon meg, hanem a környezet negatív irányú befolyásolását is a minimumra lehessen csökkenteni.

Ebből az álláspontból kiindulva, az előtervek állami szakértőinek igényével összhangban, valamint további követelményekkel egyeztetve, az építkezés generáltervezője: *Hydroconsult Bratislava Urbion* (Urbanizációs és Rayontervezési Állami Intézet) egy tanulmány kidolgozását kérte „*A nagymaros—gabčikovoi vízlépcsőrendszer létesítésével érintett területek biológiai projektje*" címmel. Javasolták, hogy ezt a munkát a Szlovák Tudományos Akadémiával együttműködve a bratislavai *Kísérleti Biológiai és Ökológiai Intézet* valósítsa meg.

A megbízó igényeinek szellemében a munka fő célja az eddigi, alapkutatás jellegű munkák eredményeinek összegyűjtése, kiértékelése és territoriális vetítése, valamint az érintett terület természetes és biológiai viszonyaira vonatkozó, jelenlegi, tényleges ismeretanyag értékelése, kölcsönhatásaik és a vízlépcsők létesítése következtében beálló megváltozásuk mérlegelésével. A kutatás eredményeinek alapján javaslatot kell kidolgozni azokra az intézkedésekre nézve, amelyek az építkezések alatt biztosítják a környezet védelmét és a táj biológiai helyreállítását a munkálatok befejezése után.

A „biológiai terv" kimunkálására a rendelkezésre álló tervdokumentáció alapján kijelölték az érintett területeket, amelyek Bratislava városát és a környező településeket foglalják magukba a Duna jobb partján, valamint Dunajská Streda (Dunaszerdahely), Komárno (Komárom) és Nové Zámky (Érsekújvár) városokat, környékükkel együtt (2. ábra). E tekintetben a következő kritériumokat tartották szem előtt:

1. A vízlépcsőkkel közvetlenül összefüggő építési munkálatok, valamint a környék árvíz- és szivárgóvíz védelmét szolgáló építkezések által érintett területek territoriális elhatárolása, amelynek során a tervezés már meglévő területi-technikai dokumentációjából indultak ki;

2. A Dunának és mellékfolyóinak közvetlen hatása a környező területek talajvízháztartására, amennyire az a meglévő kutatási dokumentációkból ismeretes;

3. A vizsgált jelenségek egyensúlybahozásának lehetőségei közigazgatási egységeken belül, elsősorban az ökológiai szempontok figyelembevételével.

Az egész tervezett kutatómunkát átfogó össztevékenységet *három szakaszra* osztották fel: *az első, analitikus részben* (területi vetületben) az alapkutatás eredményeinak adatai az alábbi szempontok szerint koncentrálódtak: vegetáció (a jelenlegi állományok felvételezése és a természetes növényi életközösségek struktúrája), az élőlények különféle csoportjainak elterjedése, a hidrobiológiai-ichthyológiai viszonyok, a felszíni vizek és a talajvizek minősége, a természetes és endemikus fertőzési gócok, valamint higiéniai-járványtani adatok. Egyidejűleg az egyes tényezők kölcsönhatásait és a tervezett vízlépcsőkhöz való viszonyukat is értékelték.

A második szakaszban az első, elemző szakasz eredményeinek szintézise készült el, s a természetes életközösségek és a táj általános jellegének maximális megóvása érdekében hozandó intézkedésekre dolgoztak ki javaslatokat. Egyidejűleg kidolgozták az érintett terület hasznosításának alavető szempontjait a mezőgazdaság, vadászat, erdőgazdálkodás és közlekedés, turizmus és egészségügy tekintetében.

A harmadik szakasz a nagymaros—gabčikovoi vízlépcsőrendszer kiépítése során érintett terület tulajdonképpeni biológiai tervezésére vonatkozó javaslat, a megfelelő végrehajtási lehetőségekkel együtt. A munka 400 oldalt meghaladó terjedelmű, gazdag térképészeti és egyéb dokumentációs anyaggal.

A biológiai terv 7 főrészre osztható:

1. Javaslat, illetve kiegészítő intézkedések a vízlépcső építkezése során érintett települések, üdülő- és szociális létesítmények problémakörébe tartozó változásokra nézve.

2. Változások az erdőgazdálkodásban. Meghatározták az erdei növényegyüttesek eltávolításának területi egységeit, szakaszait és elveit, valamint javaslatot dolgoztak ki a kitermelt területek felszínének megóvására.

A talajvízszint, a talajféleség és domborzat, valamint a kavicsréteg vastagságának a vízlépcsők kiépítése során előirányzott változása alapján az alábbiakat határolták el:

a) Erdőségek, amelyekben nem következnek be olyan változások, amelyek gazdasági intézkedéseket tennének szükségessé.

b) Erdőségek, megváltozott körülményekkel, amelyek a vízlépcsők kialakítása után az eddigitől jelentősen eltérő gazdálkodási módot igényelnek.

c) Erdőségek megváltozott növekedési adottságokkal.

d) Erdőségek, amelyeknek fafaj-összetételében változásokat irányoztak elő, fejlődésükkel kapcsolatos prognózissal.

Javaslat készült ezenkívül a Duna szárazra kerülő mellékágainak, valamint az építkezési munkálatok során időlegesen igénybevett területek erdősítésére nézve is.

3. Javaslat a mezőgazdasági termelés szabályozására a vízlépcsők érintette területeken, különös tekintettel a talajvízháztartásra. A talajvízszint a vízlépcsők kialakítása következtében várható változásából és a vizet vezető rétegek tulajdonságaiból, valamint az ökológiai talajtípusokból (talajprofilokból) kiindulva elhatárolták azokat a területeket, amelyekben a mezőgazdasági termelés változatlan marad, amelyeken kedvezőbb vagy kedvezőtlenebb körülmények alakulnak ki — ez utóbbiakra nézve komplex meliorációs tevékenységet dolgoztak ki. A folyamatosan infiltrált területeken védőgátak, szivárgó- és levezetőcsatornák rendszerének kiépítését javasolják. A talajtermékenység szempontjából figyelmet szenteltek a szántott rétek hasznosításának is. Ugyanakkor javaslatot dolgoztak ki az időlegesen igénybe vett és az építkezési munkálatok következtében devasztált területek rekultivációjára (technikai és biológiai rekultiváció). Hasonló elvek alapján készült javaslat a tartós ültetvények (gyümölcsösök, szőlők), továbbá a rétek kialakítására, beleértve a gátak külső oldalának mezőgazdasági termelés céljára való hasznosításának rendszerét is.

A terv önálló része foglalkozik a vízlépcsők létrehozása utáni területhasznosítás struktúrájával (szántóterület, ültetvények és állandó rétek), és a javasolt technikai és meliorációs intézkedések értékelésével.

A vízierőmű-rendszernek a mezőgazdasági termelésre gyakorolt további hatásainak vizsgálatára 21 kísérleti területet jelöltek ki, amelyeken több éves kutatómunkát terveznek.

4. Halgazdálkodás. A vízlépcsők hatásának és az e hatásra megváltozó hidrobiológiai viszonyoknak a vízi biocönózisok szempontjából történő értékelése megtörtént, különös tekintettel a halászatra. Ebben a szellemben javaslatot készítettek haltenyésztő telepek kiépítésére a Duna-ágak vízzel ellátott rendszerében és a szivárgócsatornákban. Egyben javasolták a parti zóna alépítményeinek kialakítását is, az ökoszisztéma optimális összetételének és funkciójának biztosítása érdekében.

A halgazdálkodási tevékenységre vonatkozó intézkedések — amelyek elsősorban az értékes halfajok megóvását célozzák — olyan feladatokat jelöltek meg, amelyek mind az építkezési munkálatok folyamán, mind pedig a vízlépcsők elkészülte után folyamatosan végrehajtandók.

5. Vadászat. A vadgazdálkodás terén értékelték a tervezett vízerőmű hatását a gazdaságilag jelentős vadfajok, illetve a kártevők biológiai egyensúlyára, és intézkedéseket javasoltak a biotópok előrelátható megváltozásával kapcsolatban. Az intézkedések egy része a vadászterületek területi megoszlására és az egyes fajok biológiai-ökológiai igényeinek megfelelő kezelésükre vonatkozó javaslat. A vízi- és vándormadarak érdekében a nemzetközi egyezmények szellemében javasolnak intézkedéseket.

6. Higiéniai viszonyok. Higiéniai szempontból a projekt javaslatokat tartalmaz a Duna és a talajvízkincs tisztaságának megőrzésére a Csallóközben, a szennyvíz beömlésének szanálására és az egész érdekelt területen az e tekintetben döntő fontosságú ipari üzemekből származó szennyvizek tisztítására. Tekintettel a talajvízszint várható változásaira, kidolgozták e területre nézve a lakosság központi ivóvízellátását szolgáló javaslatot, továbbá a hulladékok ésszerű megsemmisítését, esetleges felhasználását szolgáló intézkedések tervét. A vízvezeték- és csatornahálózat rendszerét időben előrehozva kell megvalósítani. Külön foglalkoztak a munkálatokban résztvevők védelmének szükségességével az építkezés alatt várható szúnyoginvációkkal, valamint a természetes fertőzési gócokkal szemben. Hangsúlyozták megfelelő egészségügyi ellátás, és a járványos megbetegedések lokalizálásának szükségességét.

7. A természetvédelem. A vízlépcsők építésének közvetett vagy közvetlen befolyása alá kerülő területen végbemenő természeti változások és a táj értékes alkotóelemei megőrzésének szükségességével összhangban a természetvédelem új koncepciójavaslatát dolgozták ki, valamint irányelveket állítottak össze a védendő területekre és a modell-térségek elhatárolására. Egyidejűleg kidolgozták azon természetvédelmi területek dokumentációjának javaslatát is, amelyek a műszaki létesítmény megvalósítása következtében értéküket vesztik. A biológiai terv e része magában foglalja azt az ajánlást is, amely a veszélyeztetett élőlények fajainak védelmét, a kártevők szabályozását agrár- és erdőállományokban, valamint megelőző intézkedéseket javasol a gátak és a vízgazdálkodási objektumok védelmére, különös tekintettel az egyes típusokra.

E fejezet része az a dokumentáció-javaslat, amely a végérvényesen elárasztandó terület élővilágának megmentését szolgálja (befogás, áttelepítés, elvándorlás), beleértve az érintett részek benépesítését bizonyos fajokkal, az építkezés utáni új biotópok kialakítását, s azokban új egyensúly létrehozását.

A biológiai terv zárófejezete javaslatokat tartalmaz a tájék üdülési és turizmus céljaira történő hasznosítására, a vízlépcsők negatív hatásának kiküszöbölésére, a zöldterületek előrelátható változásaira, a tájesztétika és táj-

struktúra szempontjainak figyelembevételével. Mérlegelésre kerülnek a jövendő ipari tevékenység — beleértve a kavicskitermelést is — lehetséges hatásai az érdekelt terület biológiai egyensúlya és a természetvédelem vonatkozásában.

Az előterjesztett biológiai terv elfogadása után, a legkülönbözőbb szakirányok képviselőinek ajánlásait figyelembe véve, függelékként intézkedési javaslatot állítottak össze a munka megkezdése előtt, a munka folyamán és befejezése után végrehajtandó feladatokról.

Végül meg kell állapítanunk, hogy a gabčikovo—nagymarosi vízlépcsőrendszer megépítése által érintett terület biológiai tervének kidolgozása — mint a műszaki terv alkotórésze — egyike azoknak a fontos vállalkozásoknak, ahol biológusok együtt dolgoznak a műszaki szakemberekkel ennek az igényes vízi nagylétesítménynek az előkészítésén. Szükségesnek tartjuk azt is megjegyezni, hogy — a mi feltételeink között — ez az első ilyen jellegű akció. Ezért szükséges valamennyi kimunkált végkövetkeztetés és javaslat bizonyos korrekciója az építkezés folyamán és elkészülte után, összhangban a műszaki irányelvek pontosításával az abiotikus komponensek megváltozásaira vonatkozóan. Ez egyben előre feltételezi a biológusok és műszaki szakemberek további együttműködését e megkezdett mű megvalósításán. Már az eddigi nemzetközi tapasztalatok is bizonyítják, hogy a biológusok álláspontjának mindazon tervek elválaszthatatlan alkotóelemének kell lennie, amelyek megvalósítása beavatkozást jelent a természet és a környezet rendjében.

IRODALOM

DAUBNER, I.: Die Errichtung des Systems von Staustufen an der Donau vom Standpunkte der Umwelt (slov.). Životné prostr. **12**, 184—187 (1978).

Szerző-kollektíva: Das Biologische Projekt des Interessengebietes der Errichtung eines Systems von Staustufen Gabčikovo—Nagymaros (slov.). URBION, Bratislava (1975).

TRŽILOVA B.: Die Erforschung der Indikatoren der Verunreinigung des Donauwassers im Bezug auf den Gehalt an Fäkalbakterien (slov.). Zárójelentés, Szlovák Tudományos Akadémia Limnobiológiai Intézete, Bratislava (1974).

TENDENCIÁK A „SÍKFŐKÚT PROJECT" ERDŐ-ÖKOSZISZTÉMA ELEMMOZGÁSAIBAN*

JAKUCS PÁL[1]
KOVÁCS MARGIT[2]—L. MÉSZÁROS ILONA[3]—B. PAPP LÁSZLÓ[3]—Cs. SZABÓ MÁRIA[4]—TÓTH JÁNOS ATTILA[1]

(1 = Kossuth L. Tudományegyetem, Ökológiai Tanszék, Debrecen
2 = MTA Botanikai Kutató Intézet, Vácrátót
3 = Kossuth L. Tudományegyetem, Növénytani Tanszék, Debrecen
4 = Eötvös L. Tudományegyetem, Növényrendszertani és Ökológiai Tanszék, Budapest)

1. Bevezetés

A MAB-program egyik alapvető célkitűzése a fontosabb biogén elemek eloszlásának és cirkulációinak vizsgálata a Föld különböző biom-jainak reprezentatív ökoszisztémáiban. A világ élelmezési kérdéseiben döntő szerepet játszó biológiai produkció növelési lehetősége, valamint a környezetvédelem szempontjából fontos dinamikusan funkcionáló ökoszisztéma-stabilitás (organizáció) alapkérdései szorosan összefüggenek az elemmozgási, felhalmozódási folyamatokkal. E problémakör kutatása különösen a fajgazdag, többszintes, autoregulatív (természetes) erdő-ökoszisztémákban igen bonyolult. Nem kétséges, hogy csak az itt feltárt és megismert törvényszerűségek ismeretében lehet megalapozottan segíteni az emberi táplálékszükségleteket szolgáló regulált rendszerek hatékonysági növelésében, valamint az ember számára legkedvezőbb környezet tartós megóvásában.

Ma már jól ismert általánosságban, hogy a különböző tápanyagok (elemek, ill. vegyületek) folyamatosan kerülnek be az abiotikus reservoirok-ból a biotikus komponensekbe, majd bizonyos idő múltán valamilyen formában ismét visszajutnak az abiotikus reservoirok-ba. Az elemek bioszférán, ill. ökoszisztémán belüli körforgalmának (nagy- és kiscirkulációk) kvantitatív vizsgálata során a rendszer analízis metodológiájának értelmében számos szerző kompartment modellt állít fel, majd megállapítja az egyes kompartmentekben a kérdéses elem készletét, mennyiségét. Egymást követő időszakokban megmérve a kompartmentekben levő elemmennyiségeket, megfelelő adatok birtokában differenciál egyenletrendszerek állíthatók fel az elemek kompartmentek közötti mozgásának (cirkulációjának) leírására. Ebben az esetben az egyik kompartmentből kilépő mennyiség (output) a másik kompartment inputja.

Az egész, több kompartmentből összetett rendszerre vonatkozóan is vizsgálható az időegység alatt be-, ill. kilépő anyagok mennyisége. Amennyiben a rendszer dinamikus „egyensúlyban" van, úgy az in- és output kb. azonos

* „Síkfőkút Project" No. 70.

mennyiségű vagy az évi produkció növekedésének megfelelően lassan emelkedő tendenciájú. A jelentősen nagyobb input, kisebb output esetén (pozitív mérleg) a rendszerbe jutó anyagok felhalmozódását jelenti, nagyobb output kisebb input mellett (negatív mérleg) pedig anyagveszteséget jelez.

Az ökoszisztéma anyagforgalmi vizsgálatait azonban bonyolítja az, hogy különböző integrációs szinteken (molekula, sejt, szerv, egyed, populáció, cönózis stb.) lezajló folyamatokat kell figyelembe venni, valamint az, hogy ezen folyamatok lezajlási ideje igen különböző. Egyes elemek, mint pl. a N, P, K kulcsfontosságúak a sejtek működésében, mozgásuk az anyagcsere-utakon keresztül azonban gyakran csak másodpercekben mérhető. Ennek ismerete igen fontos a sejtszintű funkció vizsgálatában és megértésében. Könnyen belátható azonban az, hogy egy-egy sejt teljes anyagcsere-folyamatainak megismerése nem elegendő a magasabb integrációs szint (egyed, populáció, biocönózis) funkciójának megismeréséhez. A magasabb integrációs szintekben a folyamatok és interakciók olyan új fajtái lépnek működésbe, ahol a kölcsönhatások tovább bonyolódnak mind a saját szerveződési szinten, mind pedig az alacsonyabb és magasabb szinteken állókkal.

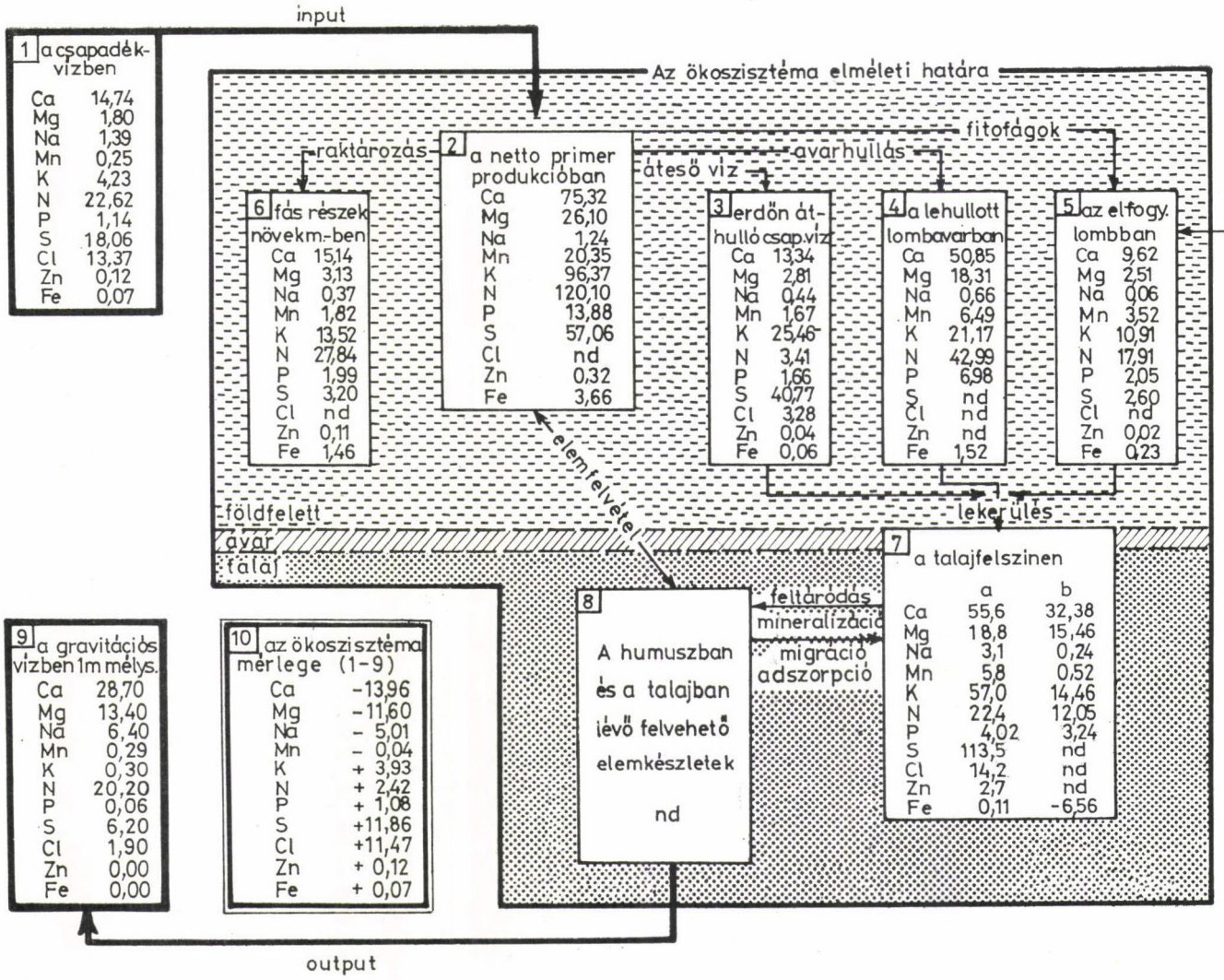
2. Az erdőben analizált elemek és mennyiségük

A MAB-programhoz kapcsolódó elemcirkulációs vizsgálatok 1973 óta folynak a magyarországi reprezentatív tölgyerdei területen, az ún. „Síkfőkút Project" kutatások keretén belül.

Az erdő nettó primer produkciójában évente felhalmozódó bioelemek, továbbá az ökoszisztéma különböző szintjeiben a vízzel mozgó elemek, valamint az avarbomlás során felszabaduló elemek stb. több éven keresztül nyert adatai alapján kíséreljük meg becsülni kg ha^{-1} $év^{-1}$ értékekben az elemmozgási tendenciákat. Az erdőben történő teljes elemcirkulációk felvázolására azonban csupán ezen adatok birtokában csak közelítően lehet vállalkozni, tekintettel arra, hogy a bioelemek az ökoszisztéma szubszisztémjei és ezek belső trofikus kapcsolatai között a legkülönbözőbb vegyi kötésekbe épülve, a mindenkori funkcionálás organizációs hatása alatt állnak, mozgásfolyamataik dinamikus bonyolultsága igen nagyfokú.

Fentiek azonban nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a meglévő adataink összevetéséből az ökoszisztéma egyes kompartmentjeinek, ill. az elemmozgások egyes részleteinek vonatkozásában néhány általánosíthatónak látszó trendet ne kíséreljünk meg felvázolni, mind az intraszisztémciklus, mind az ökoszisztéma elemmérlegének vonatkozásában. Ennek érdekében állítottuk össze az 1. ábrát.

Az 1. ábrán a vastag, összefüggő vonallal bekeretezett rész jelzi az ökoszisztémát, ill. annak „elméleti határát". Ezen belül, ill. kívül blokkokban



1. ábra. A „Síkfőkút Project" tölgyerdőjének elemmozgási tendenciái. Az egyes blokkok adatai több éves mérések átlagai. Adatok kg ha^{-1} $év^{-1}$-ben. Részletes magyarázat a 2. fejezetben

(kompartmentekben) tüntettük fel az egyes elemmennyiségeket. A blokkokban szereplő elemmennyiségek mérésének és kiszámításának rövid lényegét az alábbiakban ismertetjük. A teljes és részletes ismertetés könyvalakban megjelenés alatt van (JAKUCS ed. 1982—28). A továbbiakban e könyvre nem teszünk irodalmi hivatkozásokat, csak az időközben megjelent idevonatkozó részpublikációkra utalunk.

1. sz. blokk. Az erdő lombkoronája felé nyúló műszertartó tornyon, valamint az erdő melletti fátlan területen elhelyezett 2000—2000 cm^2 gyűjtőfelületű kádakba hulló csapadék elemtartalma (lásd még SZABÓ 1975, 1977, SZABÓ—CSORTOS 1975). A mintavételek 3 éven keresztül 2—2 hetenként történtek. Az adatok a mindenkori elemkoncentrációk, a lehullott csapadékvíz mennyisége és a gyűjtőfelület nagysága alapján kerültek kg ha^{-1} átszámításra, a végső adat a 3 vizsgálati év egy évre vonatkozó középértéke. Az adat tartalmazza a szálló porral és egyéb légszennyeződésből bekerülő elemeket is, amelyek a csapadékkal együtt mosódtak a felfogó edénybe. Ez a blokk az ökoszisztéma elem-inputjának döntő reprezentálója.

2. sz. blokk. A netto primer produkció elemtartalma, ill. az összes felvett elemmennyiség. Az ebben a blokkban szereplő adatok az erdő több éven keresztül vizsgált netto primer produkciójának ismeretében (lásd PAPP B. 1979, KÁRÁSZ 1979, PAPP 1980) kerültek kiszámításra. Az egyes elemek koncentrációanalízisei a fás- és lágyszárú szint domináns növényfajainak különböző frakcióiban (pl. levél, ág, törzs, gyökér, virág, termés stb.) többszörös ismétléssel történtek. A 2. sz. blokk elemmennyiségében benne vannak a 3-, 5- és 6-os blokk értékei is.

3. sz. blokk. Az erdő talajáig lejutó, lombon áteső és törzsön lefolyó csapadékvíz azon elemtartalma, amely a fitomasszából, továbbá a növényekre rakódó porból, ill. egyéb, az erdőben a talajig lejutó anyagokból (pl. heterotróf faeces) származhatott. Kiszámításuk a talajfelszín felett elhelyezett 14 db, egyenként 2000 cm^2 gyűjtőfelületű csapadékkádakkal, valamint a 14 db törzsre helyezett csapadékfelfogó gyűrűkkel összegyűjtött vízminták elemzésével történt, általában 2—2 hetes ismétlésben és 3 éven át. Az adatok 1 átlagévre vonatkoznak. Nem tartalmazzák az 1. sz. blokkban feltüntetett input mennyiségeket, vagyis a lombon áteső és törzsön lefolyó vízben mért tényleges adatok az 1. és 3. sz. blokkok összegzései lennének! (Lásd SZABÓ 1975, 1977, SZABÓ—CSORTOS 1975.)

4. sz. blokk. Az elhalt növényi részekkel a talajra jutó elemmennyiségek. Az ősszel lehullott lombavar (a két fafaj + két domináns cserje) avarjának elemanalízise és az avarprodukció ismeretében hektárterületre számolása. Az értékek kb. 10—20%-kal növelhetők, mert nem tartalmazzák a cserjeszint avarjának kb. 40%-át kitevő egyéb cserjék, valamint az elhalt fásodó részekkel, termésekkel stb. lekerülő frakciók elemtartalmait. Szerepel viszont az értékekben a lágyszárúak föld feletti éves produkciójának elemtartalma (lásd MÉSZÁROS 1979).

5. sz. blokk. A fitofágok által elfogyasztott levelekben levő elemmennyiségek számított értéke. A fák és domináns cserjék levélnövekedés-vizsgálata közben (lásd JAKUCS—VIRÁGH 1975, VIRÁGH 1979) éveken át planimetrálással lemérésre került az a levélfelület-hiány, amelyet a fitofágok elfogyasztottak. A hektáronkénti levélszámok ismeretében került kiszámításra a fitofág rágási százalék értéke. A blokkban feltüntetett elemmennyiségek a több éven át vizsgált teljes lomblevél produkcióból a szintén többéves átlag rágási százalék alapján számolt összegeket tüntetik fel.

Itt jegyezzük meg, hogy a kutatási program ideje alatt elemzésre kerültek a terepen, valamint laboratóriumban etetési kísérletekben vizsgált hernyók faecesének, valamint az utolsó stádiumú hernyóknak és báboknak az elemtartalmai, súlyai is. Az egy hektáron levő hernyóegyedszámok, valamint a faeces, ill. hernyó és báb elemtartalmi analízisek alapján példaként bemutatjuk az 1978-as vizsgálati év adatait. Ebben az évben nagyfokú gradációja volt a *Tortrix viridana* és *Ptilophora sp.*-nek. Az első érték a hernyók fejlődése során termelt faeces, a második érték a bábozás előtti, ill. már bebábozódott fitofágokra vonatkozik (minden számítás itt és a többi frakciónál is szárazsúlyra vonatkozik!). Az adatok kg ha^{-1} $év^{-1}$-ben. Ca = 2,01, 0,15; Mg = 1,68, 0,12; Na = 2,09, 0,26; Mn = 0,80, 0,02; K = 4,51, 0,69; N = 9,42, 7,38; Fe = 1,43, 0,05. (SZABÓ L. ined.).

6. sz. blokk. A netto primer produkció évi fásodó növekményében levő elemmennyiségek. Számítása elsősorban az évgyűrű-növekedésekben levő (+ vékony gyökér + egyéves ág stb.) elfásodott anyagok analíziseik alapján történt (lásd PAPP B. 1979).

7. sz. blokk. A talaj felszínére kerülő elemek.

Az a-oszlop az avar-liziméterekben felfogott csapadékvíz havonkénti és több éven át analizált elemmennyiségeknek, a gyűjtőfelület nagysága ($12 \times 538{,}5$ cm^2), valamint a felfogott vízmennyiségeknek az ismeretében került hektárértékű becslésre (lásd KOVÁCS 1980). Az értékek a légköri csapadékkal beérkező (1. sz. blokk), az ökoszésztéma föld feletti részén átesve dúsuló (3. sz. blokk) és a lehullott avarból (4. sz. blokk) átmosott elemeket jelölik és tulajdonképpen a talaj szubszisztém elem-inputját adják meg.

A b-oszlop adatai a nylon-háló zsákos avarbomlási kísérlet során 2 év alatt felszabadult elemmennyiségeknek az összavar-produkció ismeretében hektárra számított értékei (lásd TÓTH—PAPP B.—LENKEY 1974). Ezek a mennyiségek — hasonlóan a 4. sz. blokk adataihoz, ugyanazon okok miatt — kb. 10—20%-kal még növelhetők lehetnek.

8. sz. blokk. A talajban (beleértve az avar alatt levő humuszos szintet is) levő elemek. Ezeknek mennyiségi nagyságrendje hektárra vonatkoztatva csak olyan durva hibával lenne becsülhető, amely túllépi az elfogadhatóság határát. A talaj felvehető elemkészleteinek az élő- és élettelen ökológiai tényezők komplex hatásmechanizmusában időben és térben is állandóan változó értéke van. A feltáródás, adszorbció, mineralizáció, humuszosodás, kimosódás és visszakerülés stb. folyamatainak időbeni együttes nyomonkövetése, hektárra vonatkoztatva — ma még metodikailag is megoldhatatlan. Kétségtelen viszont, hogy a talajban végbemenő említett folyamatok zavartalan és szabályozott végbemenése biztosítja döntően az ökoszisztéma szervesanyag-produkciójának évenkénti megismétlődési lehetőségeit.

9. sz. blokk. A 0—100 cm mély monolitos oszloplizimétérek (3 db, 7500 cm^2 gyűjtőfelület) alapján felfogott, a gravitációs vízben levő elemmennyiségek. 4 év, havonként elemzett mintáinak éves átlaga, hektárterületre átszámolva (lásd KOVÁCS 1980). Az erdő talaja tömött szerkezetű agyagbemosódásos barna erdőtalaj (talajszelvény-analízisét lásd KOVÁCS 1978), ahol a talajvíz migrációjának egyensúlyi állapota kb. 100—120 cm mélységben van. Az erdő felvevő gyökérzónája 0—50 cm között dominál, a 100 cm-es mélységben felfogott vízzel távozó elemek tehát felfelé már nem vagy csak elhanyagolhatóan kis mértékben mozoghatnak. Így a 9. sz. blokkban feltüntetett elemmennyiségek felfoghatók, mint az ökoszisztémából már irreverzibilisen kilépő output értékek.

10. sz. blokk. Számított érték. Az 1. sz. input mennyiségek és a 9. sz. blokk output mennyiségeinek különbségei. Az értékek az ökoszisztéma elemmérlegének mutatói.

Nem rajzoltuk fel az ábrára a talaj elemmérlegének mutatóit, amely lényegében a 7. sz. blokk a oszlopának és a 9. sz. blokk értékeinek különbsége alapján számítható.

3 A kémiai elemzések módszerei

3.1. A vízminták (1., 3., 7a., 9. sz. blokkok) analízisei

A kémiai meghatározásokhoz a vízmintákat Mn 640 d típusú szűrőpapíron szűrtük meg, s a feldolgozásig sötétben, hűtőszekrényben tároltuk. A minták elemkoncentrációjának meghatározása havonként történt, minden mintavételi helyről. Mivel a mintavétel a talajig jutó csapadékok esetében hetente, ill. kéthetente történt (a mindenkori csapadéknak megfelelően), az egy hónapi vízmintákat mennyiségük arányában összekevertük és a kevert mintákat analizáltuk.

A kationok meghatározása UNICAM SP 1900 típusú atomabszorpciós spektrofotométeren történt. A nitrogén-, foszfor-formák, valamint a SO_4-S meghatározását FELFÖLDY (1972) módszerkönyve szerint végeztük. A klorid-ion mérése OP-CL-7112-D típusú klorid-szelektív elektróddal, Radelkis OP-203 típusú ionkoncentráció- és pH-mérővel történt.

3.2. A szilárd (növényi, állati stb.) minták analízise (2., 4., 6., 7b. sz. blokkok)

A légszáraz mintákat laboratóriumban daráltuk, a fás mintákat pedig aprítással, majd darálással homogenizáltuk. A gyökér mintákról a talajrészeket erős vízsugárral mostuk le. Lényeges volt a minták előkészítése során, hogy a fás komponensek aprítását, darálását, ill.

homogenizálását a mintavétel után még friss állapotban elvégeztük. A szárítás alatt ugyanis a xylemben és a phloemben az oldat a vágási felület közelében a vízvesztés miatt fokozatosan betöményedik, ami a tápelemek inhomogén eloszlását eredményezheti.

A homogenizált, 85 °C-on súlyállandóságig szárított mintákban a K, Ca, Mg, Fe, Mn, Na koncentrációját 500 °C-on végzett hamvasztás és 1 : 1 : 8 arányú HCl : HNO_3 : H_2O savkeverékkel való feltárás után (VARJÚ 1972) UNICAM SP 1900 típusú atomabszorpciós spektrofotométeren mértük. Az össz-nitrogén koncentrációját Kjeldahl módszere szerint, az összfoszforét pedig molibdénkék módszerrel, redukálószerül aszkorbinsavat alkalmazva, határoztuk meg.

4. Az intraszisztém ciklusok elemmozgási tendenciái

Az ökoszisztémában bent levő, vagy bejutó elemek a rendszeren belül körforgalomban vesznek részt a „felvehető tápanyag" → „a szerves anyag" → „az ásványos humusztalaj" komponensek között, kialakítva ezzel egy rendszeren belüli ciklust (intrasystem cycle).

Az intraszisztém ciklusban az egyik kritikus pont a bioelemek transzfere az „organikus" és a „felvehető tápanyag" komponensek között. A bioelemek visszakerülése a talajba — pontosabban a felvehető tápanyagblokkba — két fő úton megy végbe: az avarhullással és annak lebomlásával, ill. a csapadékvízzel. Szemben az avarbomlási folyamattal a csapadékvízzel érkező egyes elemek közvetlenül és gyorsabban bejuthatnak a talaj felvehető tápanyagkészletébe. Ezzel az elemeknek egy gyorsabb reciklizációja jöhet létre, míg az avarhullás során egy hosszabb, komplex biológiai dekompozíciós folyamat eredményeképpen válnak csak ismét felvehetővé az ásványi anyagok.

Adataink alapján (1. ábra) az évi elemfelvételnek (2. sz. blokk) elvben azonosnak kell lenni a raktározás (6. sz. blokk) és a talajra lekerülés (visszakerülés = 3., 4., 5. sz. blokkok) értékeivel. Azon elemek vonatkozásában, ahol minden blokkban vannak mért adataink (Ca, Mg, Na, Mn, K, N, P, Fe) összességében az elemfelvétel blokkja 13,5%-kal nagyobb összelemmennyiségeket mutat, mint a raktározás és a lekerülések összege (357, ill. 309 kg ha^{-1} $év^{-1}$). A különbség a nem elemzett cserjék avarjában, a — metodikailag nagyon nehezen vizsgálható — hajszálgyökér-produkcióban, a vegetációs periódus ideje alatti elemkoncentráció-értékek migrációjában, a még nem eléggé ismert heterotróf in- és output mennyiségekben, továbbá a mikroorganizmusok nem kontrolált tevékenységében kereshető. Természetesen számolni kell minden intraszisztém elemciklusnál az input- és output elem-mennyiségekkel is. Inputként elsősorban a csapadékvízzel való bekerülést, a nitrogén esetében a talaj felső rétegében való megkötődést, a talajvízzel történő esetleges felfelé áramlást, ill. a talaj raktározott készleteiből történő elemfeltáródást kell megjelölni (lásd még 5. fejezet).

Ha azonban nem összességében, hanem külön-külön értékeljük az 1. ábra egyes elemeinek blokkok közötti mennyiségi alakulását és kapcsolódását, az intraszisztem elemciklusok alábbi fontosabb tendenciáit figyelhetjük meg.

Ismételten hangsúlyozzuk, hogy az adatok mindenütt 3—5 év méréseinek átlagértékei. Az egyes években az abiotikus és biotikus tényezők változékonyságának hatására minden elemnél jelentkeztek ± eltérések. A szórás nagysága 5—15% között adódott.

4.1. Kalcium

A légköri csapadékkal az erdőbe érkező kalcium a vizsgált kationok között a legnagyobb mennyiségű. A lombon átesve, ill. a törzsön lefolyva a Ca-tartalom kb. kétszeresére dúsul. A csapadékvízzel az avarfelszínig összesen évi 28 kg ha^{-1} Ca jut le. A magas kalciumértékek elsősorban azzal lehetnek összefüggésben, hogy a légköri csapadékban oldódó és a levelekre, ágakra ráhulló, majd onnan lemosott légköri porszennyeződésnek is magas a Ca-tartalmuk. A mintaterülettől az uralkodó széliránnyal (N, NW, NE) megegyezően viszonylag nagyobb, összefüggő mészkőterületek vannak, ezek bányáiból és cementműveiből, valamint a meszes talajok széleróziójából könnyen kerülhet a légköri porba az általunk is észlelt Ca-mennyiség, annak ellenére, hogy a vizsgált erdő és közvetlen környéke (kb. 5—10 km-es körben) lényegében zárt vegetációval fedett.

A lombon áteső és a törzsön lefolyó vizekben a kalcium dúsulásainak maximumai a nyár végi—ősz elejei időszakban jelentkeztek, minimumai a vegetációs periódust megelőző időkben.

Az avar-liziméterek adatai szerint az avar átmosásával a humuszos talajszint közvetlen felszínére érkező csapadékvíz Ca-mennyisége még kb. ugyanannyival növekszik, mint amennyi az avar felszínéig lejut (7a blokk mínusz 1 + +3 blokk). Az avarbomlásos kísérlet során a Ca-felszabadulás évi mennyisége (7b. blokk) a csak az avar átmosásával nyert értéknél kevéssel adódott magasabbnak. Mindezek arra engednek következtetni, hogy a talaj-szubszisztém Ca-inputja nem érheti el a primer produkcióban levő évi kalciumfelvétel (2. sz. blokk) mennyiségét. A hiányt valószínűleg a talajban levő és a szervesanyagok és agyagfrakciók által hosszú idők alatt megkötött Ca-feltáródás pótolja az ökoszisztéma élő komponensei részére. Miután azonban az 1 m mélységben mért gravitációs vízzel is jelentős Ca-mennyiség távozik a talajból, a felvett és távozó mennyiségek egyértelműen jelzik azt a tendenciát, hogy a talaj (és az ökoszisztéma) Ca-mérlege negatív jellegű. Ennek következményeire az ökoszisztéma elemmérlegének ismertetésénél még visszatérünk.

4.2. Magnézium

Ennek a kationnak az intraszisztem ciklusa igen hasonló a kalciumhoz, de abszolút mennyiségei kg ha^{-1} $év^{-1}$ értékekben jóval alacsonyabbak. A nettó primer produkcióban levő felvett elemmennyiségeknek kb. 12%-a rak-

tározódik a növények fásodó részeiben, a többi az avarral lehull, ill. az erdőn áteső vízzel mosódik vissza a talajra. Az avaron áthulló csapadék a Mg-t — nagyobb oldékonysága miatt — a Ca-nál gyorsabban mossa ki, az avarbomlás során is hasonló ütemű az elem felszabadulása (az ősszel lehullt lombavar Mg-vesztesége különösen a lehullás utáni hónapokban gyors). Miután azonban a talajban a gravitációs vízzel évente igen jelentős mennyiségű Mg kerül ki az ökoszisztémából, az intraszisztém ciklus zavartalan menetéhez a talajban és a humuszban tárolt készletek „fogyasztásának" kell bekövetkezni. Az intraszisztém elemmérleg tehát — hasonlóan a Ca-hoz — itt is negatív a talaj szubszisztém számára.

4.3. Nátrium

Közel azonos mennyiség érkezik a csapadék inputtal, mint amennyi a nettó primer produkcióba évenként felvevődik. A lombon áteső és a törzsön lefolyó vízben csak kevéssel növekszik a talajig lejutó víz Na-tartalma, az avaron átjutó vízben azonban már megindul a vízben oldott Na-ionok mennyiségi növekedése. Ez a növekedés a talajban lefelé haladva — összefüggésben a talaj adszorbeált Na-tartalmával — az alsóbb talajszintekben még tovább emelkedik és az 1 m mélységben, a gravitációs vízzel az input nátrium 4—5-szörös mennyisége távozik a rendszerből. Amíg tehát a Na intraszisztém ciklusa az input pótlódás miatt zavartalanul végbemehet, addig ez a mozgékony elem már a talaj szubszisztém számára negatív mérleget mutat. Miután a nátriumot az élőlények nem halmozzák fel szerves formában, a talaj ion-háztartásában pedig nincs, ami kikapcsolná és benn tarthatná, könnyen távozik az output vízzel. Végső soron így a talajból történő jelentős kimosódása miatt az ökoszisztéma mérlegében a Na is a lassan fogyó elemek közé tartozik.

4.4. Mangán

Az ökoszisztéma egyes kompartmentjei között évenként jelentős Mn-mennyiségek mozognak. A felvett Mn legnagyobb része a zöld levelekben kerül az ökoszisztéma élő részébe és az elhalt autotróf, ill. heterotróf komponensekkel hullik vissza a talajfelszínre. Viszonylag kevés az élő részekből való kimosódás, jelentős azonban az elhalt avart átmosó csapadékvízben mért mennyiség. A nettó primer produkcióval felvett Mn-mennyiségek közel egyharmada hiányzik a visszakerülés és raktározás mért blokkjaiból. Ezen mennyiségek valószínűleg az évente többször is kicserélődő hajszálgyökérzetben, az elemzésbe nem vont cserjeavarban, ill. a heterotróf és dekomponáló szervezetekben találhatók meg. Erre utal az is, hogy pl. az avarbomlási kísérletekben a Mn mennyisége a baktériumszám növekedésével párhuzamosan nőtt. A mikroorganizmusok ugyanis képesek az oldható formában levő Mn^{2+} ionokat old-

hatatlan Mn^{4+} vegyületekké alakítani. A gravitációs vízzel csak igen kis mennyiségű mangán távozik az ökoszisztémából, tekintve azonban, hogy még ennél is kevesebb érkezik az input csapadékkal, az ökoszisztéma mérlegében ez az elem is negatív tendenciájú.

4.5. Kálium

Az ökoszisztéma élő részeinek igen könnyen kimosódó eleme. A csapadékvíz lombon átjutó és törzsön lefolyó mennyiségében az összes elem közül közül a K dúsul fel legnagyobb mértékben. A lombavar bomlása során is hirtelen lecsökkenhet az abszolút K-mennyiség már a lehullást követő év márciusáig, függetlenül a levélszövet bomlási sebességétől. A talajra jutva annak szervesanyag és agyagtartalma jól adszorbeálja, így az erős fixálás miatt a talaj mélyebb rétegeibe már csak igen kis mennyiségben jut le. Az input—output ökoszisztéma-mérlegben pozitív elemnek tekinthető, az input csapadék K-mennyiségének a gravitációs víz outputjával távozó mennyiség csupán 7%-a.

Az intraszisztém mozgásokban a nettó primer produkcióban felvett káliummennyiség 14%-a raktározódik a fásodó részekben, 26,4% mosódik ki a lombon áthulló és törzsön lefolyó vízzel, 22(—30)% a lombavarral kerül a talajra és kb. 12% a fitofágok faecesével és elhalt testével. A mérleg hiányzó kb. 20%-a a mangánnál említett komponensekben kereshető.

4.6. Nitrogén

A tápanyagforgalomban igen fontos nitrogén mennyisége a nettó primer produkcióban, az elemek között a legmagasabb. Az évi N-felvételből 23,3% raktározódik a fásodó növényi részekben, 35,8% (40%) a lombavarral hull le a talajra, 15% a fitofág szervezetek fogyasztási láncába kerül és csak 2,8% mosódik le a csapadékvízzel.

Az input csapadékvízben évenként átlagban 22,62 kg N került be egy hektárnyi erdőállományba és ebből 1,60 kg volt nitrát-nitrogén. A légköri nitrogén magas N-tartalma a levegő fokozódó mértékű elszennyeződésének jelzője (pl. műtrágyázás, ipari légköri szennyeződés stb.). Az 1970-es évek előtt magyarországi átlagban a légköri csapadék N-tartalma még csak 14,6 kg ha^{-1} $év^{-1}$ volt (Kozák 1971).

A lombon áteső és a törzsön lefolyó vízben a nitrogéntartalom növekedése elég kismértékű. A vizsgálati években többször előfordult, hogy egyes hónapokban egynél kisebb dúsulási tényezők is jelentkeztek, ami a légköri csapadék N-koncentrációjának csökkenését jelzi a növényzeten átjutó vízben (lásd Carlisle et al. 1966, Nihlgard 1970 stb.). Összefügghet ez azzal, hogy a növény a levélre került csapadékból nitrogénvegyületeket (elsősorban nitrátokat) vehet fel.

A lombavar bomlási folyamatában is megfigyelhető volt az avar N-tartalmának csökkenő, ill. emelkedő fluktuációja. A bomló avar N-tartalmának csökkenése főleg a téli-tél végi hónapokban jelentkezett, ami összefügghet a fagyás, ill. olvadás következtében történő avar szöveti fellazulásával és a kimosódási folyamat erősödésével (hasonló jelenségről számolt be ANDERSON 1973, GOSZ—LIKENS—BORMAN 1973 stb. is). A bomló avar N-tartalmi növekedése pedig a külső hatásokon (csapadék input, faeces, friss növényi törmelék, stb.) kívül elsősorban a mikroorganizmusok N-tevékenységéhez (nitrifikáció, ammonifikáció, N-fixálás stb.) kapcsolható.

A vizsgált erdő agyagbemosódásos barna erdőtalajában a nitrogén legnagyobb része szerves kötésű N-formában van jelen. Ennek mennyisége a 0—20 cm-es talajszintben 1,8 tonna ha^{-1}-ra becsülhető. Az ammónia általában a felső talajszintben megkötődik, mint kation adszorbeálódik és gyorsan felvevődhet. A NO_3-N is jól felvehető az autotrófok részére, ez a N-forma azonban a gravitációs vízben is könnyen mozog lefelé a talajban és távozhat az ökoszisztémából. A nitrát-nitrogén gravitációs vízben való dúsulása összefüggésben lehet a Ca és Mg mobilizációjával is. Jelentős mennyisége és a talajvíz növekvő nitrát-tartalma miatt e jelenség környezetvédelmi szempontból is figyelemre méltó.

A terepen és a laboratóriumban végzett vizsgálatok alapján a mineralizációs dinamika intenzitása a legnagyobb az április—május—június (utóbbiban volt mérhető a maximum is), valamint az őszi lombhullással párhuzamos szeptember—október—november hónapokban (lásd KOVÁCS 1978).

Az időben és térben igen bonyolult nitrogén intraszisztém- és ökoszisztém-mozgások az ökoszisztéma élő részének N-szükségletét bőven fedezni tudják. 5 év vizsgálati eredményeinek átlagában megállapítható, hogy az input-output mérleg az összes N-re pozitív az ökoszisztéma számára. Vagyis az erdő abszolút N-tartalma növekszik, aminek oka elsősorban a csapadékvízzel érkező megnövekedett N-input, valamint a talajban folyamatosan történő N-megkötés.

Az avarbomlással és a csapadékkal a talajra jutó N-mennyiség jelentős eltérést mutat az avarliziméteren átjutó vízben mért mennyiségekkel szemben. Ez azzal magyarázható, hogy az avarliziméterekben a mikrobiális lebomlás kevésbé volt intenzív, mint a közvetlenül a talaj felszínére kihelyezett nylon-háló zsákos vizsgálatoknál, mivel az avarliziméterekben kisebb az avar nedvességtartalma és a talajból történő N-felvétel lehetősége sem áll fenn.

4.7. Foszfor

A primer nettó produkció foszfor tartalmának kb. 14%-a a fásodó növényekben raktározódva az intraszisztém ciklus stagnáló része lesz. A talajra való visszakerülésben a legnagyobb mennyiség (50%) a lehulló lombavarral

mozog, de jelentős a fitofág úton való visszakerülés is. A levegőszennyeződésből eredő foszfor az input csapadékkal kb. 1 kg mennyiségben jut évente egy hektár erdőfelületre. A csapadékvíz lombon áthaladása során ez a mennyiség kb. másfélszeres értékkel növekszik. Hasonlóan a nitrogénhez, a lombon áteső vízben is lehetett néhány alkalommal koncentrációcsökkenést mérni, ez ennél az elemnél is jelzi az autotrófokba föld felett, levélen át történő beépülés lehetőségét. Amíg a biocönózison áthaladó csapadékvíz P-koncentrációinak maximumai májusban (fitofág gradáció) és novemberben (az elhaló, még fán levő levélből történő kimosás) jelentkeztek, az avarbomlás során az első tél utáni koratavaszi időszakokban volt jelentősebb a foszfortartalom-csökkenés. A humuszos talajfelszínen a foszfor legnagyobb része adszorbeálódik és szinte elhanyagolható az a mennyiség, ami a gravitációs vízzel kikerül az ökoszisztémából. A foszfor mérleg tehát az ökoszisztéma számára pozitív.

4.8. Kén

A kén viszonylag nagy mennyiségben van jelen az input csapadékvízben. Ennek oka az utóbbi idők növekvő levegőszennyeződése. A lombon áteső vízhez az erdő lombkoronája tekintélyes mennyiségű ként „adott", ami elsősorban a zöld levelekből történő kimosódásból keletkezhetett. Az ősszel lehullott lomblevél S-tartalmára és az avarbomlás során történő S-felszabadulásra nincsenek adataink, az avarliziméterben mért kénmennyiség azonban igen nagy mennyiségű. A talajra kerülő kénnek kb. 90—95%-t a talaj szervesanyagai és agyagtartalma visszatartja, a gravitációs víz kénkoncentrációja az alsóbb talajszintek felé már alig csökken. Az output vízzel az input csapadékban érkező S-mennyiségeknek csak kb. egyharmada távozik, vagyis az ökoszisztéma évente jelentős kénmennyiségekkel gyarapszik.

4.9. Klór

A klór-ion jelentős része a csapadékkal kerül az ökoszisztémába, a föld felett élő részek és az avar átmosásakor csak kevéssé gyarapszik a talajra jutó mennyiség. Miután a nettó primer produkcióban és az avarban nem történt meg a Cl-ion mennyiségi mérése, az intraszisztém ciklusát nem lehet hozzávetőlegesen sem elemezni. A gravitációs víz liziméteres vizsgálatai azonban kimutatták, hogy a klorid a talaj felső szintjében jól adszorbeálódik és a talajfelszínre csapadékvízzel érkező mennyiségnek csak mintegy 10—15%-a távozik az output vízzel. A klór-ion mérleg tehát a talaj szubszisztém, de az egész ökoszisztéma számára is pozitív.

4.10. Vas

A primer produkcióba felvett vasmennyiségnek közel fele raktározódik a fásodó részekbe, másik fele az avarral lehull a talajra. Igen kevés a csapadékvízzel való bekerülés és a növényzeten áthulló vízben való dúsulás. Érdekes viszont, hogy a lombavarbomlási kísérlet során az avar Fe-koncentrációja egy kezdeti csökkenés után többszörösére emelkedett. A vas az erdő talajában — rendszerint felvehetetlen formában — jelentős mennyiségben van jelen. A nagy mikrobiális aktivitás és a talaj savasabb pH-értéke segítheti a talajból az avarszintbe történő Fe-diffúzió végbemenését. A vas egy része a növényi szövetekben vízoldékony fehérjékkel olyan komplexeket képezhet, ami könnyen kimosódhat (GILBERT 1957), feltehető tehát, hogy a kezdeti koncentrációcsökkenést viszont az ilyen vegyületek kimosódása okozhatta. Az inraszisztém mozgásokból kikerülő vas, amelynek mennyisége a gravitációs vízben 1 m mélységben már nem mérhető, főleg a talaj 50—80 cm-es mélységében csapódik ki vasborsók alakjában.

4.11. Az intraszisztém ciklusok időbeni alakulása

Összegezésként megállapítható, hogy az ökoszisztémán belüli elemmozgások — tekintve, hogy a humuszban és a talajban is nagy mennyiségű raktározott készletek vannak felhalmozva — az erdő tápanyagigényét jelenleg még zavartalanul biztosítani tudják. A lombavarból történő elemfelszabadulás maximumai, a növények számára fontos tápelemek esetében, a téli—tavaszi időszakra esnek. Így a növények a lombfakadás megindulásakor jelentős tápelemmennyiségekhez juthatnak, ami jól kiegészíti az őszi lombhullási időszak idején a növényi testbe visszavándorolt rezerv tápanyagok mennyiségét. Lombfakadás után a talaj tápanyagai elsősorban a csapadékból és a föld feletti részekből történő ki- és lemosásból nyernek jelentősebb tápanyag-utánpótlást. A bomló lombavar ebben az időszakban egyes elemekre (pl. nitrogén) már maga is „fogyasztóként" léphet fel. A fitofágok gradációjakor, elsősorban a nagy mennyiségű faecesszel a talajra kerülő elemek egy része — elsősorban a mobilis kationok (pl. K) — valószínűleg igen hamar ismét felvevődik (tehát az elem egy vegetációs periódus alatt többször is cirkulálhat!). Ez biztosíthatja, hogy az erdő asszimiláló felületében a fitofágok rágása miatt bekövetkező viszonylag nagy mértékű károsodási hiány, a gyorsan képződő új hajtások révén igen hamar pótlódik. Megfigyeléseink szerint azonban egy erdő ilyen típusú autoregulációja csak akkor következik be, ha az állomány az adott környezetében tartósan egyensúlyi helyzetben van, vagyis elsősorban a még természetes vagy természeteshez közelálló erdők esetében.

5. Az ökoszisztéma elemmérlege, következtetések

A természetes erdők esetében az atmoszférikus (meteorológiai) input a csapadékvízben és a hóban oldott ásványi anyagokból, valamint a levegő természetes és emberi tevékenység hatására bekerülő szennyező gázaiból, továbbá a porból és egyéb szélhordta részekből tevődik össze. Mérsékeltövi lombhullató erdők esetében a levegőben levő anyagok jelentősebb része (a CO_2 kivételével) a csapadékvízzel kapcsolódva jut be az ökoszisztémába. Ezeknek a mennyisége jó közelítéssel meghatározható a hidrológiai és csapadékkémiai paraméterek ismeretében (LIKENS —BORMAN 1972). Atmoszférikus inputnak lehet tekinteni a nitrogén talajfelszíni és talajbani nitrogénkötő baktériumok által történő fixálását is. Az atmoszférikus output a szilárd részecskék szél általi elhordásából és a gázdiffúzióból adódik (bár érvényesül a konvekciós hatás is). Ez az output a természetes erdők esetében általában kis mértékű, ide sorolható a denitrifikációs úton felszabaduló N is.

A geológiai input a természetes erdők stabilitása esetén általában lassú is kismértékű. Jelentősebb lehet a geológiai output, amely a talaj mélyebb rétegeibe lefolyó gravitációs víz ásványianyag tartalmából adódik.

Az elemek biológiai input és outputja többnyire még a konzumens szervezetek migrációjából és egyéb tevékenységéből tevődik össze, a természetes mérsékeltövi erdőkben nagyságrendjük kicsi.

A „Síkfőkút Project" elemvizsgálatai során nyert adatokat vizsgálva igen érdekes és gondolatokat ébresztő tendenciákat figyelhetünk meg akkor is, ha nem az ökoszisztémán belüli (intraszisztém) kompartmentek egymás közötti elemmennyiségi alakulásait vizsgáljuk, hanem olyan mérleget készítünk, ahol csak az ökoszisztémába évenként bekerülő (input) és az ökoszisztémából évente kikerülő (output) elemmennyiségeket vetjük egybe (lásd 1. ábra 1-es és 9-es blokkja, ill. a 10-es blokk).

Első látásra is feltűnő, hogy a kalcium, magnézium nátrium és mangán, valamint a NO_3-ban határozottan negatív (az ökoszisztémából fogyó), a K, P, S, Cl, valamint az összes N-ben pedig pozitív (az ökoszisztémában gyarapodó) tendenciájú az elemmérleg. Hasonló tendenciájú ökoszisztéma elemmérleget észleltek pl. MAYER (1972), ULRICH —MAYER (1973) Közép-Németországban, de a világ számos más területén is (lásd LIKENS et al. 1977). Az ökoszisztéma input-output elemmérlegének ez az alakulása az alábbi néhány általánosítható megállapítás feltételezését teszi lehetővé.

5.1. A talajsavanyodás problémája

A talajtani kutatásokból ismert, hogy a fokozódó műtrágyázással (+ öntözéssel) meggyorsul a Ca-, Mg- stb. kationok mobilizálása és a lefelé áramló gravitációs vízzel a felsőbb talajszintekből történő kimosódása. A Ca és Mg

kilúgzását a talajba kerülő NO_3^-, továbbá a szabad SO_4^{2-}, mint kísérő anionok még fokozzák. A folyamat a talaj fokozatos elsavanyodását okozza (KLAUSING 1956, STEFANOVITS 1977, MAYER—ULRICH 1977 stb.).

A mezőgazdasági talajoknál a műtrágyázás és egyéb emberi hatások (kemikáliák) miatt végbemenő általános és világméretű talajsavanyodási folyamatokkal analógnak tekinthetjük a síkfőkúti vizsgált „természetes" erdőben a Ca- és Mg-kationok terén tapasztalt kimosódási tendenciát, amely végső soron az ökoszisztéma Ca-, Mg- negatív mérlegében jelentkezett. Az erdőbe a környező agrárterületek fokozódó mértékű intenzív műtrágyázásaiból bőven kerülhet be a csapadékvízzel pl. nitrogén, de a légszennyeződésből kén is („savas esők"). Ezek önmagukban is fokozzák a talaj elsavanyodását (ULRICH 1972, RAPP 1973, OLSCHOWY et al. 1974, KÜHN—WELLER 1977, ULRICH et al. 1978, ODEN in RAMADE 1977 p.: 58—59 stb.).

A savanyodó közegben az oldhatatlan karbonátokban és egyéb kötésekben jelenlevő Ca- és Mg-kationok a talaj felső rétegében, a víz és a jelenlevő CO_2 hatására, elsősorban oldható Ca-, ill. Mg-hidrokarbonátok formájában, de $Ca(NO_3)_2$, ill. $Mg(NO_3)_2$ stb. formájában is a gravitációs vízzel az ökoszisztémából könnyen kimosódnak és a mélyebb talajrétegekbe (esetleg a talajvízbe) kerülhetnek. A mélyebb rétegekben a Ca- és Mg-bikarbonátok visszaalakulhatnak Mg- és Ca-karbonátokká (mészlencsék, mészlepedékek, dolomitszemcsék stb.), ekkor azonban a biológiai körforgalomból már hosszú időre (esetleg véglegesen) kivonódtak. A síkfőkúti erdő 1—1,5 m-es talajmélységeiben jól megfigyelhetők ezek a kialakult kemény, „meszes" rétegek, ill. csomók.

A vizsgált erdő pH-viszonyai — különösen a talaj felső szintjeiben — savanyú (pH 4,1—4,8) kémhatást mutatnak. Ezt a talajsavanyúságot az erdőben acidofil növényfajoknak *(Luzula nemorosa, Hieracium sp.*-ek *Veronica officinalis, Deschampsia flexuosa* stb.) kellene jelezni. E fajok jelenléte az erdőben azonban jelenleg még legfeljebb csak véletlenszerű. A nagy dominanciájú és konstans növények ma még egyértelműen a semlegeshez közelálló pH-jú, inkább neutrális talajt jeleznek (lásd PAPP—JAKUCS 1976: a fitocönológiai táblázat fajainak R-számai).

A ténylegesen mért talajsavanyúság és az „acidofil" növényfajok hiányzásának egybekapcsolódása arra a feltételezésre enged következtetni, hogy *a talajsavanyodási* (Ca-Mg negatív mérleg kialakulási) *folyamat nem régen gyorsult fel a területen.* Az időpont valószínűleg összekapcsolható a műtrágyázás és a levegőszennyeződés általános fokozódásával (kb. 1965—1970 óta).

Várható ettől a kismértékű, de tendenciájában egyértelműen elindult talajsavanyodási folyamattól, hogy az erdő aljnövényzete — rövid időn belül — fajainak átcserélődésével is jelezni fogja az ökoszisztéma Ca-Mg negatív mérlegének jelentkezését.

5.2. Az ökoszisztéma pozitív nitrogénmérlegének következményei

Az ökoszisztéma legfőbb növényi tápanyagainak (N, P, K) „mérlege" egyértelműen pozitív (lásd 4.5—4.7 fejezetek). Becsléseink szerint különösen a nitrogén-formák évről évre növekvő gyarapodása jellemzi az erdő felsőbb talajszintjének elemösszetételét. Az input N-többletet az ökoszisztémának az autotróf produkcióba, ill. a humuszba való bekerüléssel kellene tolerálni.

A vizsgált erdő fő fitomassza-mennyiségét adó fái azonban az elmúlt években gyorsuló ütemben haltak el (az 1972-ben számolt 816 db ha^{-1} fának 1980-ra kb. 15—16%-a elhalt). A fák fokozódó elhalása valószínűleg az erdő „öregebbé" válásával együtt járó kompetíciós okok miatti „felritkulás" lehet. A megmaradó fáknál egyedenként mérhető az évi produkció lassú növekedése, de hektárviszonylatban jelenleg nem lehet a fás növények produkciónövekedését kimutatni. Így nem látszik reálisnak az, hogy az erdő gyarapodó fitomasszája tárolná az ökoszisztémába bekerülő N-többletet, sőt az elhalt, földre került fák fitmasszájának bomlása még további N-növelő hatást is jelenthet.

A nitrogén gyarapodás helye tehát csak a humuszos felső talajszint lehet. Bizonyítani látszik ezt az, hogy az erdő lágyszárú növényzetében az utóbbi években megjelentek és erősen szaporodnak az ún. „nitrofita" növényfajok (*Geranium robertianum*, *Galeopsis pubescens*, *Galium aparine*, *Impatiens parviflora*, *Lapsana communis* stb.). A nagy vitalitású nitrofita-lágyszárúak az erdő természetes lágyszárú növényzetének stabilitásmegbontását okozhatják, ami az eredeti génkészlet csökkenésével járó folyamatot fog eredményezni.

A mezőgazdasági műtrágyázás ugrásszerű felgyorsulásának, ill. az ipari eredetű N-levegőszennyeződés növekedésének kedvezőtlen hatásából tehát még a „zavarástól mentes" természetközeli állapotban levő ökoszisztémák sem tudnak mentesülni.

5.3. Új gondolatok a légköri CO_2 dúsulási folyamathoz

A világ ökológusait foglalkoztató gondok között kitüntetett helye van az atmoszféra széndioxid növekedésével bekövetkezhető bioszféraváltozások előrejelzésének. Az utóbbi 20 évben könyvtárnyi publikáció foglalkozik a széndioxid-problémával. 1979-ben a Scientific Committee on Problem of the Environment/International Council of Scientific Unions (Bolin et al. 1979), valamint a The National Research Council, Climate Research Board (Nat. Acad. of. Sc., Washington) tekintette át a felgyülemlett ismeretanyagot, 1980-ban — többek között — az Experimentia-folyóiratban jelent meg interdiszciplináris tanulmány a CO_2-probléma legújabb értékeléséről (Bach et al. 1980).

A tanulmányok egybehangzóan jelzik, hogy az ipari forradalmak óta megindult atmoszferikus CO_2-koncentráció növekedés napjainkban kezd ex-

ponenciálisan emelkedő mértéket ölteni s ez a növekedési ütem 2000-ig előreláthatóan már nem lesz megállítható. A fosszilis tüzelőanyagok (kőszén, kőolaj, földgáz stb.) fokozódó égetéséből, a világ hatalmas — főleg trópusi — erdőterületeinek gyors ütemű megsemmisítéséből, valamint a humusznak az agrotechnika és erózió által történő fokozódó megbontásából évente a számítások és becslések átlagában 8—9 Gt szén kerül az atmoszférába. Ez az atmoszféra széndioxid-koncentrációjának évi 4—5 ppm-el való növekedését jelentené. A levegő CO_2-koncentrációjának ilyen ütemű növekedése számos, komplexen jelentkező globális hatás okozója lenne, így pl. a világ légkörének felmelegedése és csapadékosabbá válása („üvegházklíma"), a sarki jégtakaró gyors olvadása és az óceánok jelentős mértékű vízszintemelkedése, a hirtelen megváltozott ökológiai viszonyokhoz nehezebben alkalmazkodni tudó élőlények tömeges pusztulása stb.

Ugyanakkor azonban a Föld számos pontján folyamatosan működő műszeres mérőállomások (Hawai, Északi-sark, Szamoa, Alaszka, Skandinávia stb.) egybevágóan a számítottnál sokkal kisebb mértékű — bár szintén exponenciális tendenciájú — atmoszferikus CO_2-gyarapodást regisztráltak (kb. 1,5 ppm $év^{-1}$). A számított és mért szén különbségének hollétéről (mennyisége 4—5 Gt $év^{-1}$) számos hipotézis született, a valóság az, hogy ez *az eltűnt szén* („lost carbon") *egyike a bioszféra máig is megoldatlan legnagyobb kérdéseinek* (Bolin 1970, Olson 1970, Baes et al. 1976, Woodwell et al. 1978, Stuiver 1978, Siegenthalter—Oeschger 1978, Bach et al. 1980. stb.).

Az „eltűnt" szén elnyelő helyei között első helyen említik az óceánok C-felvevő kapacitásának növekedését. Ma azonban ez még nem bizonyított kellőképpen és miután a szárazföldi biota (biomassza) sem építi be, ill. nyeli el a számítások szerinti CO_2-többletet, általános az a vélemény, hogy a feleslegeket valamilyen még ismeretlen nyelőnek vagy elnyelőknek kell kiegyensúlyozni (lásd idézett cikkek).

Nem kívánunk e helyen a széndioxid-probléma bonyolult kérdéseibe mélyebben belemerülni, úgy véljük azonban, hogy egy eddig kellően figyelemre nem méltatott jelenséget tudunk felvetni, amely hozzájárulhat az atmoszferikus CO_2-többlet forráselnyelési problémájának megismeréséhez.

Az 5.1. fejezetben, a talajsavanyodás problémakörénél már vázoltuk azt a folyamatot, hogy elsősorban napjaink megnövekedett műtrágyázásának és a kemikáliák fokozott használatának, valamint a növekvő levegőszennyeződésnek hatására felgyorsult a Ca és Mg ionok mélyebb talajrétegekbe mosódása és ott a kis- és nagycirkulációs folyamatokból való kikerülése, stagnálóvá válása. E folyamat világszerte ismert, mégsem fordult kellő figyelem eddig arra, hogy a talajba mosódó Ca- és Mg-ionokkal igen nagy mennyiségű szénatom is kivonódik a cirkulációs folyamatokból. Ezek a C-atomok végső soron a légkör CO_2-készletéből jutnak az ökoszisztémák talajfelszíni részeibe, ahol a mikroorganizmusok hatására feldúsulnak és különböző ioncserélődési folya-

matok révén kapcsolódhatnak a Ca- és Mg-ionokhoz. A lefelé áramlás többnyire hidrokarbonát formájában történik és vagy a talajvíz (ill. mélyebb vizek) hidrokarbonát tartalmát növelik, vagy a talajkolloidokban stagnálnak, vagy karbonátokká alakulnak vissza. Bár a bikarbonátok karbonátokká való alakulásánál ismét szabadul fel CO_2, elképzelzető, hogy ezek is fixálódhatnak a szilikátok megbontásában és más talajkémiai folyamatokban.

Ma még nincsenek kellő méréseink a fentiekre, de *felvethető, hogy az atmoszféra hiányzó CO_2-többletét nemcsak az óceánokban, hanem a szárazföldi talajokban felgyorsuló mészkő-dolomit-stb. képződési formákban is keresni lehet.* Úgy véljük, hogy a vizsgált síkfőkúti erdő-ökoszisztémára kimutatott Ca-, Mg-negatív elemmérleg — ha itt kis dimenziójú is — általánosítható a szárazföldi agrár-ipari és természetes ökoszisztémák nagy részére is, és a fenti hipotézis felvetését indokolja, ill. alátámasztani is látszik azt.

6. Összefoglalás

A magyarországi MAB-programon belül vizsgált lombhullató erdő-ökoszisztéma („Síkfőkút Project") néhány elemének kis- és nagycirkulációs alakulásait több éves, összekapcsolt elemzésekkel nyomon követve, összességében úgy tűnik, hogy az erdő elemmérlege nem egyértelműen mutatja azt a stabilitást, ami „természetes" állapotú ökoszisztémában várható lett volna. Véleményünk szerint az ökoszisztéma elemmérlegeiben jelentkező olyan jelek, mint a legfontosabb tápelemek (N, P, K, S stb.) pozitív, ill. egyes kationok (Ca, Mg, Na stb.) negatív mérlege — ha kis mértékben és csak tendenciájukban is — végső soron napjaink fokozódó környezetszennyeződésének és a kemikáliák növekvő felhasználásának a bioszféra egyensúlyt megzavaró hatására mutathatnak rá.

IRODALOM

Anderson, J. M.: The breakdown and decomposition of sweet chesnut (Castanea sativa Mill.) and beech (Fagus silvatica L.) leaf litter in two deciduous woodland soil. II. Changes in the carbon, hydrogen, nitrogen and polyphenol content. — Oecologia **12,** 275—288 (1973).

Bach, W.—Bröhl, H.—Fischbach, U.—Goudriaan, J.—Humpicke, U.—Kohlmaier, G. H.—Kratz, G.—Louwerse, W.—Marchetti, C.—Niehaus, F.—Oeschger, H.—Rotty, R. M.—Schunck, W.—Siegenthaler, U.—Keulen, H. van.—Laar, H. H. van.: The carbon dioxide problem. An interdisciplinary survey. — Experientia, **36,** 767—890 (1980).

Baes, C. F.—Goeller, H. E.—Olson, J. S.—Rotty, R. M.: The global carbondioxid problem. — Publ. Oak Ridge Nat. Lab. Environm. Sc. Div., No. 937, ORNL — 5194, Springsfield, Virginia (1976).

Bolin, B. The carbon cycle. — Scient. Amer. **223,** 125—145 (1970).

Bolin, B.—Degens, E. T.—Kempe, S.—Ketner, P. (eds.): SCOPE 13 „The global carbon cycle" — Wiley, New York (1979).

Carlisle, A.—Brown, A. H. F.—White, E. J.: The organic matter and nutrient elements in the precipitation beneath a sessile oak (Quercus petraea) canopy. — J. Ecol. **54,** 87—98 (1966).

FELFÖLDY, L.: Biológiai vízminősítés. — Mscr. (1972).
GILBERT, F. A.: Mineral nutricion and the balance of life. — Univ. Oklahoma Press Norman (1957).
GOSZ, J. R.—LIKENS, G. E.—BORMANN, F. H. Nutrient release from decomposing leaf and branch litter in the Hubbard Brook Forest, New Hampshire. — Ecol. Monogr. **43,** 173—191 (1972).
JAKUCS, P. (ed.): Ecology of an oak forest in Hungary. — Results of „Síkfőkút Project" I. Structure, primary production and mineral cycling. — Akadémiai Kiadó, Budapest (in press). (1982).
KÁRÁSZ, I.: Produkcióvizsgálatok a síkfőkúti cseres-tölgyes erdő cserjeszintjében I. (Shrub layer production investigations in the Quercus petraea—Qu. cerris ecosystem of the Síkfőkút research area I.). — Acta Acad. Paed. Agriensis. N. S. **15,** 467—477 (1979).
KLAUSING, O. : Untersuchungen über den Mineralumsatz in Buchenwäldern auf Granit und Diorit. — Forstwiss. Cbl., **75,** 18—32 (1956).
KOVÁCS, M. Stickstoffverhältnisse im Boden des Eichen-Zerreichen-Waldökosystems. — Oceol. Plant. (Paris) **13,** 75—82 (1978).
KOVÁCS, M. Untersuchung des Nährstofftransports in Boden des Eichen-Zerreichenwaldes. — Acta Bot. Hung. **26,** 91—99 (1980).
KOZÁK, M.—MÉSZÁROS, E.: Magyarországi csapadékvizek kémiai összetétele és mezőgazdasági jelentősége. — Agrokémia és Talajtan **20,** 329—352 (1971).
KÜHN, H.—WELLER, H.: 6 jährige Untersuchungen über Schwefelzufuhr durch Niederschläge und Schwefelverluste durch Auswaschung (in Lysimetern). — Z. Pflanzenernährg. u. Bkde. **140,** 431—440 (1977).
LIKENS, G. E. —BORMANN, F. H.: Nutrient cycling in ecosystems. — In Weins, J. A. (ed.): Ecosystem structure and function. Oregon St. Univ. Press Corvallis p. 25—67 (1972).
LIKENS, G. E.—BORMANN, F. H.—PIERCE, R. S.—EATON, I. S.—JOHNSON, N. M.: Biogeochemistry of a forested ecosystem. — Springer, New York—Heidelberg—Berlin (1977).
MAYEY, R. Bioelementflüsse im Wurzelraum saurer Waldböden. Messung und Ergebnisse. — Mitteilgn. Deutsch. Bodenkundl. Gesellsch. **16,** 136—145 (1972).
MAYER, R.—ULRICH, B. : Acidity of precipitation as influenced by the filtering of atmospheric sulphur and nitrogen compounds, its role in the element balance and effect on soil water. — Air and Soil Pollution **7,** 409—416 (1977).
MÉSZÁROS, L. I.: Die Elementgehalte der krautigen Vegetation des Quercetum petraeae-cerris-Waldes von Síkfőkút. — Acta Bot. Hung. **25,** 89—106 (1979).
NIHLGARD, B.: Precipitation, its chemical composition and effect on soil water in a beech and a spruce forest in South Sweden. — Oikos **21,** 208—217 (1970).
OLSCHOWY, G.—BÜRGER, K.—ZWISNER, E.—WEBER, D. Auswertung von Untersuchungen. und Forschungsergebnissen zur Belastung der Landschaft und ihres Naturhaushaltes — Schriftenr. f. Landschaftspflege u. Naturschutz **10,** 1—119 (1974).
OLSON, J. S.: Carbon cycles and temperate woodlands. — in: Reichle, D. E. (ed.): Analysis of temperate forest ecosysteme. Springer, Berlin p. 226—241 (1970).
PAPP, M.: Fitomassza és produkcióvizsgálatok a síkfőkúti cseres-tölgyes erdő lágyszárú szintjében (Phytomass and production investigations of the herbaceous layer in an oak forest near Síkfőkút in 1974—1975). — Botanikai Közl. **67,** (1980).
PAPP, B. L.: Die Nettoproduktion der Bäume eines Quercetum petraeae-cerris-Waldes auf der Probefläche von Síkfőkút (Nord Ungarns). — Acta Bot. Hung. **25,** 111—123 (1979).
PAPP, M.—JAKUCS, P. Phytozönologische Charakterisierung des Quercetum petraeae-cerris-Waldes des Forschungsgebiets „Síkfőkút Project" und seiner Umgebung. — Acta Biol. Debrecina **13,** 109—119 (1976).
RAMADE, F. Écotoxicologie. — Masson, Paris—New York—Barcelona—Milan (1977).
RAPP, M. Le cycle biogeochimique du soufre dans un foret du Quercus ilex L. de sud de la France. — Oecol. Plant. **8,** 325—334 (1973).
SIEGENTHALER, U.—OESCHGER, H. Predicting future atmospheric carbon dioxide levels. — Science **199,** 388—395 (1978).
STEFANOVITS, P. (ed.) Talajvédelem, környezetvédelem. — Mezőgazdasági Kiadó, Budapest (1977).
STUVIER, M.: Atmospheric carbon dioxide and carbon reservoir changes. — Science **199,** 253—258 (1978).
SZABÓ, M.: Net precipitation in a Hungarian oak forest ecosystem. — Acta Bot. Hung. **21,** 151—165 (1975).
SZABÓ, M.: Nutrient content of throughfall and stemflow water in an oak forest (Quercetum petraeae-cerris) ecosystem. — Acta Agr. Hung. **26,** 241—258 (1977).

SZABÓ, M.—CSORTOS, Cs.: A study of the nutrient content of canopy throughfall in an oak forest (Quercetum petraeae-cerris) measured for one year. — Acta Bot. Hung. **21,** 419—432 (1975).

TÓTH, J. A.—PAPP, B. L.—LENKEY, B.: Litter decomposition in an oak forest ecosystem (Quercetum petraeae-cerris) of northern Hungary studied in the framework of „Síkfőkút Project". — In: Biodegradation et Humification. Rapport du 1er Colloque Internat, Nancy, p. 41—59 (1974).

ULRICH, B.: Die Filterfunktion von Böden. — In: STEUBING, L.—KUNZE, G.—JÄGER, J. (eds.): Belastung und Belastbarkeit von Ökosystemen, Giessen, p. 169—174 (1972).

ULRICH, B.—MAYER, R.: Systemanalyse des Bioelement-Haushaltes von Wald-Ökosystemen. In: Ellenberg, H. (ed.): Ökosystemforschung, Springer, Berlin—Heidelberg—New York p. 165—174 (1973).

ULRICH, B.—MAYER, R.—KHANNA, P. K.—PRENZEL, J.: Ausfilterung von Schwefelverbindungen aus der Luft durch einen Buchenbestand. — Z. Pflanzenernähr. Bkde. **141,** 329—335 (1978).

VARJÚ, M.: A növényi anyagok hamvasztásának néhány módszertani kérdése. — Agrokémia és Talajtan **21,** 139—150 (1972).

VIRÁGH, K.: Wachstumsanalyse der Sonnen- und Schattenblätter von Quercus cerris und Quercus petraea (1973—1975). — Acta Bot. Hung. **25,** 143—164 (1979).

WOODWELL, G. M.—WHITTAKER, R. H.—REINERS, W. A.—LIKENS, G. E.—DELWICHE, C. C.—BOTKIN, D. E.: The biota and the world carbon budget. — Science **199,** 141—146 (1978).

FÉNY- ÉS ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK A MOCSÁRI TEKNŐS *(EMYS ORBICULARIS)* SZÍVÉNEK ELSŐDLEGES INGERTERMELŐ KÖZPONTJÁN

ÁBRAHÁM AMBRUS

Bevezetés

Manapság világszerte sokan és sokat beszélgetnek a pacemakerről (pészméker) arról az életet osztogató készülékről, amelyet azoknak az embereknek a szíve tájékára helyeznek, akik szívritmus zavarokban szenvednek, vagy úgy is mondhatnám, hogy a szívük összevissza ver. A készülék egy elektromos műszer, valójában helyettes pacemaker, amely azzal, hogy a szívizomzatnak egyenlő időközökben egyenlő elektromos impulzusokat adagol, a megzavarodott szívritmust helyre állítja, a szívmozgásokat rendezi és a normalizált helyzetet rövidebb, hosszabb időre biztosítja.

Anyag módszerek

Vizsgálatainkat a mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szívén végeztük. Az anyagot a vizsgálatra a következőképpen készítettük elő. A dekapitált állatból kiszabadított szívből kivágtunk egy kis darabot a felső üres véna (vena cava superior), egyet az alsó üres véna (vena cava inferior), egyet a vénák tövéből, egyet a pitvari válaszfalból (septum atriorum), és egyet a kamra (ventriculus) faláből. A kivágott darabokat 20%-os neutrális formalinban fixáltuk. A fixált anyagból fagyasztott metszeteket készítettünk és ezeket impregnáltuk. Az impregnálást a Bielschowsky—Ábrahám-féle eljárás szerint végeztük (ÁBRAHÁM 1969). Hogy a pericelluláris idegrostfonadékok helyzetéről és szerkezetéről bővebb tájékozódást szerezhessünk, legszebben impregnált metszeteinket paraffinba ágyaztuk és ezekből 5 mikronos metszetsorozatokat készítettünk.

Mivel más anyagokon végzett impregnálásaink során azt tapasztaltuk, hogy a sejttestüktől elválasztott idegrostok erősen argentofillá válnak és ennek következtében jobban impregnálódnak, az állatok egy részén idegátvágásokat végeztünk. A bolygóideg (nervus vagus) ágai közül átvágtuk, hol a jobb oldalit, hol a bal oldalit, hol pedig mind a kettőt. Az állatok az operációt jól tűrték. Az egyik vágus átvágása semmiféle kiesési tünetet nem idézett elő. Az állatok rendesen táplálkoztak, mozogtak és az érzékszervi reakciókban sem

lehetett semmiféle különlegességet észlelni. A boncolás során azt tapasztaltuk, hogy egyik vagus átvágása után a nyelőcső helyenként gyomorszerűen kitágult és a vérellátás az egész bélcsatorna területén erősen lecsökkent. Mind a két vagus átvágása után az állatok éltek, de nem ettek semmit. Ennek ellenére, ahogy ezt három esetben tapasztaltuk, 32 napig is életben maradtak. Meg kell mondanunk, hogy az operált állatoknak a szívidegrendszere kitűnően impregnálódott, sokkal jobban, mint akkor, ha a beavatkozást mellőztük.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára a fent megnevezett szívszakaszokból kivágott darabokat glutáraldehiddel való előfixálás után 0,5%-os ozmium savban rögzítettük, és utána araldítba ágyaztuk. Az anyagból LKB ultramikrotommal ultravékony metszeteket készítettünk és ezeket Tesla D 242 és Jeol B 100 elektronmikroszkópokkal tanulmányoztuk. A vizsgálatokat Szegeden a Tudományegyetem Állattani és Biológiai Intézetében, az Orvosi Egyetem Biokémiai Intézetében, a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Központjában, Budapesten az Orvostovábbképző Intézetben és Tihanyban a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutató Intézetében végeztük. Munkálataink során segítettek dr. Stammer Aranka, dr. Párducz Árpád, dr. Guba Ferenc, dr. Virágh Szabolcs és dr. Benedeczky István. Mindnyájuknak ezúttal is köszönetet mondunk.

Színuszcsomó

Az igazi pacemaker a színuszcsomó, a szív jobb pitvari falazatának egy funkcionálisan körülhatárolt darabja, amely ahogy azt már Arisztotelesz tudta, elsőnek indul és utolsónak áll meg „primum movens et ultimum moriens" „Első mozgató és utolsó elhaló". Keith és Flack fedezte fel 1907-ben. Ezért Keith—Flack-csomónak is nevezik. Másik használatos neve atrioventrikuláris csomó (nodus atrioventricularis). Patten (1953) Muir (1955) és Van Mierop (1969) vizsgálatai amellett szólnak, hogy a színuszcsomó az emlősök szívének önállóan, külön fejlődő részlege. Ezek a vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a színuszcsomó nem az embrionális miokardium maradéka, hanem új szerzeményként jelenik meg az ontogenetikus fejlődés folyamán. Törzsfejlődéstanilag csak a madaraknál és az emlősöknél jelenik meg az alsóbb rendű gerinceseknek nincsen színuszcsomója. Ábrahám (1964), Challice és Virágh (1973). Igaz ugyan, hogy Hutter és Trautwein (1956), továbbá Denoit és Vassor (1970) a színusz venozus falában szétszórtan találtak olyan sejteket, amelyek mind elektronmikroszkópi, mind pedig elektrofiziológiai vizsgálatok szerint hasonlóak az emlősök nodalis sejtjeihez.

A színuszcsomó a szív jobb pitvarának a falában helyezkedik el a felső üres véna (vena cava superior) beömlésénél. Az emberi színuszcsomó répához hasonló, az emlősöké félhold alakú. Hossza felnőtt ember szívében nem több mint 3 cm, szélessége 3—4 mm, vastagsága 2 mm. Vastagabb fele a véna

cava superior felé esik. Feje az epikardiumot a miokardium felé határoló zsírszövetbe ütközik. Vékonyabb része a miokardiumban a criszta terminalisnak neki támaszkodva ferdén halad a jobb pitvar falában. Irányát a sulcus terminalis mutatja.

Laboratóriumi állatok legnagyobb részénél, amilyen a nyúl *(Lepus cuniculus)*, a tengeri malac *(Cavia cobaya)*, a sertés *(Sus crofa domestica)* a criszta terminalis fölött helyezkedik el a vena superior falában. Más emlősöknél a fő tömege a sulcus terminalisban van (KEITH és FLACK 1907, COPENHAVER és TRUEX 1952, TRUEX 1961, LEV 1964).

A színuszcsomó a mocsári teknős szívében, mint a madaraknál és az emlősöknél, a vena cava superior beömlésénél helyezkedik el a jobb pitvari falazatban. Pontos helyét és alakját nem tudtuk megállapítani, mert csak elektronmikroszkóppal sikerült megtalálnunk és az így kapott szerkezet nem enged lehetőséget arra, hogy ennek alapján a fenti kérdésre választ tudjunk adni. Egy azonban bizonyosnak látszik és ez az, hogy a hely, ahol megtaláltuk, az a vena cava superior töve. Természetesen arról lehet szó, hogy átnyúlik egészen a vena cava inferior faláig. Erre egyebeken kívül azért is gondolunk, mert itt fénymikroszkóp alatt olyan szinapszisokkal megrakott idegsejtsorokat találtunk, mint amilyenek a vena cava superior tövében vannak, amelyekről később részletesen meg fogunk emlékezni. Az azonban tény, hogy a szövetdarab, amit láttunk és az alábbiakban ismertetni fogunk, az a színuszcsomó, amelyről eddig nem esett szó a világirodalomban. Hogy ez így van, azt bizonyítja az a tény, hogy a talált és az alábbiakban leírásra kerülő pacemaker sejtek (vezérlő sejtek) nemcsak elütnek a miokardium munkaizomsejtjeitől, hanem nagyon hasonlítanak az emlősök pacemaker sejtjeihez. Hogy a munkaizomsejtek és a pacemaker sejtek közötti, szerkezetbeli különbözőség annál jobban szembetűnjék, az alábbiakban előbb ismertetjük a színusz tájéki munkaizomsejteknek a szerkezetét, azután a pacemaker sejtekkel majd a színuszcsomóval kapcsolatos idegrendszer szerkezetével és kapcsolódási formáival foglalkozunk.

Munkaizomsejtek

Munkaizomsejteknek a szív mozgásait végző izomsejteket nevezzük. Ezek mind két végük felé elkeskenyedő, nagyjából négyszögletes testek. Alkotó részeik kívülről befelé haladva a szarkolemma, a szarkoplazma, a miofibrillum és a sejtmag. A szarkolemma elektronmikroszkóp alatt élesen szembetűnő hártya, amelynek lefutásába rövidebb, hosszabb darabon dezmoszóma darabok vannak beiktatva. Befelé pinocitotikus vezikulumok határolják. Az egymással találkozó szarkolemma lemezek a hozzájuk társuló dezmoszóma darabokkal alkotják a közbeiktatott korongokat (discus intercalaris). Az utóbbiak az elektronmikroszkópi vizsgálatok szerint valóságos sejthatárok. Valójában specializált junkciók a miokardium sejtes elemei között.

A szarkolemma alatt helyezkedik el a szubszarkolemmális szarkoplazma. Mennyiségileg erősen háttérbe szorul az interfibrilláris szarkoplazma mögött, amely az izomsejt plazmájának a harmadát, néha a felét is kiteszi. Az interfibrillaris szarkoplazmában helyenként glikogén granulumok vannak.

Az interfibrillaris szarkoplazmában egyes helyeken sok a mitokondrium. Rendesen a mag közelében csoportosulnak, de máshol is tömegesen jelentkeznek főleg ott, ahol nem nagy a granulum felhalmozódása. A mitokondriumok a crisztás típusba tartoznak. A páros criszták élesen és tisztán jelennek meg a kapott képeken. Az olyan képek sem ritkák, amelyek amellett szólnak, hogy a mitokondriumok osztódással szaporodnak. A befűződés lehet a test közepén, lehet közel a középhez, és lehet a végrészen. Nem ritkák az elágazó formák. Az ágak a végeken bunkószerűleg megvastagodnak. A criszták közötti terek sorba rendeződő finom szemcsékkel vannak tele. Keresztmetszeti képek arról tanúskodnak, hogy a cristák valójában csövek, amelyeken jól látszik a keskeny lumen és a vastag homogén falazat.

A miofibrillumok az izomsejtekben hosszában futó fonálszerű képződmények. Fő alkotó részeik a bennük ugyancsak hosszában futó és párhuzamos helyzetű miofilamentumok. A miofibrillumokon élesen tűnik szembe a harántcsikolat. Ebben jól látható a világos „I" csík és a sötét „A" csík. A világos csíkban tömör, éles hártya formájában látszik a köztes csík a „Z" vonal, és ennek két oldalán a mellék csík az „N" vonal. A sötét csíkban hiányzik a középkorong a „H", amely a magasabb rendűek szívizomsejtjeiben halvány csík formájában látható.

A színuszcsomó tájékán főleg annak közvetlen közelében gyakoriak a nyúlványos miofibrillumok. Ezeknek mind a két oldalából testük egész hosszában a tengelyre merőlegesen egymást elég sűrűn követő nyúlványok lépnek ki, amelyek végükön lekerekednek. A nyúlványokat jellemzi a nagy mennyiségű szarkoplazma, amely különösen a végeken nagy tömegben látható. Az is előfordul, hogy a nyúlványok a fibrillumnak csak az egyik oldalán jelennek meg.

A sejtmag centrális fekvésű és tojás alakú. Előfordulnak megnyúlt, hajlott magvak és olyanok is, amelyek az egyik végükön kihegyesednek, és akadnak olyanok is, amelyeken kisebb-nagyobb kidudorodások vannak. A maghártya élesen körvonalazott, a magpórusok nem mindig tűnnek elő. A magvacska tömör, elektron denze test. Néha kisebb-nagyobb felcsavarodó fonál alakjában jelentkezik (1. ábra).

Pacemaker sejtek

A pacemaker sejtek semmiféle más szövetben nem található sajátságos testek, a színuszcsomó ingertermelő sejtjei. Nagyban különböznek a munkaizomsejtektől. Szerkezetüket attól kezdve ismerjük, amióta az elektronmik-

roszkópos vizsgálatok a szívre vonatkozólag is megindultak. A legkülönbözőbb emlős fajokon végzett elektronmikroszkópos vizsgálatok amellett szólnak, hogy az emlősök pacemaker sejtjei orsó alakú testek. Átmérőjük 4—6 millimikron, végük kanyarulatos és ágakba megy át. Szorosan záródnak egymáshoz. A miofibrillumok elágaznak. Több bennük a szarkoplazma, mint a munkaizomsejtekben. A szarkoplazmatikus retikulum csökevényes. A mitokondriumok kisebb területet foglalnak el, mint a miofibrillumok. Köztes korongok (discus intercalaris) nincsenek. A patkányon (VIRÁGH és PORTE 1961), a nyúlon (TORII 1962, TRAUTWEIN és UCHIZONÓ 1963, CHALLICE 1966), a kutyán (KAWAMURA 1961b, JAMES és társai 1966) és a szarvasmarhán (HAYASHI 1962) végzett vizsgálatok azt bizonyítják, hogy különböző emlős fajok színuszcsomójának a sejtjei nagyban hasonlítanak egymáshoz.

A pacemaker sejtek igazi ultrastruktúráját TRAUTWEIN és UCHIZONO (1963) írta le a házi nyúl *(Lepus cuniculus)* szívéből. Az ő vizsgálataik azért jelentettek újdonságot és azt is mondhatnók, hogy bizonyosságot a pacemaker sejtek szerkezetét és működését illetőleg, mert ők intracellularis elektródokkal lokalizálták ezeket a sejteket, és mellőzve az álpacemaker, a kisteljesítő képességű sejteket, csak a bizonyítottan ingerképző sejteket készítették elő elektronmikroszkópos vizsgálatokra.

A mocsári teknős pacemaker sejtjei szabálytalan testek. Sok a különböző vastagságú, irányú és hosszúságú nyúlványuk. A sejtek és a nyúlványok annyira összefonódnak, hogy a legélesebb felvételeken is alig lehet az összefüggésekről pontos tájékozódást szerezni. A nyúlványok rendesen széles alappal erednek, a sejttesttől messzire futnak és a végükön rendesen lekerekednek. Sok rajtuk a kisebb, nagyobb dudor és a messzire futó vékony, kanyargós ágak sem tartoznak a ritkaságok közé. Az alaphártya (membrana basalis), amely a sejtcsoportokat határolja, halvány és szorosan záródik a szarkolemmához. A szomszédos sejtek közel vannak egymáshoz. A két sejtmembránt nagyon keskeny hasadék választja el egymástól. Azonban főleg a messzire kanyargó nyúlványok között aránylagosan széles és átmérőjét alig változtatja a sejt közötti hézag. Ritkábban ugyan, de előfordul, hogy az átmérő mindenféle átmeneti forma nélkül a minimumra redukálódik. De arra is van eset, hogy az erősen leszűkült szakasz rövid darabon kiszélesedik. A szarkolemma belső felületén egyenletes dezmoszóma sorok húzódnak végig. Discus intercalaris abban a formában, ahogy ezt a munkaizmoknál látjuk, a pacemaker sejtekben nem fordul elő (2. ábra).

A szarkoplazma világos. Nincs benne sem granulum, sem glikogén szemecske. A miofibrillák kisebb-nagyobb darabokban jelentkeznek. Ezekben látszanak a párhuzamos helyzetű miofilamentumok. De vannak helyek, ahol a miofilamentumok szabálytalan fonadékokat alkotnak, amelyekben az egyes filamentumok helyzete és formája nehezen orientálható. A mitokondriumok a crisztás típusba tartoznak. Vannak köztük kisebbek, kerekdedek, nagyobbak

és hosszúkásak. Ritkán olyan hosszú formákat is lehet látni, amelyek két-két hosszúkás alaknak az együttes hosszát is felülmúlják (3. ábra).

Szinte minden felvételen sok a kerekded pinocitotikus vezikulum. Egyesek közvetlenül a szarkolemma alatt helyezkednek el, ezzel párhuzamosan. A nagy tömegek centrálisan a szarkoplazmában vannak felhalmozva, mind a sejttestekben, mind a nyúlványokban. A vezikulumok között olyanok is vannak, amelyek valósággal rátapadnak a szarkolemmára, ami amellett szól, hogy tartalmukat a sejt közötti hézagba öntik. A kerek és tiszta vezikulumok között kis számmal ugyan, de akadnak nagyobb ovális formák, amelyek szintén a szarkolemma közelében helyezkednek el. Ritkák azok a vezikulumok, amelyek a sejteknek, illetőleg a nyúlványoknak a központi részén kisebb-nagyobb csoportokat alkotnak. Mivel ezek a formák kissé megnyúltak és mindkét végükön némileg kihegyezettek, valószínű, hogy az endoplazmatikus retikulum vezikulumai. Amikor ezt mondjuk, meg kell jegyeznünk, hogy mi a szívizomzatban endoplazmatikus, illetőleg szarkoplazmatikus retikulumot a szokásos formában eddig sem a munkaizomsejtekben, sem a vezérlő sejtekben nem találtunk. De az is lehetséges, hogy azok a vezikulumok sem szarkoplazmatikus vezikulumok, amelyeket TRAUTWEIN és UCHIZONO írt le, hanem a mieinkkel együtt a pinocitotikus vezikulumok közé tartoznak (4. ábra).

A sejtmag alakja és nagysága változó. Általában sok a kerekded vagy kissé megnyúlt forma, de olyanok is akadnak, amelyek az egyik végükön tompa hegybe futnak ki. A maghártyák néha hosszabb darabon élesen tűnnek elő, máskor azonban egyik sem látható. Olykor a két maghártya közötti teret is látjuk, amely néha egyik részén nagyon szűk, a másikon viszont szakaszonként erősen kitágul. A kromatin hol aprón szemecskézett, hol a szemcsék között kisebb-nagyobb tömör darabok vannak. Az sem tartozik a ritkaságok közé, hogy hosszabb, rövidebb, keskenyebb és szélesebb, tömött darabok sorakoznak fel a maghártya mentén (5. ábra).

A jellegzetességek, amelyek a munkaizomsejtektől eltérő eredetre és funkcióra utalnak a következőkben foglalhatók össze: 1. a sejtalak szabálytalan, a sejtből számos nyúlvány indul ki. 2. a nyúlványok terjedelmesek, a sejttesttől messzire futnak. A forma és a méret ugyanazon nyúlványon is messzemenő különbségeket mutat. 3. a citoplazma világos, tele van pinocitotikus vezikulumokkal. 4. glikogén nincs, sem a sejtek központi részében sem a nyúlványokban. 5. a miofibrillumok vékonyak. 6. harántcsikolat nem látható. 7. discus intercalaris nincs. 8. nincsen szarkoplazmatikus retikulum. 9. a mag esetenként bevágott vagy kihegyesedett. 10. a pacemaker sejtek között sem idegsejt, sem idegrost nem fordul elő.

Mindaz, amit a fentiekben elmondottunk amellett szól, hogy a teknős szívéből leírt pacemaker sejtek messzemenőleg különböznek a munkaizomsejtektől, és ha meg nem egyeznek, akkor nagyon hasonlítanak az emlősök szívéből leírt hasonló nevű sejtekhez. Ha ezekhez még hozzátesszük, az élő

világnak egyik alaptörvényét, melynek értelmében a természet egyazon funkciónak az elvégzéséhez mindenütt és mindig ugyanazokat a formákat és struktúrákat használja, akkor teljes bizonyossággal állíthatjuk, hogy a fent leírt szövetdarab a teknős szívéből eddig nem ismert színuszcsomó, a szív elsődleges ingertermelő központja.

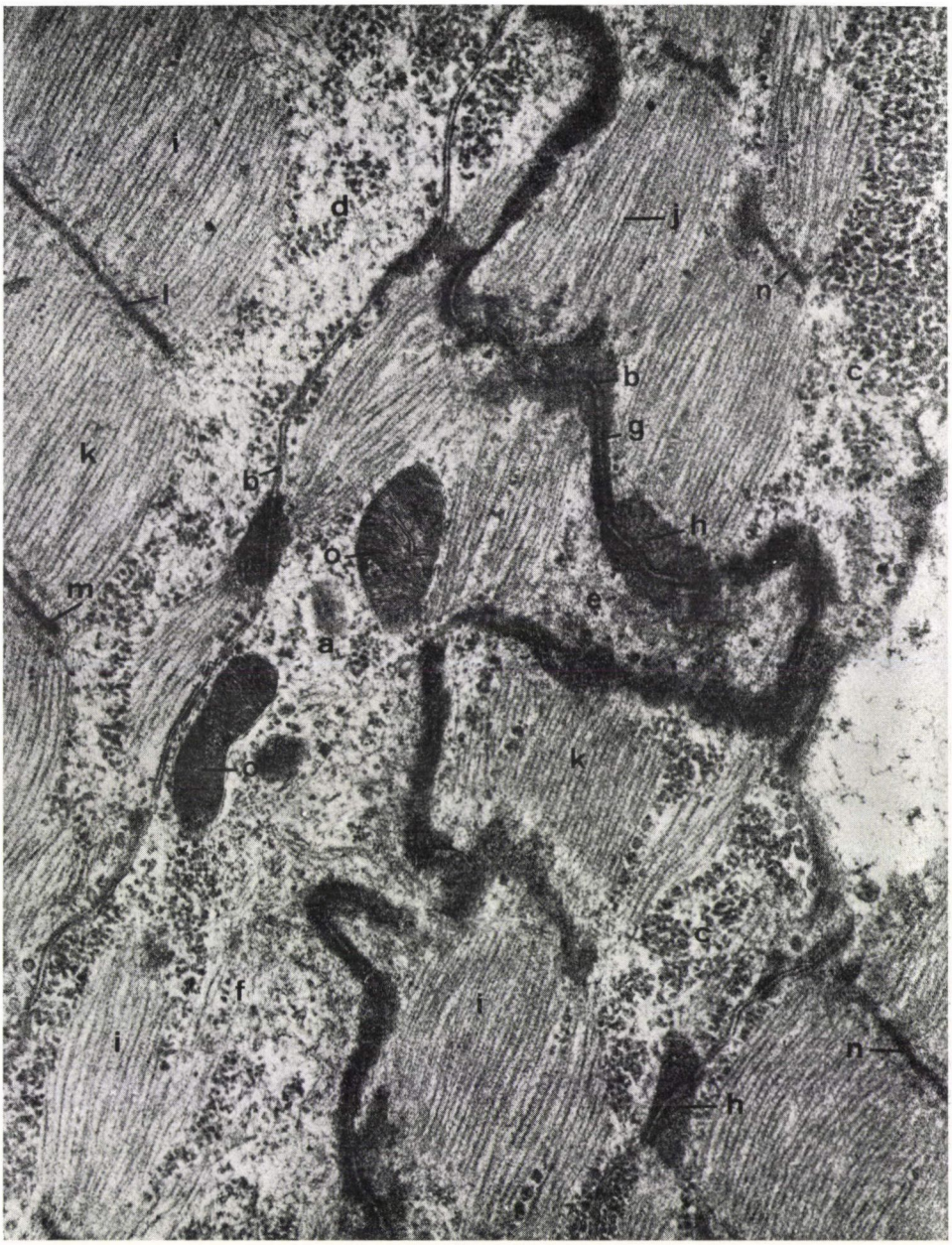
Idegrendszer

A különböző eljárásokkal végzett hisztokémiai vizsgálatok alapján (Anglakos és társai 1963, Norberg és Hamberger 1964, Dahlström és társai 1965, Nielsen és Owman 1968, Ehinger és társai 1968b, Otsuka 1972) megállapítást nyert, hogy az emlősök szívének a színuszcsomója adrenerg excitatorikus idegrostokban különlegesen gazdag. Az is kiderült (James és Spence 1966, Ehinger és társai 1968b, Bojsen-Moller—Tranum-Jensen 1971a), hogy a színuszcsomó inhibitor, kolinerg rostokkal is bőven el van látva. Nielsen és Owman (1968), azt is megállapította, hogy az adrenerg beidegzés, mind a nem télialvókban, mind a télialvókban (borz, denevér, sündisznó és mókus) olyan gazdag, hogy a patkány szívében látszat szerint a nodalis sejtek mindegyike kap legalább egy varicosus axonterminalist „each of the constituent nodal cels seems to receive at least one varicose terminal". Kétségtelen, hogy ez az állítás túl merésznek látszik, de ha az ember látja, azt a mikroszkópi készítményt, amelyet a teknős szíve kamrájának a gyűrű területére eső részéből ezüsttel impregnáltunk, akkor felhagy a kételkedéssel. Ugyanis ezen a készítményen olyan tömegben jelennek meg az idegrostvégződések, amilyenről álmodni sem mertünk, annak ellenére, hogy az alatt a hatvan esztendő alatt, amelyet az állatvilág és az ember idegrendszerének a kutatásával töltöttünk el, sok olyan idegkészítményt láttunk, amelyek ha nem érték el, akkor nagyban megközelítették a tökéletesség határát. Hogy ennek a készítménynek nem sikerült rálépni arra az útra, amelyet tökéletes mértékben megérdemel, annak az az oka, hogy mindeddig nem tudtunk róla olyan mikrofelvételt készíteni, amely az óriási tömegű idegvégződést pontosan igazolni tudná. Ennek az az oka, hogy a tökéletes idegszövettani képek, amelyeken az összefüggések is láthatók, csak vastag metszeteken szoktak megjelenni. Ezeket pedig úgy lefényképezni, hogy az idegvégződések teljes egészükben és egységesen láthatók legyenek, a sokszoros próbálkozás ellenére, mind ez ideig nem sikerült, de reményem sincs arra, hogy valaha valakinek sikerülni fog. Maradnak a rajzok, és részfelvételek, de mivel más lehetőség nincs, mások meggyőzésére ezeket használjuk. Ha az elmondottakhoz még valamit hozzá akarunk tenni, akkor azt is meg kell mondanunk, hogy a vena cava superior tövéből készült metszeteken is olyan tömegben impregnáltuk az idegrostokat, hogy a Nielsen és Owman (1968)-féle tézist a teknős miokardiumának a munkaizomsejtjeire

vonatkozólag még akkor érvényesnek tartottuk, amikor erről még semmit sem tudtunk.

A színus-csomó ultrastrukturális beidegzését elsőnek VIRÁGH és PORTE tanulmányozta (1961). Ők a patkány szívében nem találtak gazdagabb autonom beidegzést, mint a pitvari miokardiumban. Megfigyelésük szerint az axon terminalisok 0,1 millimikron távolságra végződnek a sejt felületétől. Ezzel szemben CHENG (1971) ugyancsak a patkányból eredő színuszcsomónak a vizsgálata során több varicosus duzzanattal ellátott axont látott körülvéve a nodalis szövettel. Emellett azt is észlelte, hogy az axonvaricositás alapján két axontípust lehet megkülönböztetni. Az egyikben apró granularis vezikulumok vannak, a másikban az apró granularis vezikulumok nagy vezikulumokkal vannak keverve. CHENGnek ez a lelete evidenssé tette, hogy a patkány sinoatrialis csomója adrenerg és kolinerg rostokat tartalmaz és így kettős beidegzés alatt áll. CHENG szerint az axonterminalisok nagyobb része több, mint 0,1 millimikronos távolságra van a nodussejt felszínétől, de a vezikulum tartalmú csupasz axonok kontaktusban vannak az effektorokkal. A kutyán (KAWAMURA 1966, HAYASHI és társai 1970, HAYASHI 1971) a nyúlon (TORII 1962, TRAUTWEIN és UCHIZONO 1963, NILSSON és SPORRONG 1970) és az egéren (MARKAWA és HAYASHI 1966 és JAMES 1967) bőven találtak velőhüvely nélküli axonterminalisokat, részben Schwann-féle hártya nélkül. Mi a mocsári teknős szívében a színuszcsomó epikardiális rétegében fénymikroszkóp alatt azonos vastagságú rostokból álló laza idegnyaláb fonadékot találtunk, amelynek lefutásába terjedelmes idegsejtek vannak beiktatva. A nyalábokból minden idegsejthez egy jól kivehető idegrost lép, amely a sejt közvetlen közelébe érve a sejt felületén tova kanyarog, esetenként ágakra oszlik. Az ágak a sejthártyán gazdag és formájában változatos fonadékot alkotnak, amelynek végrostjai lapátszerűleg kiszélesedve kapcsolódnak hozzá a sejtfelülethez. A végkapcsolódásnak ezen leggyakoribb, sejtenként kisebb-nagyobb, de lényegbevágó eltéréseket mutató formája mellett, nem tartozik a ritkaságok közé az az eset sem, amikor a sejthez érkező rost mindjárt a sejttel való találkozási helyen kerek korong formájában kapcsolódik a sejthártyához (6. ábra).

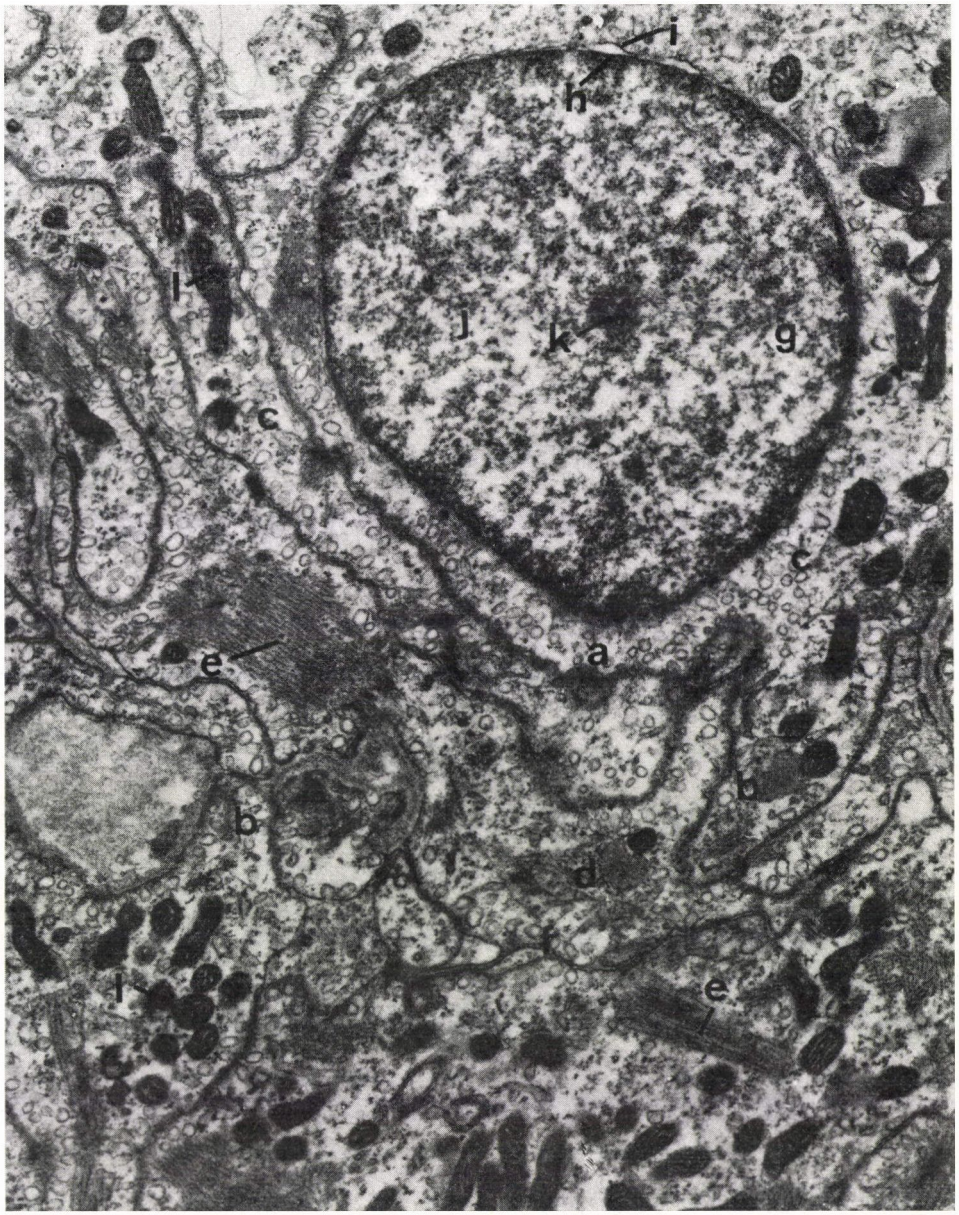
A kerek sejteket elektronmikroszkóp alatt is megtaláltuk. Alakjuk változó. Általában hosszúkás, két végükön lekerekített testek. Sok jel mutat arra, hogy az unipolaris csoportba tartoznak. Citoplazmájuk szemecskézett. Sok benne a mitokondrium. Ezek egy része kicsi és kerekded. A nagyobb rész vékony és hosszúkás, legtöbb az erősen megnyúlt alak. A Golgi komplexumban jól szembetűnők a megnyúlt csövek és a kerek vezikulumok. Az utóbbiak egyes helyeken az előbbiektől elszakadva csoportokba rendeződnek. A citoplazmában ritkán ugyan, de multivezikuláris testek is akadnak. A sejtmag kerekded, kissé hosszúkás. A maghártyák egységes képet mutatnak. A kromatin apró és egységesen szemecskézett (7. ábra).



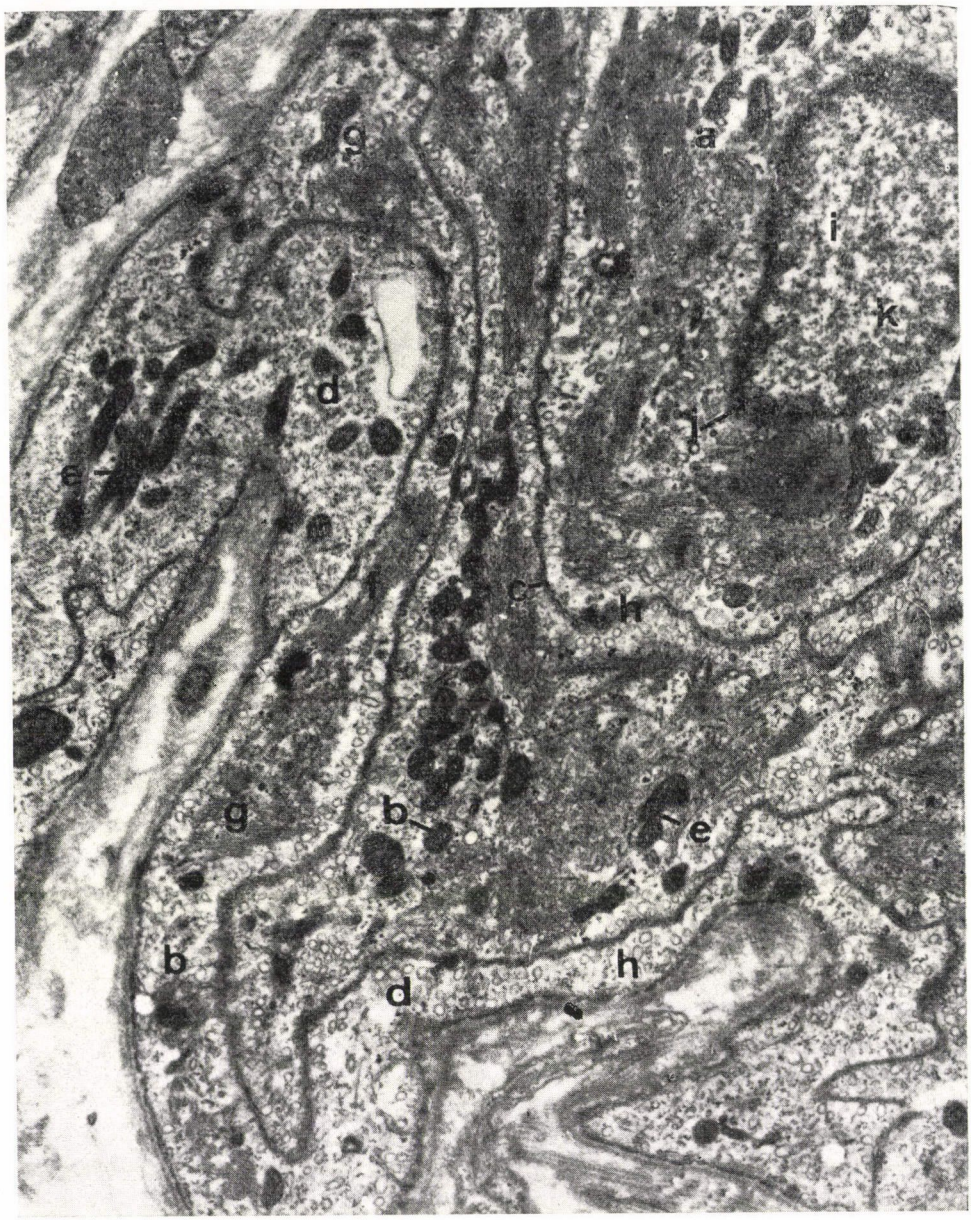
1. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Pitvar. Miokardium. a — izomsejt; b — szarkolemma; c — szarkoplazma; d — szubszarkolemmális szarkoplazma; e — interfibrillaris szarkoplazma; f — granulum; g — köztes korong; h — dezmoszoma; i — mikrofibrillum; j — miofilamentum; k — „A" csík; l — „I" csík; m — „Z" vonal; n — „N" vonal; o — mitokondrium. Nagyítás: 25 500×



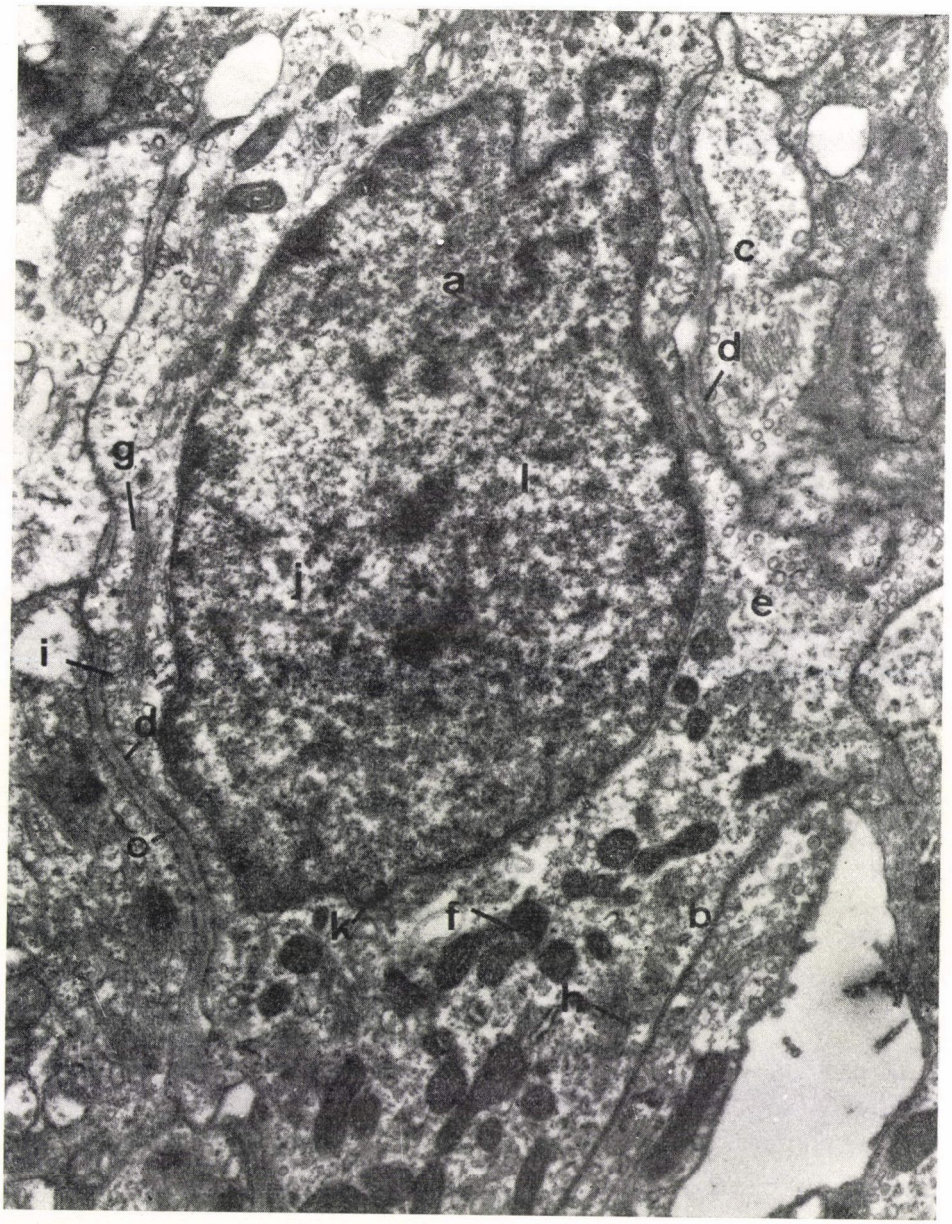
2. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. a — pacemaker sejt; b — sejthártya; c — citoplazma; d — sejtnyúlvány; e — mitokondrium; f — sejtközötti hézag; g — dezmoszoma; h — miofibrillum; i — miofilamentum; j — sejtmag; k — maghártya; l — kromatin. Nagyítás: 8800×



3. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. a — a — pacemaker sejt; b — sejtnyúlvány; c — citoplazma; d — miofibrillum; e — miofilamentum; f — pinocitotikus vezikulum; g — sejtmag; h — belső maghártya; i — külső maghártya; j — kromatin; k — magvacska; l — mitokondrium. Nagyítás: 17 600



4. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. a — pacemaker sejt; b — sejtnyúlvány; c — sejtmaghártya; d — citoplazma; e — mitokondrium; f — miofibrillum; g — miofilamentum; h — pinocitotikus vezikulum; i — sejtmag; j — maghártya; k — kromatin. Nagyítás: 13 200×



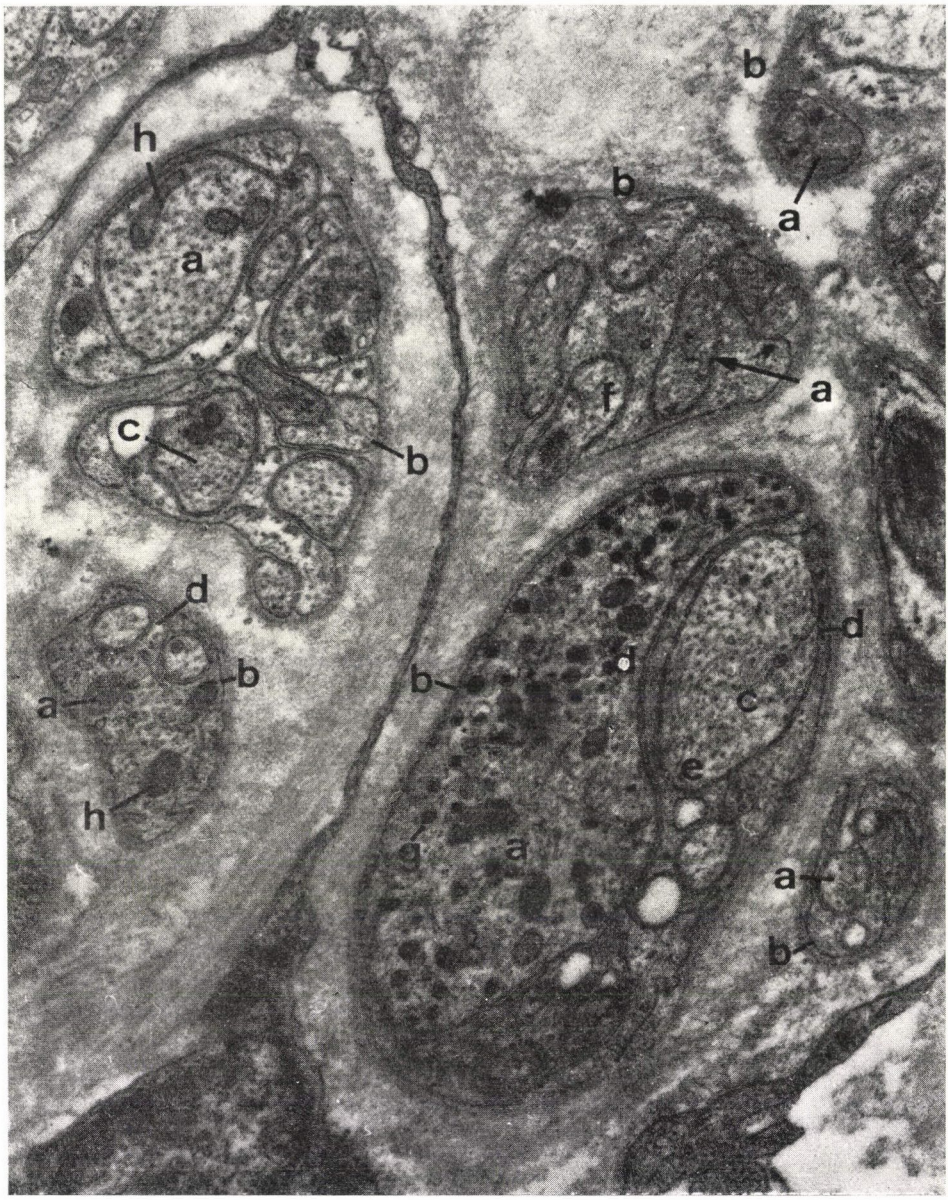
5. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve.
a — pacemaker sejt; b — sejthártya; c — sejt közötti hézag; d — dezmoszoma; e — citoplazma;
f — mitokondrium; g — miofibrillum; h — miofilamentum; i — pinocitotikus vezikulum;
j — sejtmag- k — maghártya; l — kromatin. Nagyítás: 17 600×



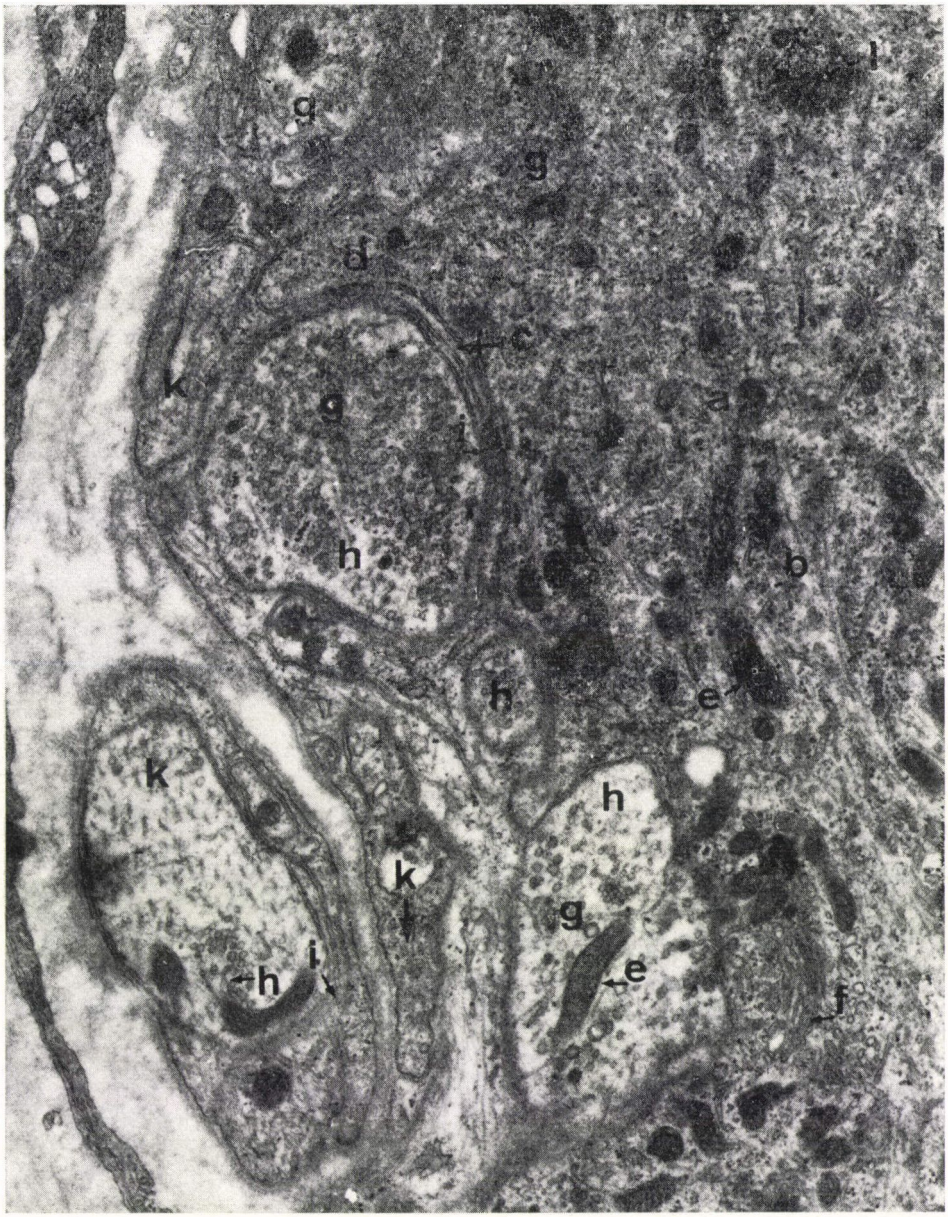
6. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. Idegrostnyaláb-fonadék. a — idegrostnyaláb; b — idegrost; c — idegsejt; d — sejtmag; e — szinapszis. BIELSOWSKY—ÁBBAHÁM. Nagyítás: 600×.



7. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. a — idegsejt; b — sejthártya; c — citoplazma; d — mitokondrium; e — sejtmag; f — maghártya; g — kromatin. Nagyítás: 13 200×



8. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. a — Schwann-féle sejt; b — sejthártya; c — axonkeresztmetszet; d — axolemma; e — axoplazma; f — neuronfilamentum; g — dense core veziculum; h — mitokondrium. Nagyítás: 22 000×



9. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. a — idegsejt; b — citoplazma; c — sejthártya; d — sejtnyúlvány; e — mitokondrium; f — Golgi komplexum; g — axonterminalis; h — vezikulum; i — axolemma; j — endoplazmatikus retikulum; k — neurofilamentum; l — lipidtest. Nagyítás: 22 000×



10. ábra. Mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szív. Jobb pitvar. A felső üres véna töve. a — idegsejt; b — sejtnyúlvány; c — mitokondrium; d — lipidtest; e — szinaptikus vezikulum; f — dense core vezikulum; g — cluster; h — preszinaptikus membrán; i — interszinaptikus tér; j — posztszinaptikus membrán; k — axonterminális; l — axolemma. Nagyítás: 30 600×

Az idegsejtek környékén nagyon sok a Schwann-féle sejt és ezekben a különböző helyzetű és vastagságú csupasz tengelyfonál. A sejtek hasonlítanak az emlősök Schwann-féle sejtjeihez, de mind külső formában, mind a belső szerkezetben aránylagosan sok eltérést mutatnak. Az axonok itt is be vannak ágyazva a citoplazmába, de a mesaxon formálódás és az axondaraboknak a sejtmembránjával való kapcsolata erősen eltér attól a szerkezettől, amellyel az emlősök Schwann-féle sejtjeiben találkozunk. A sejtformában és a különleges szerveződésben mutatkozik a származástan, amely azt mutatja, hogy itt lényegesen ősibb sejtformáról van szó, mint az emlősöknél (8. ábra).

Az idegsejtek környezetében sok a vezikulum tartalmú csupasz, tengelyfonál, amelyek igen szoros kapcsolatban állnak a sejtekkel. Az axondarabok, amelyek formában, helyzetben és tartalomban figyelemre méltó különbségeket mutatnak, szinte pontosan megfelelnek azoknak az idegrostdaraboknak és végeknek, amelyeket fénymikroszkóposan bemutattunk. Mivel a különböző axondarabokon, amelyek közül egyesek azt a látszatot mutatják, mintha benne volnának az idegsejt citoplazmájában, az axolemmán és a szinaptikus vezikulumokon kívül nincsen más szinaptikus bélyeg, ezek nem tekinthetők típusos szinapszisoknak. Azonban egy bizonyosnak látszik és ez az, hogy a sejt és az idegrostok között rendkívül intim és gazdag a kapcsolat (9. ábra).

A körvonalazott idegrendszerben legérdekesebbek a szinapszisok, amelyek tökéletesen megegyeznek azokkal a formákkal, amelyek a legmagasabb rendűek központi idegrendszerének a kapcsoló rendszerét alkotják. Nevezetesen a helyzet az, hogy a sejthártyához, ahogy ez a következő képen látható, egy axonterminalis érkezik, amely egész hosszában tele van vezikulumokkal. Ezeknek legnagyobb része szinaptikus vezikulum, a kisebb dense core vesiculum. Az utóbbiak nagyságban erősen variálnak. Az axonterminalis végén közvetlenül az axolemma mellett látszik a szinaptikus vezikulum felhalmozódás, a szokásos cluster. Látszik a preszinaptikus membránvastagodás, a szinaptikus tér, és utána a posztszinaptikus membránvastagodás. De van ezen a szinapszis formán még valami, ami esetleg gondolkodóba ejtheti az embert, nevezetesen az, hogy ez tulajdonképpen egy kettős axoszomatikus szinapszis. Az egyik az axonterminalis végén van, a másik, amelyen a szinaptikus bélyegek szintén láthatók az axonvégnek az oldalán, illetőleg a szélén helyezkedik el, közel az axonvéghez (10. ábra). Mi ebben a szinapszisban, amelyben a preszinaptikus axon a bolygó idegből (nervus vagus) ered és a posztszinaptikus idegsejt az intrakardialis idegrendszerhez tartozik, az extrakardialis és intrakardialis idegrendszernek a kapcsolatát látjuk. Mivel pedig a vagus a szívnek a gátló idege, természetes, hogy ez a szinapszis a központi idegrendszerből gátló impulzusokat szállít a színuszcsomóba. Ezek ismeretében válik érthetővé az, hogy a központi eredetű ingerek mért jutnak el olyan gyorsan a színuszcsomóba és a gátlások mért jelentkeznek olyan nagy hirtelenséggel a szívmozgások rendszerében. De ha meggondoljuk azt, hogy az extrakardialis

rendszerhez tartozó szimpatikus eredetű idegágak a vagus ágak mellett, illetőleg ezek mentén haladnak, az is magyarázatot kap, hogy a serkentő (excitatorikus) impulzusok miért tevődnek át olyan hirtelen gyorsasággal az elsődleges ingertermelő sejtekre. Végeredményben pedig magyarázatát kapja az is, hogy a túl érzékeny ember szíve egyetlen szó, akár egyetlen gondolat hatására miért kerül olyan gyorsan a gátló vagy serkentő ingerek hatása alá. Az extrakardiális és intrakardiális idegrendszer kapcsolódásának fenti formája azt is mutatja, hogy a gátló szinapszisokban nincsenek ovoid szinaptikus vezikulumok úgy, ahogy ezt UCHIZONO közölte. Az ingerátvitel eszközei itt is, mint a serkentő szinapszisokban, a kerek vezikulumok.

Összefoglalás

A mocsári teknős szívének a jobb pitvari falában, ott ahol a felső üres véna (vena cava superior) a szívüregbe szakad, elektronmikroszkóppal egy sajátságos falrészletet találtunk. Pontos helyét nem tudjuk megjelölni, mert az elektronmikroszkópos képek erre nem adnak lehetőséget. Azt azonban megállapítottuk, hogy a talált szövet, sejtjeinek alakjában és szerkezetében nagyban eltér azoktól az izomsejtektől, amelyek a szívfali mozgásokat eszközlik, de messzemenő hasonlóságot mutat az emlősök elsődleges ingertermelő központjával, a színuszcsomóval. A talált sejteknek és az emlősök színuszcsomójának a tüzetes áttanulmányozása alapján megállapítottuk, hogy a talált sejtcsoport a környező idegsejtekkel és idegrostokkal együtt a színuszcsomó, amely a teknősnek és általában az alsóbb rendű gerinceseknek a hüllőknek, a kétéltűeknek és a halaknak a szívéből eddig ismeretlen volt.

IRODALOM

1. ÁBRAHÁM, A.: Die mikroskopische Innervation des Herzens und der Blutgefässe von Vertebraten. Akadémiai Kiadó, Budapest (1964).
2. ÁBRAHÁM, A.: The structure of the synapses in the heart of the European pond turtle (Emys orbicularis). Symp. Biol. Hung. **5**, 69—83 (1965).
3. ÁBRAHÁM, A.: Electron microscopic investigations on the heart of the European pond turtle (Emys orbicularis) Ind. J. Zool. Vol. **3**, No. 1—11 (1975).
4. ASCHOFF, L.: Über den Glykogengehalt des Reizleitungssystems des Säugetierherzens. Zentralbl. Pathol. 19, 410—422. (Nach Untersuchungen von Herrn Nagayo.) (1908).
5. ANGELAKOS, E. T., FUXE, L. and TORHUIANA, M. L.: Chemical and histochemical evaluation of the distribution of catecholamines in the rabbit and guinea pig hearts. Acta. Physiol. Scand. **59**, 184—192 (1963).
6. BOJSEN-MOLLER, F. and TRANUM-JENSEN, J.: Whole-mount demonstration of cholinesterase-containing nerves in the right wall, nodal tissue, and atrioventicular bundle of the pig heart. J. Anat. **108**, 375—386 (1971a).
7. CAESAR, R., EDWARDS, G. A. and RUSKA, H.: Electron microscopy of the impulse conducting system of the sheep heart. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **48**, 698—719 (1958).
8. CHALLICE, C. E.: Studies on the microstructure of the heart. I. The sino-atrial node and the sino-atrial ring bundle. J. Roy. Microsc. Soc. **85**, 1—21 (1966).

9. CHALLICE, C. E.: Functional morphology of the specialized tissues of the hearth. In „Methods and Achievements in Experimental Pathology" (E. Bajusz and G. Jasmin, eds.), Vol. 5, pp. 121—172. Karger, Basel (1971).
10. CHALLICE, C. E. and VIRÁGH, S.: Ultrastructure of the Mammalian Heart. Academic Press. pp. 1—191. New York and London (1973).
11. CHENG, Y. P.: The ultrastructure of the rat sino-atrial node. Acta Anat. Nippon. **46,** 339—358 (1971).
12. COPENHAVER, W. M. and TRUEX, R. C.: Histology of the atrial portion of the cardiac conduction system in man and other mammals. Anat. Rec. **114,** 601—625 (1952).
13. DAHLSTRÖM, A., FUXE, K., MYA-TU, M. and ZETTERSTRÖM, B. E. M.: Observations on adrenergic innervation of dog heart. Amer. J. Physiol. **209,** 689—692 (1965).
14. DAVIES, F. and FRANCIS, E. T. B.: The conducting system of the vertebrate heart. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. **21,** 173—188 (1946).
15. DAVIES, F. and FRANCIS, E. T. B.: The conducting of the impulse for cardiac contraction. J. Anat. **86,** 302—309 (1952).
16. DENOIT, F. and VASSOR, G.: Étude de l'ultrastructure des fibres sino-auriculaires de grenouille. In „Microscopie Electronique, (P. Favard, ed.), Vol. III. pp. 797—798. Société Francaise de Microscopie Elektronique, Paris (1970).
17. EHINGER, B., FALCK, B., PERSSON, H. and SPORRONG, B.: Adrenergic and cholinesterase-containing neurons of the heart. Histochemie **16,** 197—205 (1968b).
18. FAWCETT, D. W. and C. C. SELBY: Observations on the fine structure of the turtle atrium. J. biophys. biochem. Cytol. **4,** 63—71 (1958).
19. GLOMSET, D. J. and GLOMSET, A. T. A.: A morphological study of the cardiac conducting system in ungulates, dog, and man. Part I. The S-A node. Amer. Heart J. **20,** 389—398 (1940).
20. HADEK, R. and TALSO, P. J.: A study of nonmyelinated nerves in the rat and rabbit heart. J. Ultrastruct. Res. **17,** 257—265 (1967).
21. HAYASHI, K.: An electron microscope study on the conduction system of the cow heart. Jap. Circ. J. **26,** 765—842 (1962).
22. HAYASHY, S.: Electron microscopy of the heart conduction system of the dog. Arch. Histol. Japon **33,** 67—86 (1971).
23. HUTTER, O. F. and TRAUTWEIN, W.: Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart. J. Gen. Physiol. **39,** 715—733 (1956).
24. JAMES, T. N.: The connecting pathways between the sinus node and A-V node and between the right and left atrium in the human heart. Amer. Heart J. **66,** 498—508 (1963).
25. JAMES, T. and SPENCE, C. A.: Distribution of cholinesterase within the sinus node and A-V node of the human heart. Anat. Rec. **155,** 151—161 (1966).
26. JAMES, T. N., SHERF, L., FINE, G. and MORALES, A. R.: Comparative ultrastructure of the sinus node in man and dog. Circulation **34,** 139—163 (1966).
27. KAWAMURA, K.: Electron microscope studies on the cardiac conduction system of the dog. I. The Purkinje fibers. Jap. Circ. J. **25,** 594—616 (1961a).
28. KAWAMURA, K.: Electron microscope studies on the cardiac conduction system of the dog. II. The sinoatrial and atrioventricular nodes. Jap. Circ. J. **25,** 973—1013 (1961b).
29. KAWAMURA, K. and HAYASHI, K.: Electron microscope study of the cardiac conducting system. Jap. Circ. J. **30,** 149—151 (1966).
30. KEITH, A. and FLACK, M.: The form and nature of the muscular connections between the primary divisions of the vertebrate heart. J. Anat. Physiol. (London) **41,** 172—189 (1907).
31. KING, T. S. and J. B. COAKLEY: The intrinsic nerve cells of the cardiac atria of mammals and man. J. Anat. (Lond.) **92,** 353—376 (1958).
32. KISCH, B.: New investigations on cardiac nerves. An electron microscopic study. Exp. Med. Surg. **16,** 81—95 (1958a).
33. KISCH, B.: The mechanism of pain in angina pectoris. An electron microscopic clue. Exp. Med. Surg. **16,** 96—98 (1958b).
34. LEV, M.: The normal anatomy of the conduction system in man and its pathology in atrioventricular block. Ann. N. Y. Acad. Sci. **111,** 817—829 (1964).
35. MUIR, A. R.: The sino-atrial node of the rat heart. Quart. J. Exp. Phys. **40,** 378—386 (1955).
36. MUIR, A. R.: Further observations on the cellular structure of cardiac muscle. J. Anat. **99,** 27—46 (1965).
37. NIELSEN, K. C. and OWMAN, Ch.: Difference in cardiac adrenergic innervation between hibernators and non-hibernating mammals. Acta Physiol. Scand, Suppl. **316,** 1—30 (1968).

38. Nilsson, E. and Sporrong, B.: Electron microscopic investigations of adrenergic and non-adrenergic axons in the rabbit S-A node. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **111,** 404—412 (1970).
39. Norbebg, K.-A. and Hamberger, B.: The sympathetic adrenergic neuron. Some characteristics revealed by histochemical studies in the intraneuronal distribution of the transmitter. Acta Physiol. Scand, Suppl. **238,** 1—42 (1964).
40. Patten, B. M.: The development of the heart. In „The Pathology of the heart" (S. E. Gould. ed.), pp. 20—88. Thomas, Springfield, Illionis (1953).
41. Rhodin, J. A. G., Del Missier, P. and Reid, L. C.: The structure of the specialized impulse-conducting system of the steer heart. Circulation **24,** 349—367 (1961).
42. Schiebler, T. H.: Herzstudie. II. Mitteilung. Histologische, histochemische und experimentelle Untersuchungen am Atrioventrikularsystem von Huf und Nagetieren. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **43,** 243—306 (1955).
43. Smith, R. B.: The occurrence and location of intrinsic cardiac ganglia and nerve plexuses in the human neonate. Anat. Rec. **169,** 33—40 (1971a).
44. Stein, A. A., Thibodeau, F. and Stranahan, A.: Electron microscopic studies of human myocardium. J. Amer. Med. Ass. **182,** 537—540 (1962).
45. Tawara, S.: „Das Reizleitungssystem des Säugetierherzens" Gustav Fischer. Jena. (After Robb, J. S., 1965). (1906).
46. Thaemert, J. C.: Ultrastructural interrelationship of nerve processes and smooth muscle cells in three dimensions. J. Cell. Biol. **28,** 37—49 (1966a).
47. Thaemert, J. C.: Ultrastructural of cardiac muscle and nerve contiguities. J. Cell. Biol. **29,** 156—162 (1966b).
48. Thaemert, J. C.: Fine structure of the atrioventricular node as viewed in serial sections. Amer. J. Anat. **136,** 43—66 (1973).
49. Thörel, C.: Über den Aufbau des Sinusknotens und seine Verbindung mit der Cava superior und den Wenckebachschsen Bündeln. Muenchen. Med. Wochschr. **57,** 183—186 (1910).
50. Trautwein, W. and Uchizono, K.: Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sinoatrial node of the rabbit heart. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **61,** 96—109 (1963).
51. Truex, R. C.: Comparative anatomy and functional considerations of the cardiac conduction system. In „The Specialized Tissues of the Heart" (A Paes de Carvalho, W. Carlos de Mello, and B. F. Hoffman, eds.), pp. 22—43. Elsevier, Amsterdam (1961).
52. Truex, R. C. and Smythe, M. Q.: Comparative morphology of the cardiac conduction tissue im mammals. Ann. N. Y. Acad. Sci. **127,** 19—33 (1965a).
53. Von Mierop, L.: Morphologic development of the conducting system In „Proceedings of the Conduction Development Conference" pp. 29—61. The National Heart And Lung Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1969).
54. Virágh, S. and Porte, A.: Structure fine du tissue vecteur dans le coeur de rat. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **55,** 263—281 (1961).
55. Virágh, S. and Porte, A.: Elementes nerveux intracardiaques et innervation du myocarde. Étude au microscope électronique dans le coeur de rat. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **55,** 292—296 (1961).
56. Virágh, S. and Challice, C. E.: Variations in filamentous and fibrillar organization, and associated sarcolemmal structures, in cells of the normal mammalian heart. J. Ultrastruct. Res. **28,** 321—334 (1969).
57. Virágh, S. and Challice, C. E.: The impulse Generation and Conduction system of the heart. pp. 43—84. Challice, C. E. and Virágh, S.: Structure of the Mammalian Heart. Academic Press. New York, London (1973).
58. Williams, T. H.: Electron microscopic evidence for an autonomic interneuron. Nature (London) **214,** 309—310 (1967).
59. Yamauchi, A.: Innervation of the vertebrate heart as studied with the electron microscope. Arch. Histol. Japon **31,** 83—117 (1969).
60. Yamauchy, A. and Burnstock, G.: An electron microscope study on the innervation of the trout heart. J. Comp. Neurol. **132,** 567—588 (1968).
61. Yamauchy, A.: Ultrastructure of the Innervation of the Mammalian heart. 127—167. Challice, C. E., and Virágh, S.: Structure of the Mammalian heart. Academic Press, New York, London (1973).

FLUORESZCENCIA-SPEKTROSZKÓPIÁS MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA BIOLÓGIAI RENDSZEREK VIZSGÁLATÁBAN: FÖRSTER-TÍPUSÚ ENERGIATRANSZFER

SOMOGYI BÉLA, MATKÓ JÁNOS és PAPP SÁNDOR

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Debrecen

1. Bevezetés

A lumineszcencia tárgykörébe tartozó alapjelenségek egyike az ún. Förster-típusú energiatranszfer, aminek lényege, hogy ha egy fluoreszkáló festék emissziós spektruma átfed egy másik festék (akceptor) abszorpciós spektrumával, a gerjesztett donor dipól-dipól kölcsönhatás révén sugárzás nélkül is átadhatja gerjesztési energiáját a tőle 10 nm távolságon belül tartózkodó akceptornak. Tekintve, hogy ezen folyamat sebessége (az átmenet valószínűsége) a donor—akceptor távolság (R) hatodik hatványa szerint csökken, a folyamat tanulmányozása igen érzékeny módszert jelent az ilyen nagyságrendű távolságok és különböző biológiai funkciók közötti korrelációk vizsgálatában. A transzfer mértéke információt szolgáltathat különböző molekuláris és sejtszintű folyamatokról, s a folyamatokban résztvevő (jelölt) komponensek helyének változásáról. Így a fluoreszcencia — s a vele kapcsolatos energiatranszfer folyamatok — igen komplex elméleti háttere ellenére, az energiatranszfer relatív változásának meghatározása révén sok esetben igen hasznos, a biológiai objektumok széles skáláján — molekuláris szinttől sejtszintig — alkalmazható félempirikus, fenomenológikus vizsgálati módszer is lehet.

Jelen közlemény keresztmetszeti képet ad arról, hogy a Förster-típusú energiatranszfer miként használható a különböző molekuláris és sejtszintű biológiai problémák megoldásában. Tekintve, hogy elsődleges célunk az energiatranszfer hatékonyságának a bemutatása biológiai rendszerek vizsgálatában, az alapjelenséget illetően csak néhány összefüggés felírására szorítkozunk, s a részleteket illetően az e tárgykörben megjelent kitűnő összefoglalókra és monográfiákra utalunk (CANTOR, TAO 1971, DALE, EISINGER 1974, FAIRCLOUGH, CANTOR 1978, STRYER 1978).

Egy donor—akceptor pár esetén a gerjesztett donor molekula energiavesztése a következő módon mehet végbe:

a) fluoreszcencia útján (k_f sebességi állandóval)

b) Förster-típusú energiatranszfer útján (k_t sebességi állandóval)

c) különböző kioltó mechanizmusok révén ($\Sigma_i k_i$ eredő sebességi állandóval)

A fentieknek megfelelően definiálható az energiatranszfer E hatásfoka:

$$E = \frac{k_t}{k_f + k_t + \Sigma_i k_i}. \tag{1}$$

A transzfer k_t sebességi állandójára FÖRSTER munkái alapján (FÖRSTER 1948, FÖRSTER 1966) felírható, hogy

$$k_t = 8{,}71 \times 10^{23}\ Jn^{-4}\, k_f\, R^{-6}\, \varkappa^2\ sec^{-1}, \tag{2}$$

ahol k_t a fluoreszcencia átmenet sebességi állandója, n a donort és az akceptort elválasztó közeg törésmutatója, R a donor—akceptor távolság, J az ún. átfedési integrál (a hullámhossz függvényében megadva):

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty \varepsilon_A(\lambda)\, F_D(\lambda)\, \lambda^4\, d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda)\, d\lambda}, \tag{3}$$

ahol $\varepsilon_A(\lambda)$ az akceptor moláris extinkciós együtthatója, $F_D(\lambda)$ a donor korrigált emissziós intenzitása egységnyi hullámhosszra vonatkoztatva.

A $\varkappa^2$ a donor—akceptor pár relatív orientációját jellemzi:

$$\varkappa^2 = (\cos\alpha - 3\cos\beta\cos\gamma)^2, \tag{4}$$

ahol α a donor és az akceptor dipólusmomentumai által bezárt szög, β a donor momentuma és a donor—akceptor középpontjait összekötő egyenes által bezárt szög, γ az akceptor momentuma és a donor—akceptor középpontjait összekötő egyenes által bezárt szög.

Az (1) összefüggés másik gyakran használt alakja:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}, \tag{5}$$

ahol

$$R_0 = 9{,}74 \times 10^3\ (Jn^{-4}\Phi\varkappa^2)^{1/6}. \tag{6}$$

Itt

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + \Sigma_i k_i} \tag{7}$$

a donor kvantumhatásfoka.

A kísérleti lehetőségeket illetően a transzfer E hatásfokának meghatározására számos egyensúlyi, ill. fluoreszcencia élettartam mérésen alapuló módszer ismeretes (EISENBERG 1975, DALE és EISINGER 1975), amelyek részletezésével itt nem foglalkozunk.

2. Molekuláris paraméterek meghatározása Förster-típusú energiatranszfer segítségével

A Förster-típusú energiatranszfer hatodik hatvány szerinti távolságfüggése rövid (2—10 nm) távolságon belül igen jó térbeli felbontást biztosít. Tekintve, hogy az energiatranszfer „hatótávolsága" a molekulák (főleg a makromolekulák) átmérőjének tartományába esik, kézenfekvő alkalmazási területként adódik molekulán belüli, molekula-aggregátumok komponensei közötti távolságok vizsgálata. Az energiatranszfer ugyanezen sajátossága teszi lehetővé asszociációs-disszociációs folyamatok követését, reakciók sztöchiometriájának meghatározását, enzim reakciók sebességének mérését stb. Az a tény, hogy a fluoreszcencia élettartam általában a nsec (10^{-9} sec) tartományba esik, a módszer alkalmazási lehetőségeinek kiterjesztését jelenti, amennyiben segítségével az ilyen időtartományba eső mozgások detektálhatók, s változásaik mérhetők. Ilyen, különböző fizikai-kémiai, polimerkémiai, biokémiai, biofizikai, biológiai szempontból egyaránt fontos mozgástípusok pl. a transzlációs diffúziós mozgás, az intramolekuláris Brown-mozgás, a molekulán belüli atomcsoportok relatív mozgása stb.

2.1 Intramolekuláris távolságok mérése

Makromolekulák jól definiált, specifikus helyére megfelelő donor—akceptor párt képező fluoreszcens festékeket kötve, a megfelelő helyek közötti átlagos távolság a donor és akceptor molekulák között történő rezonancia energia transzfer hatásfokának (és egyéb paramétereinek) meghatározása után kiszámítható. Ehhez nyilvánvaló feltétel, hogy a festékek kötődése ne okozzon olyan mértékű konformáció változást, ami megváltoztatja a kérdéses távolságot. Ezen feltétel teljesülésének kísérletes bizonyítása általában nehezen kivitelezhető. A szokásos eljárás — amennyiben erre lehetőség van — a távolság különböző festékpárok segítségével történő meghatározása. Amennyiben különböző festékpárokkal közel azonos távolság adódik, az említett feltétel nagy valószínűséggel teljesül, s a meghatározott távolság elfogadható.

Gyakori eset, hogy egy makromolekula működésének megértéséhez igen hasznos adat a molekula alakjának ismerete. Jó példa erre a rodopszin, amelynek molekulasúlya 40 000 dalton. Egy ilyen molekulasúlyú gömb alakú molekula átmérője kb. 4,5 nm. Ez azt jelenti, hogy ha a rodopszin gömb alakú, akkor nem éri át a membránt, amelyben működését kifejti. Ha viszont, alakja elnyújtott, akkor átérheti azt. Ez utóbbi, elnyújtott alakra utaló molekuláris távolságokat (a legnagyobb 7,5 nm) határoztak meg Wu és Stryer (1972) különböző donor—akceptor párokat képező fluoreszcens festékekkel jelölve a rodopszin meghatározott helyeit. Bár a méréseket nem a kezeletlen membránban, hanem digitonin oldatba, illetve mesterséges membránba vitt rodopszinon

végezték, az eredmény — az ugyanis, hogy a rodopszin elnyújtott alakú, ami lehetővé teszi számára, hogy helyes orientáció esetén átérje a membránt és mint a membrán foton-aktivált csatornája működjön — nagy valószínűséggel extrapolálható a természetes környezetében található rodopszinra is. Későbbi, más módszer használatával végzett kísérletek ugyancsak alátámasztják Wu és Stryer megállapítását (Sardet, Tardien, Luzrati 1976, Montal, Darszon, Trissl 1977). Hasonlóan, a *G* aktin specifikus helyeinek fluoreszcens jelölésével mértek intramolekuláris távolságot Miki és Mihashi (1978). A *G* aktin nukleotid kötőhelyét ε-ATP-vel, a cys-373 SH csoportját pedig N-/4-dimetilamino-3,5-dinitrofenil/maleimiddel (DDPM) jelölve mind „steady state" fluorimetriás úton, mind fluoreszcencia élettartam méréssel meghatározták az ε-ATP-ről a DDPM-re irányuló energia transzfer hatásfokát. A különböző módon mért transzfer hatásfoka hibahatáron belül azonos érték volt. Ennek felhasználásával a G aktin nukleotid kötő helyének a 373-as ciszteintől mért távolságait meghatározva, arra 3 nm értéket kaptak.

Mint ismeretes, az enzimek a kémiai reakciók sebességét 10—12 nagyságrenddel növelik. Katalizáló hatásuk kifejtésének első lépése az ún. enzim-szubsztrát komplex kialakulása. Ugyancsak ismeretes, hogy az enzimek ezen reakciógyorsító hatása szelektív, vagyis az enzimek szubsztrátjaikra nézve igen specifikusak. Ez azt jelenti, hogy az enzim-szubsztrát komplexben az enzim és szubsztrát között több ponton is kötések alakulnak ki. Nyilvánvaló, hogy az enzim és szubsztrát között kialakuló kötések, valamint az enzim kötőcentrumában található egyéb csoportok természetének tisztázása igen fontos a katalízis mechanizmusának feltárásában. E helyütt a probléma tisztázásához használatos módszerek felsorolásától eltekintve, csak a Förster-típusú energiatranszfer mérésén alapuló módszer alkalmazásával foglalkozunk.

Ezt a módszert használták a termolizin aktív centrumának tanulmányozására Horrocks és mtsai (1975), valamint Berner és mtsai (1975). A termolizin a hődenaturációval szemben nagy mértékben ellenálló fehérjebontó enzim. Az aktivitásához szükséges cink ion az aktív centrumot képező mélyedésben van, s az aktív centrum tartalmaz még négy kalcium ion kötőhelyet is. A fenti szerzők az enzim aktív centrumában levő Zn^{2+} iont Co^{2+} ionra, míg az egyik Ca^{2+}-t Tb^{3+} ionra cserélték. Ekkor az enzim triptofán csoportjait gerjesztve, azok energiatranszfer révén gerjesztik a Tb^{3+} iont, ami viszont a Co^{2+} ionnak adja át energiája egy részét. A kobalttal jelölt és kobaltot nem tartalmazó enzimpreparátumok Tb^{3+} emissziójának vizsgálatából meghatározható a Tb^{3+} és Co^{2+} közötti energiatranszfer hatékonysága. Ezen adat birtokában a fenti szerzők a donor—akceptor távolság értékére 1,36 nm-t kaptak, ami jól egyezik a röntgen krisztallográfiás módszerrel mért adatokkal.

Későbbi vizsgálatokban ugyanezen energia transzfer rendszert használták a termolizin hődenaturációjának vizsgálatára (Khan és mtsai 1978). A hőmérsékletet 20 °C-ról indulva fokozatosan 90 °C-ig emelték. Eközben a Tb^{3+} —

Co^{2+} távolság szigmoid lefutást követve 1,46 nm-ről kb. 2,2 nm-ig emelkedett. A 80 °C körüli és annál magasabb hőmérsékleten a fluoreszcencia intenzitások alacsony szintje miatt, meglehetősen megnőtt a mérés hibája. Ez az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy a mért transzfer hatásfokából számított donor—akceptor távolság nem tükrözte a termolizin kb. 80 °C körül bekövetkező denaturációját. Egy másik, a mérési módszer sajátságából következő probléma ez esetben az, hogy a donor—akceptor távolság esetleg jelentős növekedését az energiatranszfer erős (hatodik hatvány szerinti) távolságfüggése miatt a natív, kisebb donor—akceptor távolsággal jellemezhető enzim molekulák jele elnyomhatja.

Wolfman és Hammes (1977) az enzim specifikus kötőhelyeire bekötött donor és akceptor molekulák segítségével tanulmányozták a nyúlizom foszfofruktokináz enzimének regulációját. Vizsgálataikban az enzim aktív centrumához közel eső citrát-kötő helyet és a legreaktívabb SH csoportot jelölték. A citrát-kötő helyhez piridoxál-5'-foszfátot (PMP) kötöttek, míg az SH csoportot NBD-kloriddal (7-kloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) vagy NSM-mel (4-dimetil-amin-4'-maleimidostilben) reagáltatták. Mindkét esetben a PMP szerepelt donorként. Az NBD-vel jelölt enzim esetében a donor—akceptor távolság értékére 4 nm-t, míg NSM jelölés esetén 3,6 nm-t kaptak. A további vizsgálatok azt mutatták, hogy a donor—akceptor távolság a kísérleti hibán belül változatlan marad mind pH:7,0, mind pH:8,0 esetén. Változatlan marad továbbá különböző (0,1—1 mM) koncentrációjú ATP, 6 mM fruktóz 6-foszfát, valamint 5 mM $MgCl_2$ jelenléte esetén is. Ez azt mutatja, hogy sem az enzim aktivitásában regulációs szerepet játszó aggregációs folyamatok, sem a különböző — a szabályozásban ugyancsak résztvevő — ligandok okozta konformációs változások nem vezetnek a donor—akceptor távolság változására. Tekintve, hogy a donor—akceptor pár az enzim aktív centruma közelében van, az eredmények azt mutatják, hogy az aktív centrum lokális konformációs állapota nem érzékeny a regulációs faktorokra, s így a citrát enzimgátló hatása allosztérikus.

2.2 Intermolekuláris távolságok mérése

Az intramolekuláris távolságméréshez hasonlóan, különböző egymáshoz kötődő vagy egymás közvetlen közelében lokalizált molekulákat megfelelő donor, ill. akceptor molekulákkal jelölve, a Förster-típusú rezonancia energiatranszfer mérése útján a rendszer funkciójával összefüggő, s truktúrára jellemző információk nyerhetők. Az intermolekuláris transzfer rendszereknek különös szerepe van a sejtben található tartósan vagy átmenetileg előforduló különböző struktúrák (pl. kromoszóma, multienzim komplexek, antigén-antitest komplexek, mediátor-receptor komplexek, enzim-ligand komplexek stb.) tanulmányozásában. Az alábbiakban említett példák ezen vizsgálatok jelentő-

ségét, sokoldalú alkalmazhatóságát kívánják illusztrálni — a teljességre való törekvés igénye nélkül.

Förster-típusú energiatranszfer vizsgálatok sorozata segített a hét polipeptid- láncból felépülő citokróm *c* oxidáz rendszer térbeli elrendezésének vizsgálatában. Három specifikus hely (egyik a citokróm *c* hem csoportja) közötti távolság meghatározása a citokróm *c* oxidázt alkotó alegységek relatív térbeli elrendezésére nézve igen értékes ismereteket adott. Ugyanakkor egy érdekes kérdést is felvetett. Azt ugyanis, hogy miként mehet végbe a kötött citokróm *c* hem csoportja és a legközelebbi hem *a* csoport közötti relatíve nagy — 2,5 nm — távolságot áthidaló elektrontranszport (DOCKTER, STEINEMANN, SCHATZ 1978).

Esherichia coli-ból preparált piruvát dehidrogenáz multienzim komplex három enzimet — E_1, E_2, E_3 — tartalmaz, amelyek sztöchiometriai aránya a komplexben 24:24:12. A komplexen belül az intermedier molekulákat valószínűleg egy rotációra képes 1,4 nm hosszúságú „kar" szállítja az egyik aktív centrumtól a másikhoz (KÖRKE, REED 1960). Ezen elképzelés módosított formája szerint az intermediereket két ilyen forgó „kar" átadhatja egymásnak (KÖRKE és mtsai 1963), ami az egyes aktív centrumok közötti maximális távolságot az előbbiből következő 2,8 nm helyett 5,6 nm-re terjeszti ki. MOE, LERNER és HAMMES (1974) kimutatták, hogy az E_1 enzim aktív centrumába kötött tiokróm-difoszfáttól az E_3 aktív centrumába kötött FAD felé irányuló rezonancia energiatranszfer hatásfoka 8%, ami ebben az esetben a két aktív centrum között 4,5 nm nagyságú távolságot jelent. Ez a kísérleti eredmény tehát kizárta a fenti egyszerű intermedier transzfer lehetőségét, s egyúttal valószínűsítette a második — a forgó „kar"-ok közötti intermedier átadás útján realizálódó — mechanizmust. Természetesen más — a mérési eredménnyel összeegyeztethető — mechanizmus is elképzelhető, mint pl. az aktív centrumok konformációs változás okozta időleges közeledése útján végbemenő intermedier transzfer. Ugyanezen komplex E_1 enzimének energiatranszfer segítségével történő tanulmányozása vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy allosztérikus ligandok által produkált konformációs változás több mint 4 nm távolságban is éreztetheti hatását. A piruvát dehidrogenáz (E_1) SH csoportját — ami távol van mind az aktív centrumtól, mind a regulátor helytől — az enzim aktivitásának jelentős változása nélkül maleimiddel, az enzim Co-A kötő regulátor centrumát ANS-sel jelölve PAPADAKIS és HAMMES (1977) azt találták, hogy a festékek közötti távolság több mint 4 nm. Ugyanakkor, az SH-t jelölő festék mobilitása jelentősen megnő, ha az enzimhez Co-A kötődik. Ez egyértelműen a Co-A által előidézett, nagy távolságban (4 nm) is jól észlelhető konformációs változást mutatja. Egy másik rendszer, amelynek vizsgálatában jelentős ismereteket szolgáltattak az energiatranszfer mérését célzó fluoreszcens vizsgálatok, a kódátírást végző DNS-függő RMS polimeráz. Az enzim négyféle alegységből épül fel ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$). Bár szerkezetéről, működéséről, szabályozásáról,

sok adat áll rendelkezésre, hatásmechanizmusa távolról sem tekinthető ismertnek.

Működése a DNS-hez történő kötődéssel kezdődik. Tekintve, hogy csak a DNS helix egyik láncát írja át, kézenfekvő feltételezés, hogy kötődésével lokálisan felnyitja a hélix két láncát összekötő hidrogénhidakat. Az így keletkezett hurok a kódátírás alatt az enzim mozgásával együtt, ugyancsak tovább halad a DNS mentén. A hurok létezésének bizonyításához, méretének meghatározásához számos módszert — ezek között fluoreszcenciás módszert is — alkalmaztak. A hurok minimális méretének meghatározására DAMJANOVICH és mtsai (1977) a Förster-típusú energiatranszfer jelenségét használták fel. Vizsgálataikhoz mesterséges DNS-t [poli d(A-T)] használtak. Az energiatranszfer-rendszert a DNS-hez kötődő etidium bromid s az enzim primer aminjaihoz kötődő fluoreszkamin alkotta. Az eredmények tanúsága szerint, a hurok mérete legalább 0,5—1 hélix-fordulatra terjed ki.

Ugyanezen enzim alegységei által meghatározott térbeli viszonyok vizsgálatára alkalmazta STENDER és PALM (1979) a rezonancia energiatranszfer útján történő távolságmérést. Az általuk alkalmazott donor—akceptor párok egyike fluoreszkáló rifampicin származék volt, amely a rifampicinhez hasonlóan szelektíven kötődik az enzim β alegységének meghatározott helyéhez. Ily módon a továbbiakban ez a hely mint állandó referencia pont használható. Az enzimet alegységekre bontva, minden alegységet külön-külön megjelöltek a megfelelő — a rifampicin származékkal donor—akceptor párt képező — fluoreszcens festékkel. Ezt követően egy adott jelzett alegységből és nem jelzett alegységekből összeállították az enzim több alegységből álló szerkezetét. Ezen eljárást különböző alegységeket jelölve megismételték, s a mért eredményekből meghatározták a β alegységen található rifampicin származék különböző alegységektől mért átlagos távolságait. Ezen értékek: a γ alegységre 5,9 nm; az α_2 alegységre 7,2 nm; s a β alegységre 6,1 nm.

A Förster-típusú energiatranszfer felhasználási lehetőségének egy másik példája az AULD, LATT és VALLEE (1972) által kidolgozott módszer, amely segítségével reakciókinetikai mérések végezhetők. A módszer lényege az, hogy ha danzilezett szubsztrátot használunk, az enzim-szubsztrát komplex kialakulása az enzimben található triptofán(ok) jelenléte miatt egy — a komplexre jellemző — donor—akceptor pár képződését jelenti. Így a donort abszorpciós maximumán gerjesztve, az akceptor emissziójának időbeli változása az enzim-szubsztrát komplex koncentrációjának időbeli lefutásával párhuzamos. Így a maximális fluoreszcencia intenzitás és fluoreszcencia-időfüggvényből számítható görbe alatti terület segítségével meghatározhatók az enzim kinetikai jellemzői.

2.3. A távolság meghatározásának hibaforrásai

Az előzőkben bemutatott példák tanúsága szerint a Förster-típusú energiatranszfer jól használható, mint „spektroszkópiás mérőszalag" (STRYER és HAUGLAND 1967). Ugyanakkor, a módszer alkalmazása során a helyes következtetések levonása érdekében számos hibaforrásra kell tekintettel lenni. A transzfer hatásfok mérésével történő intra- vagy intermolekuláris távolságok meghatározásánál gyakori eset, hogy a molekulák festékkel történő jelölése vagy nem specifikus, vagy a specifikus jelzés a molekula különböző helyein is előfordulhat. Ebben az esetben — a festék: jelölt molekula arányától függetlenül — a donor—akceptor párok távolsága nem ugyanaz. A rendszerben előforduló különböző donor—akceptor távolságok gyakorisága a vizsgált rendszer természetétől függő f(R) sűrűségfüggvény segítségével írható le. Ez egyértelműen azt jelenti, hogy a transzfer hatásfok segítségével számolt R érték az aktuális donor—akceptor távolságok sajátos átlaga lesz. Tekintve, hogy az E értéke a távolságok hatodik hatványától függ (l. 5. egyenlet), a különböző távolsággal jellemezhető festékpároknak a mért átlag értékhez adott járuléka is a távolság hatodik hatványa szerint változik. Ez okozza azt, hogy az ily módon számított átlagos donor—akceptor távolság ($\overline{R}$) az f(R) függvénnyel jellemzett populáció esetén, erősen a kisebb távolságok felé tolódik, vagyis:

$$\overline{R} < \int_0^\infty R\, f(R)\, dr. \qquad (7)$$

Feltéve, hogy egy molekula vagy molekula rendszer jól meghatározott helyein specifikusan kötött donor—akceptor pár található, a fenti effektus lényegese lecsökken, de nem feltétlenül elhanyagolható. Ebben az esetben is számolni kell egy, az f(R) távolságeloszlást „szélesítő" hatással. Általánosan elfogadott, hogy a molekulák több, közel azonos szabadenergia szinttel jellemezhető konformációs állapot között fluktuálhatnak. Ezen különböző konformációs állapotok — bár szabadenergia szintjük egymáshoz közel eső — a festékpárt kötő csoportokra nézve különböző távolságokat jelenthetnek. Ebben az esetben a konformációs állapotok eloszlása produkál egy, az állapotoknak és azok eloszlásának megfelelő távolságeloszlást.

A fentiekből következik, hogy különösen térbeli modellek felállítása esetén nem elegendő az $\overline{R}$ ismerete. A távolságeloszlás f(R) sűrűségfüggvényének meghatározására CANTOR és PECHUKAS (1971) egy a transzfer hatásfok R_0 függésének mérésén alapuló módszert javasol. Ugyanakkor, más módszer is található az irodalomban, amelynek segítségével az f(R) függvényről információ nyerhető (GRINVALD és mtsai 1972).

A továbbiakban, a donor—akceptor párok orientációjából származó, a távolság meghatározásának bizonytalanságát eredményező hatásokat vizsgálva DALE és EISINGER (1974, 1976) nyomán induljunk ki abból, hogy a donor-

akceptor párok távolsága minden festékpárra nézve azonos és időben változatlan. Ebben az esetben a donor—akceptor párok relatív orientációja az egyetlen további változó, ami az E értékét befolyásolja.

Feltételezve, hogy

$$\sum_i k_i \ll k_t k_f \tag{8}$$

az (1) és (2) segítségével az alábbi összefüggést kapjuk:

$$E = \frac{\varkappa^2}{\frac{R^6}{C} + \varkappa^2} \tag{9}$$

ahol C az egyenletek által meghatározott, s esetünkben változatlan érték.

Nyilvánvaló, hogy az E kísérletes úton történő meghatározása esetén az egyes donor-akceptor párokra jellemző E_i értékek átlagát ($\langle E_i \rangle$) kapjuk, ami azt jelenti, hogy a (9) egyenlet jobb oldalán álló kifejezés várható értékét kell megvizsgálnunk. Eközben két szélső esetet tárgyalunk: az egyik az ún. dinamikus átlagolás, amikoris feltételezzük, hogy a donor—akceptor páron belül a fluoreszcens molekulák orientációjának változása sokkal gyorsabb folyamat, mint akár a transzfer (k_t), akár a donor emissziója (k_f); a másik eset az ún. sztatikus átlagolás, amikor az orientáció változása a donor gerjesztett állapotának életideje alatt elhanyagolható.

Az első esetben nyilvánvaló, hogy a transzfer bekövetkezte előtt minden lehetséges orientáció többször is előfordul, vagyis a transzfer hatékonysága minden donor—akceptor párra nézve azonos. Ez esetben:

$$\langle E \rangle_d = \langle E_i \rangle_d = \frac{\langle \varkappa_i^2 \rangle}{C^{-1} R^6 + \langle \varkappa_i^2 \rangle} . \tag{10}$$

Az egyenlet ilyen alakja azt jelenti, hogy ha a donor—akceptor orientációs szabadságának ismeretében a $\langle \varkappa_i^2 \rangle$ értékére korlátokat szabhatunk, akkor az $\langle E \rangle_d$ ismeretében az R értékére alsó és felső határokat adhatunk meg. A második esetben, amikor a donor—akceptor pár orientációjának változása lassú, a különböző festékpár molekulák különböző E_i értéket adnak, s ezek nemcsak a $\varkappa_i^2$ értékétől, hanem a $\varkappa_i^2$ és $C^{-1} R^6$ aránytól is függnek. Ez esetben tehát

$$\langle E \rangle_s = \langle E_i \rangle_s = \left\langle \frac{\varkappa_i^2}{C^{-1} R^6 + \varkappa_i^2} \right\rangle . \tag{11}$$

A $\varkappa_i^2$ szélső értékeire vonatkozó ismereteink így a $C^{-1} R^6$ tag miatt nem alkalmazhatók a számított R érték bizonytalanságának becslésére. Vannak olyan esetek, amikor

$$k_t \ll k_f, \quad \text{azaz} \quad \langle E \rangle \ll 1 ,$$

ami azt jelenti, hogy a $\varkappa_i^2$ jó közelítéssel elhanyagolható a $C^{-1} R^6$ taghoz képest. Ez azt eredményezi, hogy ekkor a dinamikus átlagoláshoz hasonlóan a $\varkappa_i^2$ szélső értékeire vonatkozó ismeretek alapján jó közelítéssel meghatározható az R távolság alsó és felső határa.

A fentiekben külön választottuk a donor—akceptor párok orientáció és távolság eloszlásából származó, az átlagos távolság bizonytalanságát eredményező faktorokat. A valóságban tovább növekszik a probléma, ha figyelembe vesszük, hogy mind az orientáció, mind a távolság valamilyen eloszlással jellemezhető, s a két eloszlás nem független egymástól. Már nem túl nagy molekulák esetén is több, egymásra szuperponálódó mozgás együttese eredményezi a donor és akceptor molekulák közötti aktuális távolság változását. Ugyanakkor, a festékek közötti távolság változása rendszerint az orientáció változását is jelenti (a speciális esetektől eltekintve) és viszont. A módszer ugyanakkor — mint az az előbbiekből is kitűnik — jól használható a távolságméréssel összefüggő egyéb molekuláris problémák megoldására.

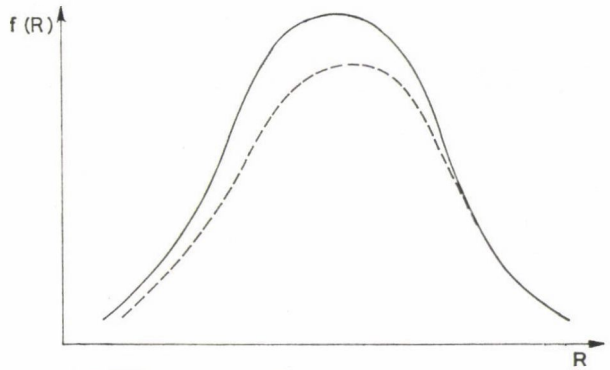
2.4. Dinamikus folyamatok jellemzése

Mint az az előző részből is kitűnik, az esetek azon részében, amikor a mérés célja sztatikus paraméterek (távolságok, különböző molekulák relatív térbeli elhelyezkedése stb.) meghatározása, a donor gerjesztett állapotának élettartama alatt lezajló dinamikus folyamatok — a donor—akceptor pár távolságának, relatív orientációjának változása — többnyire zavaróak, s a számított adatok pontosságát csökkentik. Ugyanezen folyamatok igen hasznosak azonban, ha különböző, ezen paraméterekkel szoros kapcsolatban álló dinamikus folyamatokat akarunk vizsgálni.

Ha a donor és akceptor molekulák a donor gerjesztett állapotának élettideje alatt jelentős mértékű Brown-mozgást végeznek, ez a mozgás — a diffúziós állandók értékének megfelelően — befolyásolja a Förster-típusú energiatranszfer hatékonyságának értékét. A transzlációs diffúziós mozgás ezen szerepét illetően KATCHALSKI és mtsai (ELKANA, FEITELSON, KATCHALSKI 1968, STEINBERG, KATCHALSKI 1968) végeztek vizsgálatokat. A szerzők a jelenség kvalitatív leírását az alábbiak szerint adták meg: $t = 0$ időpillanatban gerjesszük a donor molekulákat egy végtelenül rövid impulzussal. A donorok legerjesztődését két alapvető — párhuzamos — folyamat szabja meg: a donorok fluoreszcenciája és a donor—akceptor molekulák közötti energiatranszfer. Ez utóbbi folyamat sebességi állandója fordítva arányos a donor—akceptor távolság hatodik hatványával. Ennek következtében a gerjesztés utáni pillanatokban azon donor molekulák gerjesztődnek le energiatranszfer útján nagyobb hányadban, amelyekhez közelebb található akceptor molekula. Ha a gerjesztett állapotban levő donor molekulák számának időbeli változását vizsgáljuk, akkor az a donor—akceptor távolság függvényében más és más érték lesz.

Az alábbi ábra folytonos vonallal megadott függvénye legyen egy hipotetikus f(R) sűrűségfüggvény, ami t = 0 időontban jellemzi a (gerjesztett donor)-akceptor távolság eloszlását. Ez az eloszlás nyilvánvalóan a rendszer geometriáját tükröző dinamikus egyensúlyi állapotra jellemző (1. ábra).

Ha a transzlációs diffúziótól eltekintünk, egy t > 0 időpontban a gerjesztett állapotban levő donor molekulákra nézve az f(R) sűrűségfüggvény a szag-



1. ábra. A (gerjesztett donor)-akceptor távolság eloszlását jellemző sűrűségfüggvény $t = 0$ (——), ill. $t > 0$ (– – –) időpontban

gatott vonallal jelölt módon torzul. Ennek oka az energiatranszfer, ami nagyobb valószínűséggel megy végbe a kisebb R értékeknél. Ennek következtében számottevő diffúziós mozgás esetén a -R irányába mutató diffúziós áram igyekszik az f(R) sűrűségfüggvény eredeti (egyensúlyi) alakját helyreállítani. Más szóval, azon donor molekulák, amelyek t = 0-ban távol voltak az akceptortól — így kisebb valószínűséggel gerjesztődtek le a (0, t) időintervallumban —, a diffúzió révén azokhoz közelebb kerülve nagyobb valószínűséggel vesznek részt energiatranszfer folyamatokban, mintha nem lenne diffúzió.

A szerzők által a transzlációs diffúzió fenti hatásának kvantitatív leírására használt egyenletek megoldása nem adható meg analitikus formában, ezért azokat számítógép segítségével illesztették a kísérleti adatokhoz. Kísérleteikben különböző viszkozitású oldatokban vizsgálták a szabad diffúziót végző donor és akceptor molekulák közötti energiatranszfer hatékonyságát, s a kísérleti adatoknak az egyenletekhez történő illesztése útján nyert diffúziós állandó értékei, igen jó egyezést mutattak az egyéb módszerekkel nyert értékekkel.

Ezt a módszert adaptálták Haas és mtsai (1978) homológ oligopeptidek láncvégei Brown-mozgásának követésére. N^5-(2-hidroxietil)-L-glutamin egységekből felépülő 4—9 tagszámú oligopeptidek egyik végét naftil származékkal, a másik végét danzillal jelölve, vizsgálták a gerjesztett molekulák legerjesztődésének időfüggését a külső viszkozitás és a lánchossz függvényében. Vizsgálataikban feltételezték, hogy a láncvégek relatív mozgása szabad diffúziós moz-

gással modellezhető, amely diffúziós mozgás fékezője, a totális frikciós erő (f_t), belső és külső frikciós erők összege:

$$f_t = f_i + f_e. \tag{12}$$

A láncvégek relatív mozgásából következően — az előzőekben ismertetett transzlációs diffúzióhoz hasonlóan — a diffúzió növeli a donor—akceptor molekulák közötti energiatranszfer hatékonyságát, vagyis gyorsítja a donor molekulák legerjesztődését.

A kísérleti eredmények elméleti modellhez történő illesztése ez esetben is számítógép segítségével történt. A molekulák belső Brown-mozgását jellemző diffúziós állandó értékét illetően azt találták, hogy az annál nagyobb, minél hosszabb az oligopeptid, viszont egy adott oligopeptid esetén független attól, hogy a láncvégek távolsága mennyire tér el az átlagos láncvég távolságtól. Ez utóbbi érdekes megállapításra úgy jutottak, hogy a donor—akceptor távolság függvényeként felírt diffúziós állandó ($D(R) = D'\text{-}aR$, ahol D' és a áll) esetén nem tudták kielégítően illeszteni a kísérleti adatokat a folyamatot leíró differenciálegyenlethez.

3. Intracelluláris távolságmérés Förster-típusú energiatranszfer folyamatok segítségével

A sejtek anyagcsere állapotában bekövetkező változások rendszerint szubstruktúrák — membrán, citoplazma, kromatin, különböző makromolekulák stb. — egy részének mennyiségi és minőségi változását eredményezik. Ilyen minőségi változás lehet pl. különböző komponensek relatív helyzetének, térbeli eloszlásának megváltozása. Példa lehet erre a különböző receptorok laterális diffúziós és aktív folyamatok hajtotta összeállása („cluster" képződés) vagy a kromatin struktúrájának fellazulása.

Különböző komponensek relatív eloszlásának változása — bizonyos feltételek teljesülése esetén — jól követhető fluoreszcencia energiatranszfer mérések segítségével.

Mivel a sejt igen sok komponensből felépülő komplex rendszer, ezen mérésekhez rendszerint külső fluoreszcenciás jelzőket használnak alkalmas transzfer-rendszerként.

Az alkalmazott festékpárok számára s a vizsgálható sejtszintű problémák széles körére való tekintettel a továbbiakban a teljességre való törekvés nélkül, csupán néhány kiragadott példát tárgyalunk.

3.1. Sejtmembránok vizsgálata energiatranszfer segítségével

A sejtek külső membránjának egyik lényeges funkciója a sejt és környezete közötti információcsere lebonyolítása. Ezen funkció ellátására a különböző specifikus receptorok széles skálája található a citoplazmatikus membránban (receptorok hormon, neurotranszmitter és egyéb molekulák felismerésére és megkötésére). Ezen receptorok nagy részéről elmondható, hogy specifikus behatásra — valószínűleg az információ átvitel optimalizálása miatt — adaptív módon mennyiségi vagy/és minőségi változást mutatnak: változhat pl. a felületi eloszlásuk, sűrűségük, konformációs állapotuk stb. A receptorok populációinak jellemzése ily módon felvilágosítást nyújthat a sejtek állapotáról.

A konkanavalin A (kon A) kötő receptorok reakciójának ilyen különbségét figyelték meg normális és tumorosan transzformált fibroblasztok összehasonlítása esetén. Tumoros sejtek kon A-receptor komplexei összetorlódnak („cluster" képződés), ami normális sejteken nem figyelhető meg. Kézenfekvő, hogy a kon A molekulák egy-egy szubpopulációját alkalmas festékekkel (donor—akceptor pár) megjelölve, tumoros és normál sejtek esetén a festékek közötti energiatranszferben különbség figyelhető meg: tumoros sejteknél jelentős energiatranszfer várható, míg normál sejteknél kicsi vagy semmi.

Fernandez és Berlin (1976) mikroszkóp fluorimetriás mérései igazolták, hogy a rezonancia energiatranszfer igen alkalmas eszköz a sejtek külső membránja szervezettségi szintjének vizsgálatára. Kon A molekulák egy részét dimetilaminonaftalen szulfonilkloriddal (DANS), egy másik részét rodamin izotiocianáttal (RITC) jelölve a két festék közötti energiatranszfert vizsgálták, miután a jelzett kon A molekulákat a sejt kon A kötő receptoraival reagáltatták. Nyilvánvaló, hogy a festékek koncentrációját, a jelölés körülményeit előkísérletben kellett a festékpárra specifikussá tenni. Erre a célra glutáraldehiddel aggregáltatott, a két festékkel festett tubulin keveréket használtak. Vizsgálataikban az energiatranszfer egzakt mérése helyett, az akceptor és a donor fluoreszcencia intenzitások hányadosát (I_A/I_D) határozták meg. A transzferhatásfok növekedtével ugyanis, nő az akceptor fluoreszcencia intenzitása és csökken a donoré, tehát nő a fenti hányados. Nyilvánvaló, hogy ez a megközelítés számos feltételezést rejt magában, s inkább empirikusnak, mint egzaktnak mondható.

Kon A molekulákat külön RITC-cal és DANS-sal jelölve, s azokat a sejtekhez kötve követni tudták a kon A-receptor komplexek felületi szerveződésének kinetikáját: míg a normál sejtek esetén az I_A/I_D hányados a kezdeti enyhe emelkedés után állandó szinten maradt, addig a transzformált sejtek esetén értéke az idővel (kb. egy órán át) lineárisan nőtt.

A rezonancia energia transzfer vizsgálata a fentiek tanulsága szerint — bizonyos sejtekre nézve — alkalmasnak látszik normál és rákos sejtek diagnosztizálására és elkülönítésére.

A fent leírt módszert adaptálták CHAN és mtsai (1979) multiparaméteres automatizált komputer kontrollált sejt szeparátorra (MACCS). A szerzők az energiatranszfer-rendszerüket a következő módon hozták létre: FITC-cal, ill. RITC-cal jelzett kon A molekulák (F-kon A, ill. R-kon A) keverékét reagáltatták Friend vírus által transzformált eritroleukémiás sejtekkel. A megfelelő kontroll minták a jelöletlen kon A-val, az F-kon A-val, valamint az R-kon A-val reagált sejtszuszpenziók voltak. Méréseiket 4 °C-on végezték, így a kon A kötődés eredményeképpen a sejtek energiaigényes folyamatai révén kialakuló „sapka" képződés („capping") elmaradt. A sejt anyagcsere folyamatai az alacsony hőmérséklet következtében igen lelassulnak, így ezen a hőfokon a sapkaképződés helyett, csak a — külön energiát nem igénylő — foltképződés megy végbe, ami azt jelenti, hogy a kon A kötő receptorok a membránban kisebb aggregátumokat képeznek. A CHAN és mtsai által végzett mérések tehát az R-kon A és F-kon A molekuláknak ezen receptor aggregátumokon belüli távolságára adhattak felvilágosítást. Az energiatranszfert a donor emissziójának csökkenésén, az akceptor emissziójának növekedésén, valamint az akceptor emissziós polarizációjának csökkenésén keresztül mérték. Mindhárom módszer azt mutatta, hogy az F-kon A és R-kon A térbeli pozíciójából következően energiatranszfer figyelhető meg. Tekintve, hogy mind az F-kon A, mind az R-kon A molekula több festékmolekulát tartalmazott, a kon A geometriai adatait figyelembe véve külön meg kellett vizsgálni a transzfer hatékonyságának a festékeket hordozó molekulák (kon A) térbeli eloszlásától való függését. Ily módon, a transzfer hatásfokára nyert adatokból távolságot tudtak számolni. A kísérletek során nyert 57%-os transzferhatásfokot alapul véve a GENNIS és CANTOR (1972) által kidolgozott modell segítségével a kon A molekulák átlagos távolságára 4 nm távolságot kaptak. A sejt szeparátor adta azon lehetőség, hogy a transzfer hatásfok sejtpopuláción belüli eloszlását is követni lehet, a szerzők véleménye szerint az adott sejttípus esetén, nem használható a nyert eloszlás kvantitatív feldolgozására és interpretálására.

A Förster-típusú energiatranszfert használták SHAKLAI és mtsai (1977) a hemoglobin vörösvérsejt membránhoz történő kötődésének vizsgálatára. Vizsgálatuk annak a paradoxonnak a feloldását célozta, miszerint — korábbi vizsgálatok tanúsága szerint — egyrészt igen nehéz hemoglobint nem tartalmazó vörösvérsejt membránt preparálni, másrészt ezen membránokhoz a hemoglobin gyengén kötődik. Kísérleteikben a membránlipid külső régiójába kötődő 12-/9-antroil/-stearinsavat (AS) használták donorként, míg az akceptor szerepét a hemoglobin töltötte be. A pH és a kétértékű ionok hemoglobin kötődésére gyakorolt hatásának tanulmányozása segítségével megállapították, hogy a hemoglobinnak a vörösvérsejt membránjához történő kötődése elektrosztatikus és reverzibilis. A sejtenkénti kötőhelyek száma $1{,}4 \times 10^6$. A kötés erősségét jellemző asszociációs konstans értékét $0{,}85 \times 10^8$ M^{-1}-nek találták, ami azt mutatja, hogy a hemoglobin kötődése erős. Az AS és a hemoglobin

molekulák közötti távolság értékére 6 nm-t kaptak, ami jó egyezésben van azzal a feltevéssel, hogy az AS molekulák a membrán külső, míg a hemoglobin molekulák a membrán belső oldalához kötődnek.

DISSING és mtsai (1979) humán vörösvérsejt membránjának aniontranszport rendszerét vizsgálták fluoreszcein higany acetát (FMA) molekulák közötti energiatranszfer segítségével. Olyan membrán preparátumot készítettek, amelyben a membránproteinek túlnyomó része (> 90%) az aniontranszportért felelős, ún. „band 3" protein volt. A protein citoplazma felé eső részén található SH csoportját FMA-val jelölték 1:1 sztöchiometriai arányban. Azt tapasztalták, hogy a jelölés változatlanul hagyta a membrán anionszállító képességét. A jelölés célja az volt, hogy az FMA molekulák közötti energiatranszfer segítségével megállapítsák, hogy a membránban a „band 3" proteinek monomer vagy magasabb oligomer formában vannak jelen. Az energiatranszfer vizsgálatára az FMA emissziós polarizációjának mérését használták. WEBER (1952) munkája alapján az energiatranszfer az alábbi összefüggés szerint befolyásolja az emisszió polarizációjának értékét:

$$\frac{1}{p_{\bar{n}}} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3}\right)\left(1 + \frac{3}{2}\,\bar{n}\sin\Theta\right), \tag{13}$$

ahol $p_{\bar{n}}$ a polarizáció értéke, ha a fluoreszcenciát átlagosan $\bar{n}$ transzfer előzi meg. p_0 a transzfer nélkül mérhető polarizáció értéke; Θ pedig a donor és akceptor orientációját jellemzi.

A szerzők az FMA: protein arányt változtatva kimutatták, hogy ha ez az arány 0,5 alatt van, a polarizáció 0,4, míg 1:1 arányú jelölés esetén a polarizáció értéke leesik 0,1-re. 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS) kezelés hatására a polarizáció értéke visszaáll 0,1-ről 0,4-re. Mindezek alapján megállapították, hogy a membránban a „band 3" proteineknek 25%-nál kisebb hányada monomer, a többi dimer vagy magasabb oligomer formában található.

Hasonló kérdést vizsgált VEATCH és STRYER (1977), valamint VANDERKOOI és mtsai (1977). Vizsgálataik célja egyik esetben a gramicidin A, a másik esetben az ATP-áz membránban előforduló asszociált formáinak kimutatása volt. Mindkét vizsgálatban egymástól különböző donorral, ill. akceptorral jelölt molekulákat építettek a membránba. VEATCH és STRYER (1977) az akceptorral jelölt gramicidin mólarányát (a) változtatva mérte a donor kvantumhatásfokának (Q) változását, s a

$$\frac{Q}{Q_0} = 1 - Ea \tag{14}$$

egyenlet alapján kimutatták, hogy a membránon belül a gramicidin dimér formában van jelen. VANDERKOOI és mtsai (1977) ugyancsak ATP-áz aggregátumokat mutattak ki. Az általuk mért energiatranszfer nem változott, ha

rendszerüket tojás foszfatidilkolinnal tízszeresre hígították, viszont eltűnt, ha a rendszerbe a jelölt ATP-áz mennyiségét sokszorosan meghaladó jelöletlen ATP-ázt vittek be.

3.2. In situ kromatin-struktúra tanulmányozása energiatranszfer segítségével

A rezonanacia energiatranszfer használata kipreparált kromatin struktúrájának, valamint nukleinsavak és fehérjék kölcsönhatásának tanulmányozására relatíve gyakori. Ugyanakkor, a sejten belüli natív kromatin struktúrájának e technikával történő vizsgálata a kiértékelési nehézségek miatt nem terjedt el. Intézetünkben megpróbáltunk alkalmas energiatranszfer-rendszert összeállítani, s a kapott eredményeket egy elméleti modell segítségével leírni (SZÖLLŐSI és mtsai 1978, SOMOGYI és mtsai 1979, 1980). Ezen munka egy további, a módszer hatékonyságát bemutató példa. Vizsgálatainkban a fluoreszkamin-etidium bromid (EB) festékpárt használtuk mint donor—akceptor párt. A fluoreszkamin a fehérjék primer amino csoportjaihoz kovalens módon kötődik. Ugyanakkor, a vízzel is reagál, nem fluoreszkáló terméket képezve. Az etidium bromid a kettős szálú nukleinsavakhoz interkalálódás útján kötődik (jóval kisebb mértékben más típusú kötődés is megfigyelhető). Az interkalálódott EB molekula kvantumhatásfoka mintegy hússzorosa a szabad EB molekuláénak. Ennek az az oka, hogy a hidrofób környezetbe került interkalálódott EB molekulától protontranszfer útján sugárzás nélkül elvitt energiahányad jóval kisebb. A fentieknek megfelelően, mindkét általunk alkalmazott festék kvantumhatásfoka megnő, ha azok kötődtek. Ugyanakkor, spektrális tulajdonságaik olyanok, hogy megfelelő sztérikus körülmények esetén jó donor—akceptor párt képeznek. A fluoreszkamin — nem korrigált spektruma alapján — 385 nm-nél gerjeszthető a legjobban, míg emissziós maximuma 470 nm körül van. Az EB abszorpciós maximuma 520 nm-nél található, míg emissziós maximuma 600 nm-nél van (ugyancsak korrigálatlan spektrum alapján).

Méréseinkhez AKR:Lac 3H mg:Lac/F_1 egértörzsből származó normál és tumoros limfocitákat használtunk. Célunk a két sejttípus kromatinállományában levő különbségek alkalmas energiatranszfer-rendszer segítségével történő detektálása volt. Tekintve, hogy a sejtek önmagukban is bonyolult struktúrák, továbbá a fluoreszkamin vízzel adott oldalreakciója jelentősen megnehezíti az eredmények kiértékelését, az energiatranszfer hatásfokának változását próbáltuk követni a sejtkoncentráció és az alkalmazott EB koncentráció függvényében. Egy-egy mérési sorozatban az egy sejtre jutó fluoreszkamin molekulák számát állandó értéken tartottuk. Ezt úgy értük el, hogy készítettünk egy fluoreszkaminnal jelölt sejtszuszpenziót, s az egész mérési sorozathoz ezt használtuk törzspreparátumként.

A transzfer hatásfokának meghatározásához steady state mérések esetén általában az

$$\frac{F_A^D}{F_A^0} = 1 + \frac{\varepsilon_D}{\varepsilon_A} E \qquad (15)$$

összefüggés használatos. Az ε_D, ill. ε_A a donor, ill. az akceptor moláris abszorpciós állandója a gerjesztés hullámhosszán, míg F_A^0, ill. F_A^D a csak akceptor, ill. a donor és akceptor együttes jelenléte esetén mérhető fluoreszcencia intenzitás (az egyenlet érvényességének feltétele, hogy a gerjesztési hullámhosszon mind a donor, mind az akceptor gerjeszthető, míg az emissziós hullámhosszon a donor emissziója elhanyagolható legyen).

A fenti összefüggés alkalmazásánál problémát jelentett azon megfigyelésünk, miszerint a fluoreszkamin kezelés jelentősen megnövelte mind a normál, mind a tumoros sejtek EB kötő képességét. Ezen probléma megkerülésére önkontrollos kísérleteket végeztünk. Megállapítottuk, hogy egyik festék sem torzítja észrevehető mértékben a másik spektrumát. A következő lépésben csak fluoreszkaminnal jelölt sejteket használva megállapítottuk, hogy 385 nm-es gerjesztés esetén mekkora a 600, ill. 470 nm-en mérhető fluoreszcencia intenzitások hányadosa. Ennek alapján a kettősen jelölt sejtekben megmérve a 385 nm-es gerjesztéshez tartozó 470 nm-es emisszió intenzitását, meghatározható a 385/600 nm-es intenzitás értéke, amit az F_A^D meghatározásakor a donor járulékaként figyelembe kell venni (levonva azt a kettősen jelölt sejtekben mért 385/600 nm-es értékből). Hasonlóan, a csak EB-dal jelölt sejtek esetén megmérhető, hogy mekkora a 600 nm-en emittált fluoreszcencia intenzitások hányadosa, ha a mintát 385, ill. 520 nm-en gerjesztjük. Ennek segítségével az 520/600 nm-en mérhető fluoreszcencia intenzitás alapján az EB 385/600 nm-en adott fluoreszcencia intenzitását számolni lehet. A két korrekciós faktor használhatósága ugyanakkor megkívánja, hogy egyrészt az EB 385/470 nm-es, másrészt fluoreszkamin 520/600 nm-es fluoreszcenciája közel nulla legyen. Tekintve, hogy ezen feltételek teljesültek, egyetlen — mindkét festékkel jelölt — sejtszuszpenzión végzett mérésekkel meghatározható az energiatranszfer hatásfoka.

Tekintve, hogy a transzfer hatékonyság sejtkoncentráció függését kívántuk vizsgálni, elegendő volt az F_A^D/F_A^0-1 érték meghatározása is, ami az E-vel arányos érték. Ezen értékeket a sejtkoncentráció függvényében ábrázolva mind normál, mind tumoros sejtekkel telítési hiperbolát kaptunk (az összes alkalmazott EB koncentrációnál).

Az eredmények analízise megkövetelte egy olyan elméleti modell kidolgozását, ami figyelembe veszi egyrészt a mérési feltételeket, másrészt a festékek és sejtek reakciókinetikai sajátságait (Somogyi, Damjanovich, Kertai 1980).

Az EB sejten belüli kötődését illetően az alábbiakat feltételeztük:

a) az EB a DNS különböző helyeihez képes kötődni az alábbi séma szerint:

$$EB + N_i \underset{k_{-i}}{\overset{k_i}{\rightleftharpoons}} X_i; \quad K_i = \frac{k_i}{k_{-i}}; \quad i = 1, 2, \ldots, n. \qquad (16)$$

(EB a szabad etidium bromid molekula; N_i, ill. X_i az i-típusú szabad, ill. etidium bromidot tartalmazó kötőhely; K_i az i-helyre jellemző kötődési konstans.)

b) Bármely N_i helyhez kötődő EB kvantumhatásfoka Φ (a szabad EB kvantumhatásfokát Φ_0 jelöli).

c) $[N_i] \gg [X_i]$, ahol a szögletes zárójelek moláris koncentrációt jelentenek. A fluoreszkamin kötődését illetően — a kísérletek jellegéből következően — feltételezzük, hogy az egy sejtre jutó festékmolekulák számának átlaga állandó és a telítési érték alatt van. A fenti feltételek mellett az alábbi összefüggés nyerhető:

$$\left(\frac{F_A^D}{F_A^0} - 1\right)^{-1} = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_D c_f \bar{E}} + \frac{1}{C} \frac{\varepsilon_0 \Phi_0}{\varepsilon_D \Phi \bar{E} q c_f}, \tag{17}$$

ahol F_A^D és F_A^0 értéke kísérletesen meghatározható; C a sejtkoncentráció; ε_0, ill. ε az EB moláris abszorpciós állandója szabad, ill. kötött állapotban. ε_D a fluoreszkamin moláris extinkciós koefficiense (ε_0, ill. ε a szabad, ill. kötött EB moláris abszorpciós állandója a fluoreszkamin gerjesztési hullámhosszán, míg ε_D a fluoreszkamin moláris abszorpciós állandójának ugyanezen hullámhossszon mért értéke). C_f a fluoreszkamin sejten belüli átlagos koncentrációja;* $\bar{E}$ — a kromatin strukturális jellemzőit is tartalmazó — speciális módon definiált transzferhatékonyság; q pedig a sejtek EB kötő képességét jellemző paraméter:

$$q = \alpha \sum_{i=1}^{n} K_i \xi_i \tag{18}$$

ahol

$$\xi_i = \frac{[N_i]}{\alpha C}, \tag{19}$$

Itt a C a sejtkoncentrációt, α pedig az egy sejten belüli EB kötő helyek átlagos számát jelöli.

Ha az $\left(\frac{F_A^D}{F_A^0} - 1\right)^{-1}$ mennyiséget a sejtkoncentráció reciprokának függvényében ábrázoljuk, a (17) egyenletnek megfelelően egyenest kapunk, amelynek s és t koordináta metszetei az alábbiak:

$$s = q \frac{\varepsilon \Phi}{\varepsilon_0 \Phi_0}, \tag{20}$$

* A C_f értékének meghatározása a fluoreszkamin vízzel adott oldatreakciója miatt nem egyszerű. Egy lehetséges módszer: fluoreszkamint reagáltatunk valamilyen primer aminocsoportot tartalmazó aminosavval úgy, hogy a fluoreszkamin nagy feleslegben legyen. Ezt több fluoreszkamin koncentrációnál megismételve fluoreszcencia intenzitások mérésével meghatározható, hogy adott körülmények között az aminosav hány százaléka reagált fluoreszkaminnal. Az adott aminosav koncentrációjának ismeretében fluoreszcencia intenzitás alapján meghatározható a sejtet tartalmazó minta primer aminosavval reagált fluoreszkamin koncentrációja. Ezt az értéket elosztva a sejtkoncentrációval, megkapjuk a C_f értékét.

$$t = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_D} \frac{1}{C_f \bar{E}}. \qquad (21)$$

Az s tehát a sejtek EB kötő képességével, míg az l/t az $\bar{E}$ transzferhatásfokkal arányos.

Tekintve, hogy mindkét paraméter tartalmaz információt a sejtek kromatinjáról, a modell alkalmas különböző kromatinstruktúrával rendelkező sejtcsoportok jellemzésére, esetleg azonosítására. Normál és tumorosan transzformált egér limfocitákon végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy azok — optimalizált kísérleti körülmények között — az s és t paraméterek segítségével valóban jellemezhetők.

4. Összefoglalás

A fentiekben bemutatott alkalmazási lehetőségek széles spektruma azt tanúsítja, hogy a Förster-típusú energiatranszfer jelenségén alapuló mérési módszerek igen hatékonyan alkalmazhatók mind molekuláris, mind sejtbiológiai kutatásokban.

Ezen módszerek térhódításának egyik oka a fluoreszcenciás módszerek nagy érzékenysége. A másik ok a Förster-típusú energiatranszferre jellemző 2—10 nm-es tartományon belüli jó távolságfelbontás, amit a transzfer sebességi állandójának (k_t) a donor—akceptor távolság (R) hatodik hatványa szerinti csökkenése eredményez.

Tekintve, hogy napjaink biológiai kutatásaiban egyre erősödő tendencia a környezetükkel kölcsönhatásban álló részrendszerek tanulmányozása, ami fluoreszcencia mérésen alapuló módszerek esetén általában nehézség nélkül megvalósítható, az ismertetett módszerek további térhódítása s a biológiai kutatások egyre több területén történő megjelenése várható.

IRODALOM

1. Auld, D. S., Latt, S. A., Vallee, B. L.: Biochemistry **11,** 4994 (197).
2. Berner, V. G., Dabnall, D. W., Birnbaum, E. R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **66,** 763 (1975).
3. Cantor, C. R., Pechukas, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68,** 2099 (1971).
4. Cantor, C. R., Tao, T.: Proc. Nucl. Acid. Res., Vol. 2. Harper and Row (Eds.: G. L. Cantoni, D. R. Davies) pp. 31—93 (1971).
5. Chan, S. S., Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M.: J. Histochem. Cytochem. **27,** 56 (1979).
6. Dale, R. E., Eisinger, J.: Biopolymers **13,** 1573 (1974).
7. Dale, R. E., Eisinger, J.: in: „Biochemical Fluorescence Concepts", Dekker, New York (Eds.: R. F. Chen and H. Edelhoch) p. 115 (1975).
8. Dale, R. E., Eisinger, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73,** 271 (1976).
9. Damjanovich, S., Somogyi, B.: J. Theoret. Biol. **41,** 567 (1973).
10. Damjanovich, S., Bahr, W., Jovin, T. M.: Eur. J. Biochem. **72,** 559 (1977).
11. Dissing, S., Jesaitis, A. J., Fortes, P. A. G.: Biochem. Biophys. Acta **553,** 66 (1979).
12. Docter, M. E., Steinemann, A., Schatz, G.: J. Biol. Chem. **253,** 311 (1978).
13. Eisenberg, I.: in: „Biochemical Fluorescence: Concepts" Dekker, New York (Eds.: R. F. Chen and H. Edelhoch) p. 43 (1975).

14. ELKANA, Y., FEITELSON, J., KATCHALSKI, E.: J. Chem. Phys. **48,** 2399 (1968).
15. FAIRCLOUGH, H., CANTOR, C. R.: in: „Methods in Enzymology" Acad. Press, New York (Eds.: C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff) pp. 347—379 (1978).
16. FERNANDEZ, S. M., BERLIN, R. D.: Nature **264,** 411 (1976).
17. FÖRSTER, T.: Ann. Physik. **2,** 55 (1948).
18. FÖRSTER, T.: in: „Modern Quantum Chemistry" Vol. 3. Acad. Press, New York (Ed.: O. Sinanoglu) p. 93 (1966).
19. GENNIS, R. B., CANTOR, C. R.: Biochemistry **11,** 2509 (1972).
20. GRINVALD, A., HAAS, E., STEINBERG, I. Z.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69,** 2273 (1972).
21. HAAS, E., KATCHALSKI-KATZIR, E., STEINBEBG, I. Z.: Biopolymers **17,** 11 (1978).
22. HORROCKS, W. D. Jr., HOLMQUIST, B., VALLEE, B. L.: Prod. Natl. Acad. Sci. USA **72,** 4763 (1975).
23. KHAN, S. M., BIRNBAUM, E. R., DARNALL, E. W.: Biochemistry **17,** 4669 (1978).
24. KÖRKE, M., REED, L. J.: J. Biol. Chem. **235,** 1931 (1960).
25. KÖRKE, M., REED, L. J., CAROLL, W. R.: J. Biol. Chem. **238,** 30 (1963).
26. MOE, O. A., LERNER, D. A., HAMMES, G. G.: Biochemistry **13,** 2552 (1974).
27. MONTAL, M., DARSZON, A., TRISSL, H. W.: Nature **267,** 221 (1977).
28. MIKI, M., MIHASHI, K.: Biochim. Biophys. Acta **533,** 163 (1978).
29. PAPADAKIS, N., HAMMES, G. G.: Biochemistry **16,** 1890 (1977).
30. SARDET, C., TARDIEU, A., LUZZATI, V.: J. Mol. Biol. **105,** 383 (1976).
31. SHAKLAI, N., YGUERABIDE, J., RANNEY, H. M.: Biochemistry **16,** 5585 (1977).
32. SOMOGYI, B., KERTAI, P., DAMJANOVICH, S.: Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung., **15,** 5 (1980).
33. SOMOGYI, B., SZÖLLŐSI, J., RÉDAI, I., DAMJANOVICH, S.: Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. **14,** 25 (1979).
34. STEINBERG, I. Z., KATCHALSKI, E.: J. Chem. Phys. **48,** 2404 (1968).
35. STENDER, W., PALM, D.: Biochem. Biophys. Acta **578,** 337 (1979).
36. STRYER, L.: Ann. Rev. Biochem. **47,** 819 (1978).
37. STRYER, L., HAUGLAND, R. P.: Biochemistry **58,** 719 (1967).
38. SZÖLLŐSI, J., SZABÓ, G., SOMOGYI, B., DAMJANOVICH, S.: Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. **13,** 63 (1978).
39. VANDERKOOI, J. M., IERKOMAS, A., NAKAMURA, H., MARTONOSI, A.: Biochemistry **16,** 1262 (1977).
40. VEATCH, W., STRYER, L.: J. Mol. Biol. **113,** 89. (1977).
41. WEBER, G.: Trans. Faraday Soc. **50,** 552 (1952).
42. WOLFMAN, N. M., HAMMES, G. G.: Biochemistry **16,** 4806 (1977).
43. WU, C., STRYER, L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69,** 1104 (1972).

A BAKTERIÁLIS REKOMBINÁCIÓ ENZIMEI

BÁNFALVI GÁSPÁR, CSUZI SÁNDOR és ANTONI FERENC

Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Kémiai-Biokémiai Intézet, Budapest

Bevezetés

Az utóbbi években a géneket a nukleinsav molekulák szakaszaival azonosították, felderítették a biológiai jelrendszert, a genetikai kódot és a dekódolás mechanizmusát. A genetikai információ áramlás hosszú evolúciós fejlődés eredményeként érte el jelenlegi szintjét. Nagyon valószínű, hogy a genetikai rendszer legősibb struktúrája a fehérje, és az RNS-ek is korábban jöttek létre és vettek részt a genetikai üzenet „közlekedtetésében", mint a DNS.

A DNS a jelenleg ismert egyetlen makromolekula, mely a sejt élete folymán nem változik, tehát *állandó* információt reprezentál. A sejt DNS tartalma egyben a sejt legjellemzőbb állandója. A sejt élete során változó sebességgel és mennyiségben szintetizálódó és lebomló RNS *mozgó* információt képvisel.

Annak ellenére, hogy a természetes génkicserélődés molekuláris mechanizmusa nem kellőképpen ismert, a kutatás jelenlegi stádiumában az ember olyan ismeretek és technikai lehetőségek birtokába jutott, melyek segítségével a genetikai információ megváltoztatására képes.

Az általános rekombinációt molekuláris aspektusból megközelítve jelen munkában a természetes génkicserélődésben résztvevő enzimeket ismertetjük és a rekombináció egyik specifikus lépését tisztázzuk a baktériumok rekombinációs enzimének, az ATP-függő DNáznak ATPázra és DNázra történt elkülönítése alapján.

Genetikai információ átvitele

A DNS minden sejt alapvető genetikai anyaga, mely nukleotid triplettekben kódolva a sejt programjának hordozója. Az információ átadása szakaszosan megy végbe, amelyet az alábbi vázlat szerint ad meg a genetika központi dogmája (18):

$$\text{DNS} \rightarrow \text{RNS} \rightarrow \text{Fehérje}$$

Az információ megőrzés és átvitel fő folyamatai a másolás (replikáció), az információ átírása hírvivő RNS formájába (transzkripció), és végül a hírvivő

RNS által szállított információ leolvasása, a genetikai „üzenet" dekódolása a riboszómán a fehérje bioszintézis során (transzláció).

Az RNS vírusok léte nyilvánvalóvá tette az RNS → DNS átmenetet. A DNS-től DNS-re történő információ átvitel körfolyamatának, valamint az RNS → DNS irányú fordított átírás (reverz transzkripció) figyelembevételével (4,69) a fenti séma az alábbiak szerint módosul:

$$\text{DNS} \circlearrowright \text{DNS} \rightleftharpoons \text{RNS} \circlearrowright \text{RNS} \rightarrow \text{Fehérje}\,.$$

A Gamow által feltételezett DNS → Fehérje átmenet (28) még kísérletes bizonyításra szorul. Nincsenek adatok a genetikai információ egyéb irányú (Fehérje → DNS, Fehérje → RNS, Fehérje ↔ Fehérje) áramlásáról.

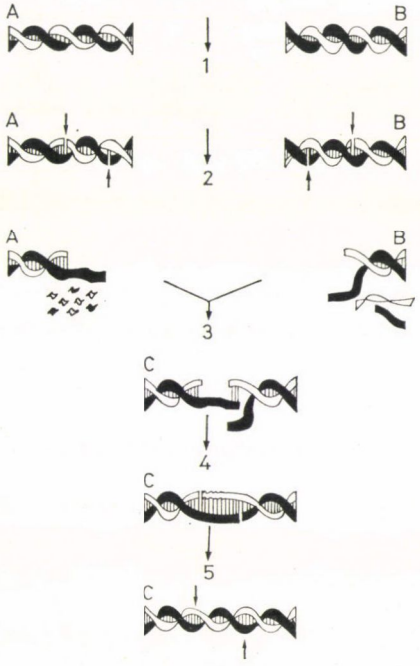
A DNS ⇌ DNS információ átadás *egyik módja* a már említett *replikáció*. A folyamat során mindkét DNS molekuláról másolat készül. Az ilyen típusú információ átvitel a genetikai anyag generációkon történő fenntartását jelenti, és felelős az adott faj tulajdonságaiért.

A DNS ⇌ DNS információ átvitel *másik módja* a rekombináció, lehetőséget nyújt a genetikai anyag további gazdagítására. A szülői gének kicserélődésének eredményeként új tulajdonságú hibrid jön létre. A rekombinációnak ezt a módját *szexuális konjugációnak* nevezzük. Prokaryotákra elsősorban nem a szexuális konjugáció, hanem az ivartalan osztódás információ átviteli forma jellemző. Baktériumokon figyelték meg a rekombináció más típusát, a *transzdukciót;* baktérium DNS darabok fág fertőzéssel bejuthatnak másik sejtbe és rekombinálódnak a sejt DNS-ével. A rekombináció legszemléletesebb megnyilvánulása a bakteriális *transzformáció*, melynek során a külső közegből származó DNS bejut a baktériumba és beépül a gazdasejt DNS-ébe. A *rekombinációs repair* egyfajta DNS „hiba javító" mechanizmus a gének kombinálódásának újabb példája. Az ibolyán túli sugárzást követő túlélés és a genetikai rekombináció közötti kapcsolatot bakteriofág rendszerben észlelték először (49). E hiba javító folyamat során ép gének vagy génszakaszok kerülnek az egyik DNS láncról a másikra.

A genetikai információ átvitel és bővítés problémáival kapcsolatos ismereteink zöme, mikroorganizmusokon végzett vizsgálatokon alapulnak. Ezek a folyamatok magasabb rendű növényi és állati sejtekben a prokaryotákhoz hasonlóan, de lényegesen bonyolultabb formában mennek végbe. A rekombinációs kísérletek kapcsán a DNS replikáció és repair kutatásoknak egyaránt nagy lendületet adott genetikailag hiányos törzsek izolálása és alkalmazása. Az eukaryota rekombinációs kísérletek jelentős hátránya, hogy ilyen mutánsok nem állnak rendelkezésre.

Noha a genetika alapvető jelensége maga a rekombináció, az intenzív kutatások ellenére a gének kicserélődésének molekuláris alapjairól kevesett tudunk, a kromoszómák szerveződésének komplex problémája ma még megol-

datlan kérdés. A rekombináció általános élettani megnyilvánulásai eltérő molekuláris mechanizmust takarhatnak. Ezt tükrözi CLARK (16) megfogalmazása is: „A rekombináció olyan folyamatok csoportja, amelyek során DNS szakaszok hatnak egymásra, ennek eredményeként vagy a bázis sorrend, vagy gének, génszakaszok kapcsolata változik meg." Az új definíció elveti a rekombináció egységes mechanizmusáról vallott felfogást, nem zárja ki a rekombináció elágazó, kör-körös, váltakozó mechanizmusának lehetőségét sem. A lehetőségeknek megfelelően a rekombinációs modellek száma meglehetősen nagy. Ezek ismertetése nem célunk, csupán hivatkozunk a legismertebb hipotetikus modelleket bemutató és azokat összefoglaló munkákra (30, 33, 52, 65, 66). Egyszerű általánosítás molekuláris szinten mégis elvégezhető. A homológ DNS szakaszok kicserélődésének molekuláris mechanizmusát a „törés-újra egyesítés" és a DNS fonalak szelektív másolásáról szóló „szétválasztás" elméletek magyarázzák. Az első elmélet szerint a DNS szakaszok kicserélődése független a kromoszómák megkettőződésétől, a második elmélet szerint az a DNS szintézissel kapcsolatos. Lambda fággal végzett kísérletek bizonyítékot szolgáltattak arra vonatkozóan, hogy a rekombináció kromoszómák törése és újra egyesülése útján történik. Az általános rekombináció DRAKE (24) szerinti hipotetikus sémája egy „törés újra-egyesítése" mechanizmust mutat be (1. ábra).



1. ábra. Az általános rekombináció DRAKE (24) szerint. 1. egyszálú törések keletkezése A és B duplexen, 2. egyszálú szakaszok keletkezése letekeredéssel vagy nukleázos emésztéssel, 3. összekapcsolódás, 4. repair, 5. lánczárás

Az ábra szerint a rekombináció kezdetekor egy- vagy kétszálú törések jönnek létre a szülői duplexeken, majd egyszálú szakaszok képződnek a törések mentén. Ez utóbbiak képződésének feltétele a WATSON—CRICK-féle dupla spirál (74) széttekerése vagy nukleázos emésztése. Ezt követően az egyszálú régiók komplementer szakaszai összekapcsolódnak, majd pótlólagos nukleotid eltávolítás vagy betoldás után ép, duplaszálú rekombináns DNS molekula jön létre. Elméleti meggondolások alapján valószínű, hogy egyszálú DNS szakaszok cseréje jóval lassúbb folyamat, és hosszú homológ szakaszokat tételez fel, szemben a hasonló méretű duplaszálú DNS cseréjével. Ez utóbbi folyamat azért lehet gyorsabb, mivel a kicserélt régiókban csupán az egyszálú végek homológiája szükséges. *E. coli*ban a rec F és rec BC reakcióutak közül a rec F közvetíti a hosszú, egyszálú szakaszok cseréjét, míg a rec BC reakcióút főleg duplaszálú, és igen rövid egyszálú DNS darabok kicseréléséért felelős (51). Az életképes rekombinánsoknak mintegy 99%-a rec BC, 1%-a rec F reakcióút során képződik. A rec BC reakcióút kulcsenzime a rec B és rec C gén terméke, az exonukleáz V. Az *E. coli* rec génjeire és nukleázaira a későbbiek során visszatérünk.

A rekombinációban résztvevő enzimek

1. Dezoxiribonukleázok
2. DNS polimerázok
3. DNS ligázok
4. DNS konformációt befolyásoló fehérjék

A felsorolásból feltételezhető, hogy a rekombináció több lépéses folyamatában multienzim komplex lehet a leghatékonyabb. A folyamat egyes részletei már viszonylag ismertek, más analóg folyamatok, nevezetesen a replikáció és repair révén, e folyamatokban közös enzimeik (DNáz, polimeráz, ligáz) alapján, míg más, a DNS konformáció változásával kapcsolatos részletekre az utóbbi évek kutatásai derítettek fényt. A rekombinációs folyamat specifikus enzimei a nukleázok és a DNS konformációt befolyásoló fehérjék, ezeket részletesebben az *E. coli* példáján mutatjuk be.

1. Dezoxiribonukleázok

A nukelázoknak jelentős biológiai szerepet tulajdonítanak a DNS repairben, rekombinációban és az idegen eredetű DNS lebontásában (restrikció). A nukleázoknak két nagy csoportját különböztetik meg, endo- és exonukleázokat.

Az *endodezoxiribonukleázok* a DNS-re specifikus bázis szekvenciát ismerik fel, és ezek mentén hasítják a foszfodiészter kötést. A bázis szekvencia felismeré-

se a legspecifikusabb a restrikciós enzimeknél. Tágabb értelemben az összes szekvenciára specifikus DNázt restrikciós endonukleáznak neveznek, függetlenül attól, hogy részt vesznek a baktériumba bejutó idegen eredetű DNS lebontásában vagy sem. Ezek az enzimek általában a duplex hat nukleotidját ismerik fel, szemben a kevésbé specifikus endonukleázokkal, melyek szekvencia felismerő képessége mindössze 3—4 nukleotidra terjed ki (39). A DNS endonukleolitikus hasítása valószínűleg a DNS repairben, rekombinációban, restrikcióban egyaránt e folyamatok kezdetét jelenti.

Az *exodezoxiribonukleázok* képviselik a DNázok másik csoportját. Jellemző tulajdonságuk, hogy csak olyan DNS hidrolízisét katalizálják, amely a nukleáz számára hozzáférhető végálló nukleotidokat tartalmaz, ahonnan a DNS folyamatos emésztését elkezdik (39). Ez a különbség az endo- és exonukleázok között lehetőséget nyujt megkülönböztetésükre: kör-körös egy- vagy kétszálú DNS-t csak endodezoxiribonukleáz hasít. Az *E. coli* dezoxiribonukleázokat az 1. táblázatban foglaljuk össze. Az exonukleázok rendszerint a 3' hidroxi végen támadják a DNS-t (kivétel az exonukleáz V és exonukleáz VII) és mononukleotidokat hasítanak le, vagy az 5' foszfát végről szabadítanak fel di- vagy oligonukleotidokat.

A nukleázok közös jellegzetessége, hogy specifikusan vagy egyszálú, vagy kétszálú DNS-t bontanak, bár ez a megkülönböztetés nem minden endonukleáz

1. táblázat

E. coli dezoxiribonukleázok

Nukleáz	Struktúr gén	DNS szubsztrát	Hatásmód	Savoldékony DNS	Irodalom
Exonukleáz I	xon A sbc B	egyszálú	3'—5'	5'-dNMP és 5'-terminális pNpN	44, 46
Exonukleáz II* (DNS polimeráz I)	pol A	egy- és kétszálú	3'—5'	5'-dNMP	12, 47,62
Exonukleáz III	xth	kétszálú	3'—5'	5'-dNMP	58, 59
Exonukleáz IV	—	oligonukleotidok	—	—	35
Exonukleáz V	rec B rec C	egy- és kétszálú	3'—5' 5'—3'	oligonukleotidok	29, 76
Exonukleáz VI* (DNS polimeráz I)	pol A	kétszálú	5'—3'	5'-dNMP és oligonukleotidok	22, 37, 38, 63
Exonukleáz VII	—	egyszálú	3'—5' 5'—3'	oligonukleotidok	14
Exonukleáz VIII	rec E	kétszálú	—	oligonukleotidok	42
Endonukleáz I	—	egy- és kétszálú	—	oligonukleotidok	45
Endonukleáz II	—	egy- és kétszálú	—	oligonukleotidok	26
Rec BC endonukleáz	—	egyszálú	—	oligonukleotidok	29

* DEUTSCHER és KORNBERG (22) javaslatára az exonukleáz II és exonukleáz VI elnevezéseket nem használjuk, mivel azok a DNS polimeráz I aktivitás részét képezik.

esetében érvényes. Az exonukleázok, mint említettük, bázis szekvenciára nem specifikusak, működésük csak előzetes endonukleáz hasítás, esetleg egyéb DNS károsodásból származó egy- vagy kétszálú törés után lehetséges. Ezért az exonukleolitikus DNS bontást sok esetben másodlagosnak tekintik, bár jelenlétük az említett folyamatokban nem kétséges.

Már a genetikai rekombinációval kapcsolatos korai modellek feltételezik a DNS nukleázos bontását (33, 52). Azonban nincsenek adataink arról, hogy a rekombinációs folyamat beindításában konkrétan milyen endonukleázok vesznek részt, nem tudjuk azt sem, hogyan kerülnek kapcsolatba ezzel a folyamattal. Az 1. táblázatban felsorolt exonukleázok közül a rec BC enzim emelhető ki. Az exonukleáz V vagy rec BC enzim rekombinációs közti termékek képzésében vesz részt (27), szerepére a DNS konformáció változását befolyásoló fehérjék ismertetésénél visszatérünk.

2. DNS polimerázok

A DNS polimerázok a komplementer DNS szálat használják templátként a replikációban, repairben és rekombinációban. Ez utóbbi folyamat során a homológ egyszálú komplementer szakaszok összekapcsolását követően a hiányzó DNS szakaszok betoldását DNS polimerázok végzik. A DNS polimeráz reakcióval kapcsolatban hivatkozunk a kérdést a DNS bioszintézis aspektusából összefoglaló munkákra (39, 41, 60).

3. DNS ligázok

Két DNS véget a DNS ligáz képes összekapcsolni, 3' hidroxi és 5' foszfát csoportjaik foszfodiészter kötésének képzését katalizálva (48). A kötés létrejöttéhez szükséges energiát *E. coli* esetében NAD^+, T4 fág által indukált ligáz esetében ATP hidrolízise szolgáltatja. DNS ligáz nélkülözhetetlen a duplaszálú DNS egyszálú töréseinek javításában, egyenes alakú duplex „ragadós" végeinek („sticky" end) bázis párosodását követő kör-körös duplaszálú DNS létrehozásában, polimerázzal együttműködve DNS bioszintézisben, DNS szakaszok összekapcsolásában a genetikai rekombinációban.

4. DNS konformációt befolyásoló fehérjék

a) Fehérjék, melyek közvetlenül a DNS kiolvadását (melting) okozzák, mint az RNS polimeráz, vagy melyek specifikusan kötődnek egyszálú DNS szakaszokhoz (*h*elix *d*estabilizáló *p*roteinek, rövidítésük: HDP).

b) Enzimek, melyek átmeneti egyszálú törést követően megbontják a zárt, kör-körös szupertekercs szerkezetet (relaxáló enzim = swivelase).

c) Olyan enzimek, melyek a relaxált, zárt, kör-körös DNS duplexből negatív szuperhelikális csavarodással szupertekercset hoznak létre (tekercselő enzim = gyrase).

d) Az ATP hidrolízisét és a duplaszálú DNS közvetlen széttekeredését (letekerő enzim = unwinding enzim), illetve a komplementer egyszálú szakaszok összekapcsolását (összekapcsoló enzim = windase) katalizáló enzimek.

A DNS konformációt befolyásoló fehérjék közül a HDP nem segíti elő a természetes, natív szálak elválasztását, így valószínűleg nem ez az enzim szerepe a sejtben. Valószínűbbnek látszik a denaturált struktúra rögzítésében kifejtett hatása. Szintetikus szubsztráton rövid AT gazdag szakaszokhoz kötődve viszont fellazítja a duplaszálú struktúrát (19). A relaxáló enzim a szupertekercs megbontásával csupán előkészíti a kettős spirál széttekerését. A tekercselő enzim negatív szuperhelikális szerkezetet hoz létre a relaxált, zárt, kör-körös DNS-en. Jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezi az, hogy milyen módon fejti ki ezt a hatást, és milyen kapcsolatban van ez a rekombinációval és replikációval. Jelenlegi feltevés szerint a tekercselő enzim hozná létre a replikáció, illetve a rekombináció során a hélix forgásával fellazított szerkezetből a negatív szupertekercset. A tekercselésnek a rekombinációban játszott szerepe vitatott kérdés. Smith és mtsai (68) szerint gyrase csak a transzkripcióhoz szükséges. Mizuchi és mtsai (53) feltételezik a rekombináció negatív szuperhelikális DNS szükségletét, és a tekercselő enzim szerepét a duplex szálainak elkülönítésében. Beattie és mtsai úgy vélik, negatív szupertekercsek megkönnyítik egyszálú DNS darabok felvételét (9).

A duplex felgombolyítása energiaigényes folyamat, az ezzel kapcsolatos DNS konformáció változást eredményező reakciók függenek a sejt ATP tartalmától. Ha a sejt nem rendelkezik megfelelő energiakészlettel, a DNS szupertekercsek gyorsan eltűnnek, s a DNS konformáció változásával összefüggő reakciók nem játszódnak le. Ez a szabályozó mechanizmus önmagától értetődő prokaryota sejtekben. Eukaryota sejtekben a tekercselő enzimet nem találták meg, és jelenlétét nem is feltételezik. Valószínűleg az eukaryota „bemetsző-záró" („nicking-closing") enzim elegendő a replikáció során keletkezett pozitív szupertekercsek eltávolításához. A prokaryota szupertekercsek helyett eukaryotákban nukleoszómákat találunk. Feltételezik, hogy egy-egy DNS tekeredés a nukleoszóma körül megfelel egy-egy szuperhelikális huroknak (21). Abból a tényből kiindulva, hogy az eukaryota DNS nem tartalmaz szupertekercset, adódik a feltevés, hogy az eukaryota duplex nincs széttekeredésre kényszerítve, ezért replikációban és rekombinációban letekerő enzimek részvétele kétséges.

A prokaryota rekombináns DNS molekula képződésének feltétele egyszálú DNS szakaszok keletkezése, letekeredéssel vagy nukleázos emésztéssel (1. ábra). Ilyen vonatkozásban a felsorolt enzimek közül a letekerő enzimeknek

kitüntetett szerepük van. A letekerő enzimek a DNS szálak széttekeréséhez szükséges energiát ATP, dATP, esetleg egyéb nukleotid trifoszfát hidrolízisével nyerik. Az *E. coli* letekerő fehérjék közül (13) a DNS unwinding enzim, a rep protein és a rec BC nukleáz valószínűleg részt vesz a rekombinációban.

Az *E. coli* DNS-t letekerő enzimek vagy *helikázok* (2) egyszálú DNS-re specifikus ATPázok, melyek az egyszálú szakaszokhoz kötődnek, innen kezdik letekerni a duplaszálú DNS-t (3). A DNS replikációt és rekombinációt kódoló gének mutációja nem befolyásolja a helikázok aktivitását (1), bár kézenfekvő lenne szerepük ezekben a folyamatokban. In vivo szerepük egyelőre nem tisztázott.

A *rep protein* egyike azon *E. coli* fehérjéknek, amely bizonyos fágok (pl. ∅X 174) replikációjához szükséges (20). Rep protein hiányos sejtekben a gazdasejt DNS-ének replikációja is lassúbb (43). A rep protein tisztítása során derült ki, hogy az valójában egy egyszálú DNS-re specifikus ATPáz (61), mely a ∅X 174 DNS replikatív formájának (kör-körös duplex) széttekerésében vesz részt. Az enzim preferenciálisan kapcsolódik a oX 174 DNS replikációs villához. Katalitikus aktivitásához az ATP energiájára, ∅X 174 cisztron A fehérjére (nukleáz), DNS polimeráz III holoenzimre, HDP-re, Mg^{2+} ionokra és a négy dezoxiribonukleozid trifoszfátra van szüksége (43).

Rec BC nukleáz

Minden mutáció, mely az *E. coli* rec génjeit (A, B, C, D, E, F, G, H, J, K) éri, csökkent rekombinációs készséget eredményez, ugyanakkor a plazmid átörökítést (rezisztencia-, sex faktor) nem befolyásolja. A rec mutánsok a csökkent rekombinációs gyakoriság mellett, számos pleiotróp tulajdonsággal rendelkeznek: érzékenyek ibolyán túli besugárzással, röntgen- vagy gammasugárzással szemben (49), profágjuk nem indukálható (11, 31), érzékenyek mutagénekkel szemben (34, 72), temperált fággal nem tehetők lizogénné (32, 67). Ezek a tulajdonságok alkalmasak a rec$^-$ mutánsok megkülönböztetésére és magyarázattal szolgálnak a rec gének számát illetően. A rec mutációkon kívül ismeretesek olyan genetikai károsodások, melyek a rekombinációval csak közvetett módon állnak kapcsolatban. Számos ibolyán túli fényre érzékeny mutánsnak besugárzás után sem csökken jelentős mértékben a rekombinációs készsége. *E. coli* esetében legalább hat ilyen uvr gént írtak le (17). Ismeretesek más, vegyületekre érzékeny mutációk is (rac, sbc, lex stb.), melyek nukleáz aktivitása változatlan, a rekombináció gyakoriságát áttételesen befolyásolják, feltehetően azért, mert nem a rekombináció „fő útján" fekszenek.

Az *E. coli* rec mutációk közül a rec A, B és C génekről tudunk a legtöbbet. A rec A gén mutációja a rekombináció gyakoriságának csökkenésén kívül, az exonukleáz V aktivitás kiesését is eredményezi. A rec A, B és C mutánsok tulajdonságait a 2. táblázat tünteti fel. A rec A gén mutációjának eredménye a re-

2. táblázat

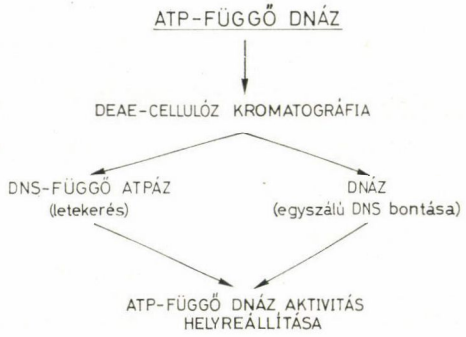
E. coli rec⁻ mutánsok sajátságai

Mutáns	Rec A⁻ („reckless")	Rec B⁻ („cautious")	Rec C⁻ („cautious")
Recombináció gyakorisága	drasztikusan csökkent	csökkent	csökkent
Érzékenység ultraibolya sugárzás, röntgen, mitomycin és alkyláló vegyületek iránt	magas	fokozott	fokozott
DNS bontás ultraibolya besugárzás után	fokozott	csökkent	csökkent
Egyszálú törések repairje	nem képes javítani	képes javítani	képes javítani
λ fág spontán produkciója	alacsony	normális	normális
Exonukleáz V aktivitás	fokozott	csökkent	csökkent

kombináció drasztikus csökkenése, magas sugárérzékenység és a sugárkárosodott DNS gyors bontása. E tulajdonságok miatt a rec mutációt gátlástalannak („reckless") is nevezik, szemben a rec B és rec C óvatos („cautious") mutációval. A rec A génről feltételezik, hogy olyan fehérjét határoz meg, mely a DNS bontását, így az exonukleáz V aktivitását is szabályozza. Újabban kimutatták, hogy a rec A protein katalizálja komplementer egyszálú DNS szakaszok összekapcsolását egy olyan reakcióban, mely az ATP hidrolíziséhez kötött (75). A rec A gén termék hatása feltehetően ellentétes a letekerő enzimek hatásával. A rec A protein összekacsoló hatásából adódóan duplex DNS szakaszok képződését katalizálva, jelentős szerepet játszana a rekombinációban és repairben egyaránt (10).

A rec B, rec C mutánsok csökkent rekombinációs készséget mutatnak, szintén érzékenyek ibolyán túli és röntgensugárzással szemben, és alacsony exonukleáz V aktivitással rendelkeznek (5, 56). Ebből adódott a feltevés, hogy a rec B és rec C gének az exonukleáz V struktúr génjei (5). A rekombinációban feltételezett szerepe miatt az enzimet az *E. coli* rekombinációs enzimének tekintik (76). Az *E. coli* exonukleáz V, más néven rec BC enzim egy ATP-függő DNáz, melynek számos hatása között duplaszálú és egyszálú exonukleolitikus (29, 54, 56), egyszálú endonukleolitikus (29) és DNS-függő ATPáz aktivitás (25, 29, 54, 56) egyaránt szerepel. Az ATP-függő DNáz aktivitást számos baktérium törzsben megtalálták (5, 15, 25, 29, 54, 56, 73, 76), eukaryotákban nem írták le. Az ATP-függő DNáz rekombinációval való kapcsolatát más baktériumok esetében is igazolták (15, 73).

A bakteriofágok közül a lambda rekombinációs rendszer és az exonukleáz V kapcsolatát vizsgálták behatóbban (66). A lambda fág rekombinációjához nincs szükség exonukleáz V-re. Ennek kettős magyarázata van. Az egyik az, hogy a lambda fágnak saját rec génjei vannak, a red X és a red B. Red X egy ismert funkciójú exonukleázt határoz meg, mely in vitro rekombinációs rend-



2. ábra. ATP-függő DNáz inaktiválódása és aktivitásának helyreállítása. *B. cereus*ból izolált ATP-függő DNáz (6) DEAE-cellulóz kromatográfiával DNS-től függő ATPázra és egyszálú DNS-re specifikus DNázra különíthető (7). Az elválasztott enzimek újraegyesítésével az ATP-függő DNáz aktivitás helyreállítható (7)

szerben is hatékonyan működik. Red B egy ismeretlen funkciójú fehérjét kódol, melynek feltételezett szerepe azonos lenne az *E. coli* rec A gén ellenőrző funkciójával. A másik ok, amiért az exonukleáz V hatástalan fág jelenlétében, az, hogy olyan gént (gam) is hordoz (17, 67), melynek terméke semlegesíti az exonukleáz V aktivitást. Gam^+ fággal fertőzött sejtek nem képesek rekombinálódni. Gam^- red^- fágot használva fertőzésre, a rekombináció exonukleáz V függő volt (71). Ez az eredmény is alátámasztani látszik az exonukleáz V rekombinációs szerepét.

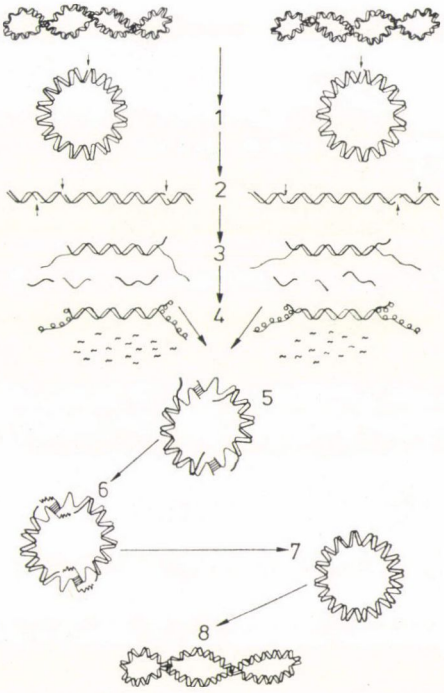
*Bacillus cereus*ból izolált és részlegesen tisztított ATP-függő DNázzal (6) igazoltuk az enzim már említett és sokat vitatott multifunkcionális sajátságait. Részlegesen tisztított enzimet DEAE-cellulóz oszlopon kromatografálva nagy kromatográfiás felbontóképesség alkalmazásával DNS-függő ATPázok és egyszálú DNS-re specifikus DNáz elkülönülését tapasztaltuk. Egyidejűleg az ATP-függő DNáz aktivitás eltűnését regisztráltuk. Az elkülönített DNS-függő ATPázok és a DNáz újraegyesítésével az ATP-függő DNáz aktivitás helyreállítható volt (7). A DNáztól elkülönített DNS-függő ATPáz a duplex denaturálását katalizálta (8). Az eredmények, melyeket sematikusan a 2. ábra foglalja össze, arra utalnak, hogy az ATP-függő DNáz aktivitást több enzim kölcsönhatása hozza létre. Feltételezzük, hogy a rekombinációban a duplex széttekerését az egyszálú szakaszokhoz kapcsolódó letekerő ATPázok végzik, majd az ily módon keletkezett egyszálú DNS darabokat az ezekre specifikus nukleázok bontják.

Az ATP-függő DNáz aktivitást ATPáz és DNáz enzimek kölcsönhatásaként értelmezve számos, az exonukleáz V aktivitással kapcsolatos probléma válik érthetővé:

1. Az elkülöníthető ATPáz és DNáz funkció, melyet mások is leírtak (36), két enzim feltételezése esetén egyértelművé válik.

2. Az ATP-től függő DNáz DEAE-cellulóz kromatográfiás tisztítása során tapasztalt inaktiválódása (6, 23, 55, 56, 64) az ATPáz és DNáz teljes elkülönítésével, illetve ezen enzimek kölcsönhatásában feltehetően szerepet játszó celluláris DNS eltávolításával magyarázható. Érthetővé válik az is, hogy az elektroforetikusan homogén DNáznak (57) miért nincs ATP-től függő nukleáz aktivitása.

3. A csak natív DNS-en mérhető ATP-függő DNáz aktivitás mellett, mindig detektálható ATP-től független DNáz aktivitás is (6, 23). Ez utóbbi aktivitást a natív DNS egyszálú szakaszainak tulajdonítjuk. Exonukleáz V aktivitás csak olyan natív DNS-en mérhető, melynek egyszálú végei vannak. Zárt, kör-körös duplexen nem mérhető ATP-függő DNáz aktivitás (29).



3. ábra. Az általános rekombinációban résztvevő enzimek. Az egyes lépésekben feltételezett enzimek: 1. szupertekercs szerkezet megbontása — relaxáló enzim, 2. egy- és kétszálú bemetszések — endonukleázos hasítás, 3. letekeredés — DNS függő ATPáz, 4. széttekeredett szakaszok védelme — HDP, 5. komplementer egyszálú végek bázis párosodása — összekapcsolódó enzim, 6. nukleotid betoldás — polimeráz, 7. lánczárás — ligáz, 8. rekombináns szupertekercs kialakulása — gyrase

4. A denaturált DNS-en mások által is észlelt nagyfokú hidrolízis (29, 54, 56) annak következménye, hogy a DNáz valójában egyszálú DNS-re specifikus enzim.

A részreakciókra bontható ATP-függő DNáz ATP igényéért, azaz a natív DNS energia igényes széttekeréséért a letekerő ATPáz tehető felelőssé. Feltételezhető szerepénél fogva nem hagyható figyelmen kívül a rekombinációs mechanizmus tárgyalásakor sem. Az általános rekombináció 1. ábrán bemutatott sémáján a rekombinációs DNS szakaszok keletkezésére vonatkozó alternatív lépéseket, a letekerést és a nukleázos emésztést egyaránt valószínűnek tartjuk. Feltételezzük, hogy az ATP igényes részleges denaturálás az elsődleges reakció, és azt követi a letekert egyszálú DNS nukleázos emésztése. A rekombinációs sémának ez a pontosítása összhangban van a DNS-től függő ATPázok (2, 40), és az ATP-től függő DNázok (50, 64) duplex széttekerő hatásáról vallott felfogásával, a DNázok rekombinációban játszott szerepével, és kiküszöböli az ATP-függő DNázok multifunkcionális hatását.

A bemutatott séma az összetett rekombinációs folyamatnak csupán egy részlete, így korántsem teljes. Nem veszi számításba a folyamatban résztvevő egyéb fehérjéket. Ezek szerepét sematikusan a 3. ábra segítségével szemléltetjük. Feltételezhető, hogy a relaxáló enzim kör-körös DNS-sé „teríti ki" a szuperhelikális DNS-t. A relaxált DNS-en egyszálú bemetszéseket hoznak létre az endonukleázok, majd a törések mentén a duplex széttekeredik a letekerő ATPázok hatására. A HDP, melyet a 3. ábrán apró körök formájában tüntettünk fel, a komplementer szálakra tapadva sztérikusan gátolja a bázis párosodást a levált szakaszokkal, illetve védi az egyszálú végálló szakaszokat a nukleáz emésztésével szemben. A letekert szálakat egyszálú DNS-re specifikus DNáz bontja, majd heteroduplex régiók jönnek létre. A komplementer régiók összekapcsolásában feltételezhető a rec A protein szerepe. A felesleges nukleotidokat a DNáz távolítja el. A hiányzó nukleotidok pótlásáról a polimeráz gondoskodik, majd ligáz hatására zárul a rekombináns molekula. A relaxált duplexet végül a gyrase gombolyítja fel szuperhelikális struktúrává.

IRODALOM

1. Abdel-Monem, M., Hoffmann-Berling, H.: Eur. J. Biochem. **65**, 431 (1976).
2. Abdel-Monem, M., Chanal, M. C., Hoffmann-Berling, H.: Eur. J. Biochem. **79**, 33 (1977).
3. Abdel-Monem, M., Lauppe, H. F., Kartenbeck, J., Dürwald, H., Hoffmann-Berling, H.: J. Mol. Biol. **110**, 667 (1977).
4. Baltimore, N.: Nature (London) **226**, 1209 (1970).
5. Barbour, S., Clark, J. A.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **65**, 955 (1970).
6. Bánfalvi, G., Csuzi, S., Ohlbaum, A., Antoni, F.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **14**, 53 (1979).
7. Bánfalvi, G., Csuzi, S., Ohlbaum, A., Antoni, F.: Acta Biol. Acad. Sci. Hung. (Közlésre elfogadva).
8. Bánfalvi, G., Ohlbaum, A., Csuzi, S., Antoni, F.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. (Közlésre elfogadva.)
9. Beattie, K. L., Wiegand, R. C., Radding, C. M.: J. Mol. Biol. **116**, 783 (1977).

10. Bridges, B. A.: Nature **277,** 514 (1979).
11. Brooks, K., Clark, A. J.: Virol. **1,** 283 (1967).
12. Brutlag, D., Kornbebg, A.: J. Biol. Chem. **247,** 241 (1972).
13. Champoux, J. J.: Ann. Rev. Biochem. **47,** 449 (1978).
14. Chase, J. W., Richardson, C. C.: J. Biol. Chem. **249,** 4553 (1974).
15. Chestukhin, A. V., Shemyakin, M. F., Kalinina, N. A., Prozorov, A. A.: FEBS Lett. **24,** 121 (1972).
16. Clark, A. J.: Ann. Rev. Microbiol. **25,** 437 (1971).
17. Clark, A. J.: Ann. Rev. Genet. **7,** 67 (1973).
18. Crick, F. H. C.: Symp. Soc. Exp. Biol. **12,** 138 (1958).
19. Delins, H., Mantell, N. J., Alberts, B. M.: J. Mol. Biol. **67,** 341 (1972).
20. Denhardt, D. T., Iwaya, M., Larison, L. L.: Virology **49,** 486 (1972).
21. Denhardt, D. T.: Nature **280,** 196 (1979).
22. Deutscher, M. P., Kornberg, A.: J. Biol. Chem. **244,** 3029 (1969).
23. Doly, J., Anagnostopoulos, C.: Eur. J. Biochem. **71,** 309 (1976).
24. Drake, J. W.: The Molecular Basis of Mutation, Holden-Day, San Francisco, California (1970).
25. Eichler, D. C., Lehman, I. R.: J. Biol. Chem. **252,** 499 (1977).
26. Friedberg, E. C., Goldtwait, D. A.: Cold. Spring Harbour Samp. Quant. Biol. **33,** 271 (1968).
27. Friedman, E. A., Smith, H. O.: Nature New Biol. **241,** 54 (1973).
28. Gamow, G.: Nature **173,** 318 (1954).
29. Goldmark, P. J., Linn, S.: J. Biol. Chem. **247,** 1849 (1972).
30. Hatskiss, R. D.: Ann. Rev. Microbiol. **28,** 445 (1974).
31. Hertman, J., Luria, S. E.: J. Mol. Biol. **23, 117** (1967).
32. Holloway, B. W.: Bacteriol. Rev. **33,** 419 (1969).
33. Holliday, R.: Genet. Res. **5,** 282 (1964).
34. Howard-Flanders, P., Theirot, L.: Genetics **53,** 1137 (1966).
35. Jobgensen, S. E., Koerner, J. F.: J. Biol. Chem. **241,** 3090 (1966).
36. Karu, A. E., MacKay, V., Goldmark, P. J., Linn, S.: J. Biol. Chem. **248,** 4874 (1973).
37. Kelly, R. B., Atkinson, M. R., Huberman, J. A., Kornberg, A.: Nature **224,** 495 (1969).
38. Klett, R., Cerami, A., Reich, E.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **60,** 943 (1968).
39. Kornberg, A.: DNA Synthesis, W. H. Freeman and Company, San Francisco, California (1974).
40. Kornberg, A., Scott, J. F., Bertsch, L. L.: J. Biol. Chem. **253,** 3298 (1978).
41. Kornberg, T., Kornberg, A.: The enzymes, Vol. X. (ed. Boyer), Acad Press (1974).
42. Kushner, S. R., Nogaishi, H., Clark, A. J.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71,** 3593 (1974).
43. Lane, H. E. D., Denhardt, D. T.: J. Mol. Biol. **97,** 89 (1975).
44. Lehman, I. R.: J. Biol. Chem. **235,** 1479 (1960).
45. Lehman, I. R., Roussos, G. G., Pratt, E. A.: J. Biol. Chem. **237,** 819 (1962).
46. Lehman, I. R., Nussbaum, A. L.: J. Biol. Chem. **239,** 2628 (1964).
47. Lehman, I. R., Richardson, C. C.: J. Biol. Chem. **239,** 233 (1964).
48. Lehman, I. R.: The enzymes, Vol. X. (ed. Boyer), Acad. Press (1974).
49. Luria, S. E.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **33,** 256 (1947).
50. MacKay, V., Linn, S.: J. Biol. Chem. **251,** 3716 (1976).
51. Mahajan, S. K., Datta, A. R.: Mol. Gen. Genet. **169,** 67 (1979).
52. Meselson, M. S., Radding, C. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72,** 358 (1975).
53. Mizuchi, K., Gellert, M., Nash, H. A.: J. Mol. Biol. **121,** 375 (1978).
54. Nobrega, F. G., Rola, F. H., Pasetto-Nobrega, M., Oishi, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69,** 15 (1972).
55. Ohi, S., Sueora, N.: J. Biol. Chem. **248,** 7336 (1973).
56. Oishi, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **64,** 1292 (1969).
57. Palitti, F., Vellante, F., Cerio-Ventura, G., Fasella, P., Salerno, C.: Eur. J. Biochem. **97,** 147 (1979).
58. Richardson, C. C., Kobnberg, A.: J. Biol. Chem. **239,** 242 (1964).
59. Richardson, C. C., Lehman, I. R., Kornberg, A.: J. Biol. Chem. **239,** 251 (1964).
60. Sági J.: A biológia aktuális problémái **15,** 11 (1979).
61. Scott, J. F., Eisenberg, S., Bertsch, L. L., Kobnberg, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **74,** 193 (1977).
62. Setlow, P., Brutlag, D., Kornberg, A.: J. Biol. Chem. **247,** 224 (1972).
63. Setlow, P., Kornberg, A.: J. Biol. Chem. **247,** 232 (1972).
64. Shemyakin, M. F., Grepachevsky, A. A., Chestukhin, A.: Eur. J. Biochem. **98,** 417 (1979).

65. Sigal, N., Alberts, B.: J. Mol. Biol. **71,** 789 (1972).
66. Signer, E.: The Bacteriophage Lambda (ed. A. D. Hershey) p. 139, Cold Spring Harbour (1971).
67. Sironi, G.: Virology **37,** 163 (1969).
68. Smith, C. L., Kubo, M., Imamato, F.: Nature **275,** 420 (1978).
69. Temin, H. M., Mizutani, S.: Nature (London) **226,** 1211 (1970).
70. Unger, R. C., Clark, A. J.: J. Mol. Biol. **70,** 539 (1972).
71. Unger, R. C., Echols, H., Clark, A. J.: J. Mol. Biol. **70,** 531 (1972).
72. Van de Putte, P., Zwenk, H., Rorsch, A.: Mutation Res. **3,** 381 (1966).
73. Vovis, G., Buttin, G.: Biochim. Biophys. Acta **224,** 42 (1970).
74. Watson, J. D., Crick, F. H. C.: Nature **171,** 964 (1953).
75. Weinstock, G. H., Mc. Entee, K., Lehman, I. R.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **76,** 126 (1979).
76. Wright, M., Buttin, G., Hurwitz, J.: J. Biol. Chem. **246,** 6543 (1971).

A NITRÁT TÁPLÁLKOZÁSÉLETTANI JELENTŐSÉGE ZÖLDSÉGFÉLÉKBEN ÉS TERMÉKEIKBEN A METHEMOGLOBINÉMIA VESZÉLYE SZEMPONTJÁBÓL

KÁDAS LAJOS

Kereskedelmi és Vendéglátóipari Főiskola Élelmezéstudományi Tanszéke, Budapest

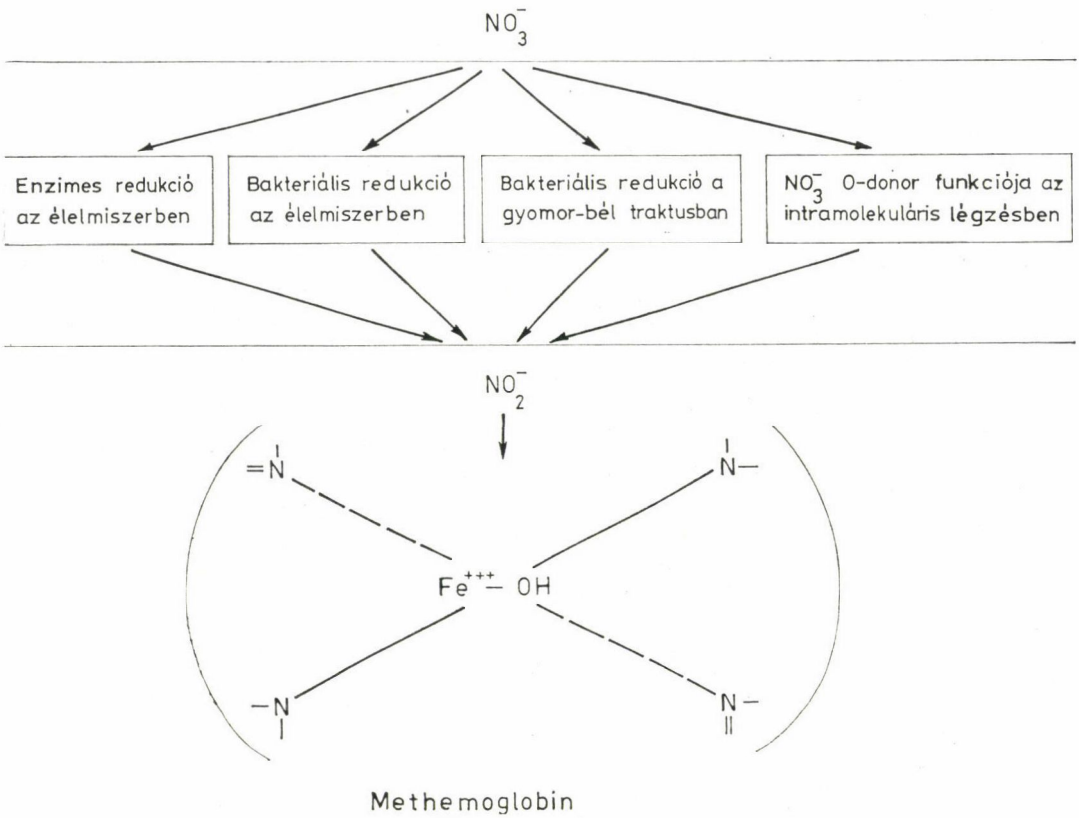
COMLY (11) immár klasszikus jelentőségű vizsgálatai óta jól ismert, hogy a súlyos kórképpel járó csecsemőkori methemoglobinémia (szinonim szóhasználattal hemiglobinémia) bekövetkezéséért legtöbbször az ivóvíz által a szervezetükbe jutó nitrát a felelős. Ezt követően egészen napjainkig számos külföldi (7, 19, 21, 23, 59) és hazai szerző (8, 13, 15, 46, 51, 62, 63, 64) számol be az ivóvíz okozta methemoglobinémiás megbetegedésről és közöl adatokat a morbiditásra vonatkozóan is. Ezek a közlemények kivétel nélkül csak a magas nitráttartalmú ivóvizet teszik felelőssé a betegség kialakulásáért.

A 60-as évektől kezdődően azonban egyre gyarapszik azoknak a publikációknak a száma, amelyek az egyes élelmianyagokban fellelhető magas nitrátkoncentrációk szerepét hangsúlyozzák és kimutathatóan ennek következtében megfigyelhető megbetegedésekről számolnak be (10, 24, 35, 37, 45, 54, 56, 57). E mellett — habár jelen közleménynek nem célja részletesen taglalni — említést érdemel a nitrát/nitrit szerepe az erősen karcinogén nitrozaminok képződésének veszélye szempontjából is, amelynek táplálkozásélettani vonatkozásai az utóbbi időszakban szintén egyre gyakrabban kerülnek a figyelem előterébe (16, 25, 34, 49, 60, 61).

A methemoglobinémia patogenezise és kórtünete

A methemoglobinémia patogenezisét és kórképét röviden a következőkben foglalhatjuk össze (2, 6, 12, 31).

A betegség kialakulásában nem közvetlenül a nitrát-ionnak, hanem a belőle redukcióval kialakuló nitritnek van döntő szerepe. A tápcsatornából történő felszívódást követően a nitrit-ion a hemoglobin két vegyértékű vasatomját három vegyértékű vassá alakítja át. Az így keletkező methemoglobin molekulához stabilis -OH csoport kapcsolódik (1. ábra), következésképpen az így inaktíválódó hemoglobin alkalmatlanná válik az légzési gázok reverzibilis megkötésére, vagyis a gázcsere lebonyolítására. Ennek következtében a szervezet oxigénellátása zavart szenved, hypoxia majd anoxia figyelhető meg, a cianozis tünetei jelentkeznek, végül fulladásos halál következhet be.



1. ábra. A methemoglobin kialakulása nitrátmérgezés következtében

A kórtünet kialakulása főként csecsemőkorban gyakori. Az embrió ugyanis életének harmadik hónapjától ún. foetális hemoglobint (hemoglobin-F) képez. A születés utáni időszakban is még ez a hemoglobin forma domináns és csupán a csecsemő 5—6 hónapos korára csökken az összhemoglobin 2—3%-ára. A foetális hemoglobinról a felnőtt hemoglobin szintézisre való átkapcsolás az első életév végére befejeződik, de mintegy 1% hemoglobin-F szint a későbbiekben is fiziológiás (22). Ez a hemoglobin forma sokkal könnyebben alakul át methemoglobinná, mint amely a felnőtt szervezetre jellemző. Így a betegség kialakulása — a tapasztalatok szerint is — főként az első életév betöltése előtt gyakori és közvetlenül a születést követő első időszakban kritikus.

A hemoglobin-F jelenlétének elsődleges fontosságú szerepén túlmenően azonban nem hagyható figyelmen kívül a csecsemőkori methemoglobinreduktáz enzimrendszer és egyéb, a redukcióban résztvevő enzim gyengébb aktivitása, a még csökkent vesefunkció, valamint a gyomor meglevő hipaciditása következtében az orálisan bekerülő baktériumok redukáló tevékenysége sem. Külö-

nösen veszélyt rejt magában a magas nitráttartalmú táplálék fogyasztása, ha a csecsemő egyidejűleg bélhurutban szenved. Ebben az esetben a bélbaktériumok felhúzódása a gyomor-bél traktus magasabb régióiba a nitrát-redukciót fokozva több nitrit felszívódását eredményezheti.

A nitrát előfordulása zöldségfélékben és feldolgozási termékeikben

A nitrát előfordulása — tág mennyiségi határok között — számos élelmiszerben kimutatható. Egyesek, így pl. a gabonafélék és feldolgozási termékeik, az édesipari termékek stb. nitráttartalma elhanyagolhatóan csekély (44, 66). Az élelmianyagok egy másik csoportjánál, amelyeknél a nitrát technológiai adalékanyag formájában kerül a termékbe (pl. a húsipari termékek, sajtok) annak mennyisége szigorú előírásokkal korlátok közé szorítható. Ezzel szemben a zöldség-főzelékfélékben, amelyekben a nitrát fontos szerepet játszik az intermedier anyagcsere folyamatokban, természetes körülmények között is jelentős mennyiségű nitrát halmozódhat fel (4, 5, 17, 18, 32, 36, 43).

Ennek alapján az egészségkárosodás veszélye szempontjából az élelmianyagok közül elsősorban a zöldség-főzelékfélék érdemelnek különös figyelmet. Ezt támasztják alá statisztikai adatok alapján, illetőleg konkrét felméréseken keresztül levont tapasztalatok is, melyek szerint a szervezetbe bejutó nitrát mennyiség mintegy 60—80%-a ezekből a termékekből származik (50, 67).

I. táblázat

Friss zöldségfélék nitráttartalma
(mg NO_3^-/kg)

	Richardson (52) (1907)	Jackson et al. (26) (1964)	Achtzehn, Hawat (1) (1969)	Ashton (3) (1970)	Maynard, Barker (42) (1972)	Kádas (28) (1976)
Cékla	2583	1197	2360	2809	2657	2249
Retek	1819	1492	1650	1859	1780	2287
Spenót	1910	524	1240	1538	2320	1335
Petrezselyem	—	1698	1390	1204	—	515
Karalábé	—	—	1290	1255	—	1324
Fejes saláta	1663	664	1200	1350	752	805
Zeller	1496	2786	680	1262	2364	401
Karfiol	—	53	360	1157	—	290
Kelkáposzta	—	1857	260	254	—	1028
Fejeskáposzta	201	315	240	—	730	452
Zöldbab	446	229	220	379	155	678
Főzőtök	—	299	—	—	—	1407
Sárgarépa	66	102	160	265	141	327
Uborka	—	—	150	160	—	102
Gomba	—	—	110	145	—	119
Zöldpaprika	—	—	140	—	—	139
Burgonya	77	104	40	52	186	83
Hagyma	—	16	20	249	62	—
Zöldborsó	51	47	10 alatt	10	—	20 alatt
Paradicsom	54	72	10 alatt	57	88	—

A friss zöldségfélék nitráttartalma több, átfogó felmérésre törekvő közlemény alapján jól dokumentált. Ezeket összefoglalóan az I. táblázat tartalmazza. Az adatokból kitűnik, hogy a különböző zöldségfélék nitráttartalma tág határok között változik, a kimutathatóság alatti értékektől a több nagyság-

II. táblázat

Zöldség alapú bébiételek nitráttartalma

Szerző	Irodalmi hivatkozás	A bébiétel jellege	mg NO_3^-/kg
KAMM et al.(1965)	(27)	spenót	1078—1675
		cékla	636—2174
		vajbab	322—570
		tök	44—411
		kerti zöldségek	84—274
		zöldbab	71—314
		sárgarépa	66—167
		vegyes zöldség	93—106
SIMON et al. (1965)	(55)	spenót	82—1210
		saláta	260—320
BOHM (1966)	(9)	spenót	88—1460
PHILLIPS (1968)	(47)	spenót	795
PHILLIPS (1969)	(48)	cékla	517
		vajbab	396
		spenót	287
		kerti zöldségek	244
		zöldség tojással és hússal	60
WESTCOTT (1971)	(65)	spenót	248—250
		sárgarépa	85
LIEDTKE és MELOAN (1976)	(39)	cékla	2134
		tök	950
		spenót	517
		kerti zöldség	225
		zöldbab	181
		sárgarépa	66
		borsó	62
		édes burgonya	57
		vegyes zöldség	53
KÁDAS (1977)	(29)	spenót marhahúspéppel	990
		spenót májpéppel	959
		tejes spenótpüré	573
		burgonyás spenótpüré	558
		vegyes zöldségpüré hússal	350
		sárgarépapüré marhahúspéppel	318
		sárgarépapüré	311
		zöldbabpüré hússal	231
		tejes sütőtökpüré	226
		vegyes zöldségpüré tejjel	222
		sütőtökpüré	217
		zöldbabpüré tejjel	166
		tejes sárgarépapüré	126
		zöldborsópüré marhahússal	102
		zöldborsópüré májpéppel	101
		zöldborsópüré	79

renddel nagyobb 2000 mg NO_3^-/kg-ot meghaladó értékekig. A különböző szerzők azonos zöldségfélére közölt adatai közti különbségek az alkalmazott meghatározási eljárás, a fajta, az éghajlati viszonyok, az alkalmazott agrotechnika és számos más körülményben nyilvánvalóan meglevő különbözőségek alapján jól értelmezhető.

Látható, hogy a zöldségfélék különböző csoportjainak nitráttartalmára vonatkozóan jellemző szabályszerűséget nem lehet megállapítani. A botanikailag hasonló, illetve közel rokon fajok nitrátfelhalmozása jelentős eltéréseket mutathat. Különös figyelmet érdemel azonban az, hogy olyan zöldségfélék is (spenót, fejes saláta, karalábé, petrezselyemgyökér stb.), amelyeket csecsemők táplálására néhány hónapos kortól kifejezetten ajánlanak (68), a magas nitráttartalmúak közé sorolhatók.

A zöldség alapú bébiételek nitráttartalmára vonatkozóan szintén gazdag irodalmi utalás található. A II. táblázat adatainak alapján ezek az értékek jelentős eltéréseket mutatnak, azonos jellegű termék esetében is ugyanazon szerző más-más közleménye ezt meggyőzően mutatja. Ez a friss zöldségfélék nitráttartalmára vonatkozóan a fentiekben elmondottak alapján, az egyes bébiétel konzervek mennyiségileg eltérő anyagösszetétel figyelembevételével magyarázható.

Általánosságban megállapítható azonban, hogy azok a termékek tartalmaznak jelentős mennyiségű nitrátot, amelyek zöldségalapja friss állapotában is magas nitráttartalommal rendelkezik.

Hasonló jellegű és hasonlóan szoros koreláció tapasztalható a friss és a feldolgozott termékek nitráttartalma között, a gyorsfagyasztott és a hőkezeléssel konzervált tartósított termékek esetében is. Hazai felmérések alapján ezt a

III. táblázat

Gyorsfagyasztott és hőkezeléssel konzervált zöldségfélék nitráttartalma (30)
(mg NO_3^-/kilogramm)

Zöldségféle	Gyorsfagyasztott	Konzervált
Cékla	1243,7	—
Spenót	833,0	736,4
Zöldbab	602,9	411,9
Főzőtök	595,5	925,4
Sárgarépa	308,3	240,3
Karfiol	258,4	178,2
Kelbimbó	137,8	—
Uborka	102,8	—
Petrezselyemgyökér	140,4	—
Zöldpaprika	78,1	—
Sóska	—	230,9
Spárga	—	96,0
Gomba	—	38,1
Zöldborsó	20,0 alatt	20,0 alatt
Paradicsom	20,0 alatt	—

III. sz. táblázat szemlélteti (30), és ezt a tendenciát támasztják alá irodalmi adatok is (41, 58). Kitűnik, hogy a tartósított natúr zöldségfélék nitráttartalma minden esetben alacsonyabb, mint a friss zöldségféléké, ami a gyártástechnológiájuk során végzett műveletek (mosás, blansírozás) nitrátkoncentrációt csökkentő hatásának eredménye.

A gyártástechnológiák különbözősége, illetőleg a termék és a felöntőlé között kialakuló egyensúlyi megoszlás eredményezi azt is, hogy a két termékcsoport viszonylatában — egy kivétellel — a hőkezelt konzervek nitráttartalma alacsonyabb. Látható azonban, hogy a nitráthalmozó zöldségfélék feldolgozott termékei a mennyiségi csökkenés ellenére jelentős nitráttartalommal rendelkeznek.

A betegség kialakulásának lehetősége és a prevenció szükségessége

A teljes hemoglobin mennyiség mintegy 1%-a fiziológiás körülmények között is mint methemoglobin van jelen a vérben (38). 5%-os methemoglobin szint alatt még csecsemőkön sem mutatkoznak klinikai szimptomák, e fölötti mennyiségnél viszont már enyhébb cianozis mutatkozik (33). Magasabb értékeknél a tünetek egyre súlyosbodnak, és 70%-os értéket meghaladva fulladásos halál következhet be (40).

GREENBERG et. al. (20) tisztázták a methemoglobin képződés kémiai folyamatának ekvivalencia viszonyait, mely szerint 46 mikrogramm nitrit 30,4 mg hemoglobint alakít át methemoglobinná. Ennek figyelembevételével PHILLIPS (47) alapján a különböző fokú methemoglobinémia kialakulásához szükséges nitrátmennyiségeket egy éves és felnőtt életkorra vonatkoztatva a IV. táblázat mutatja. (Szükség megjegyezni, hogy a feltüntetett értékek pusztán elméleti számítások eredményei, így mindkét irányban lehetségesek eltérések. Anémia esetében — mivel az elsődleges tényező a jelenlevő oxigénszállító pigmentek mennyisége — alacsonyabb nitrátkoncentrációk elegendők,

IV. táblázat

Különböző fokú methemoglobinémia kialakulásához szükséges nitrát mennyisége egyéves és felnőtt korban

[PHILLIPS (47) alapján]

Kor (év)	Testsúly (kg)	Teljes vér térfogat (ml)	Methemoglobin (%)	Szükséges NO_3^- mennyiség, amely előidézi (mg)
1	10,2	900	5	15,58
1	10,2	900	30	93,56
1	10,2	900	70	216,05
Felnőtt	67	6000	5	103,85
Felnőtt	67	6000	30	575,19
Felnőtt	67	6000	70	1455,65

másfelől a számítás csupán a methemoglobin képződés folyamatát veszi figyelembe, a methemoglobin redukciót nem.)

A táblázat adatait és a fentiekben feltüntetett friss és tartósított zöldségfélék, valamint a bébiételek nitráttartalmát összevetve, továbbá azt szem előtt tartva, hogy az egyes zöldségfélékből (spenót, karalábé, fejes saláta stb.) a csecsemők táplálásához az ajánlott mennyiség 100—180 g/nap, megállapítható, hogy megvan a reális lehetősége annak, hogy a csecsemők szervezetébe toxikus mennyiségű nitrát kerüljön. Még fokozottabban mutatkozik ez, ha tekintetbe vesszük, hogy a közölt értékek átlagértékek és a hivatkozott irodalmakban az egyedi mintákra feltüntetett szélső értékek tanúsága szerint gyakran az átlagnál jóval magasabb nitrátkoncentrációk is megfigyelhetők.

A prevenció lehetősége alapvetően a táplálékok nitráttartalmának csökkentésében jelölhető meg. Az utóbbi években a nitrát/nitrit adalékanyagként történő alkalmazását több országban betiltották, és a jövőben ez szélesebb körben is várható (14).

A zöldségfélék esetében a nitráttartalom csökkentése megfelelő fajtakiválasztással, a felhasznált nitrát műtrágya-mennyiségének ésszerű csökkentésével, ellenőrzött agrotechnikával, illetőleg a feldolgozott termékek esetében kellően megválasztott technológiák alkalmazásával megvalósíthatónak látszik.

A WHO érvényben levő előírása a huzamosabb időn át az egészségkárosodás veszélye nélkül felvehető napi nitrátmennyiséget 0—0,5 mg $NaNO_3$/testsúly kg értékben határozza meg, azzal a megszorítással, hogy hat hónaposnál fiatalabb csecsemők és emésztőrendszeri megbetegedésben szenvedő kisgyermekek számára nem adható meg biztosan ártalmatlan felvehető nitrátmennyiség (69).

Ennek értelmében több országban az elsősorban veszélyeztetett csecsemők részére gyártott táplálékok nitráttartalmát szigorú előírásokkal szabályozzák. Így az NDK-ban friss zöldségfélék esetében 600 mg/kg, a zöldségkészítményekre vonatkozóan 300 mg/kg nitrát értékben határozták meg az engedélyezett mennyiséget (53). Hazánkban egészen a legutóbbi időkig az élelmiszerek nitráttartalmára vonatkozóan nem volt előírás. A közelmúltban látott napvilágot az a rendelet, amely a csecsemők és kisgyermekek számára készülő főzelékkonzervek esetében a felső határértékeket 400 mg/kg nitrát mennyiségben jelöli meg (70).

A methemoglobinémia növekvő gyakorisága felhívja a figyelmet a megelőzés fontosságára. Ennek egyik lehetőségét jelenti, ha a jövőben nagyobb figyelmet szentelünk a táplálékok nitráttartalmának.

IRODALOM

1. ACHTZEHN, M. K., HAWAT, H.: Die Nahrung **13**, p. 667 (1969).
2. ACHTEHN, M. K., HAWAT, H.: Die Nahrung **14**, p. 383 (1970).
3. ASHTON, M. R.: The ossurence of nitrates in food. B. F. M. I. R. A. No. **7**, (1970).
4. BARKER, A. V., MAYNARD, D. N.: Com. in Soil Sci. and Pl. Analysis **2**, p. 471 (1971).
5. BARKER, A. V., PECH, N. H., MACDONALD, G. E.: Agronomy Journal **63**, p. 126 (1971).
6. BÁLINT P. szerk.: Klinikai laboratóriumi diagnosztika. Medicina Kiadó, Budapest (1961).
7. BETKE, K.: Münch. med. Wschr. **87**, p. 909 (1962).
8. BODÓ T.: Orv. Hetilap **84**, p. 1213 (1953).
9. BOHM, E.: Dtsch. Lebensmitt.-Rdsch. **62**, p. 293 (1966).
10. BÜSING, H. H.: Med. Klinik. **56**, p. 177 (1961).
11. COMLY, H. H.: J. Amer. Med. Assoc. **129**, p. 112 (1945).
12. DARVAS I.: Egészségtudomány **18**, p. 93 (1974).
13. ENGERT I., CSŰRÖS Cs., RODLER I.: Egészségtudomány **13**, p. 361 (1969).
14. FARKAS J.: Élelmezési Ipar **34**, p. 87 (1980).
15. FARKAS T.: Gyermekgyógyászat **9**, p. 284 (1958).
16. FOREMAN, J. K.: N-Nitrosamines as potential food carcinogenes. Proceedings of Meat Research Workers, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada (1972).
17. FRENYÓ V.: Természettudományi Közlöny **11**, p. 558 (1967).
18. FRENYÓ V., MIHÁLYFI J. P.: Acta Bot. Acad. Sci. Hung. **16**, p. 33 (1970).
19. GRAHNEIS, H.: Z. ges. Hyg. **8**, p. 89 (1962).
20. GREENBERG, L. A., LESTEB, D., HOGGARD, H. W.: J. Biol. Chem. **151**, p. 665 (1943).
21. GROSS, E.: Arch. Hyg. **148**, p. 28 (1964).
22. HOLLÁN Zs.: Haemoglobinok és haemoglobinopathiák. Akadémiai Kiadó, Budapest (1972).
23. HORN, H.: Z. ges. Hyg. **8**, p. 8 (1962).
24. HÖLSCHER, P. M., NATZSCHKA, J.: Dtsch. med. Wschr. **89**, p. 1751 (1964).
25. INCZE K., MIHÁLYI Gy.: Húsipar **22**, p. 188. (1973).
26. JACKSON, W. A., STEEL, J. S., BOSWELL, V. R.: Proceed. Amer. Soc. hort. Sci. **90**, p. 349 (1967).
27. KAMM, L., MCKEOWN, G. G., SMITH, M. D.: J. of the A. O. A. C. **48**, p. 892 (1965).
28. KÁDAS L.: Élelmiszervizsgálati Közlem. **22**, p. 347 (1976).
29. KÁDAS L.: Gyermekgyógyászat **28**, p. 211 (1977).
30. KÁDAS L.: Élelmiszervizsgálati Közlem. (Közlés alatt.)
31. KESZTYŰS L., Sós J.: A kórélettan tankönyve. Medicina Kiadó, Budapest (1963).
32. KISS A., S., POZSÁR B.: IV. Mezőgazdaság kemizálása. Ankét, Keszthely p. 70 (1974).
33. KNOTECK, Z., SCHMIDT, P.: Pediatrics **34**, p. 68 (1964).
34. KÖRMENDY L.: Húsipar **22**, p. 185 (1973).
35. KRIENKE, E. G.: Berl. Med. **14**, p. 587 (1963).
36. KRUGER, N. S.: Food Technol. in Austr. **25**, p. 12 (1973).
37. KUBLER, W.: Z. Kinderheilk. **81**, p. 405 (1958).
38. LANE, R. F.: Brit. J. Ind. Med. **9**, p. 245 (1952).
39. LIEDTKE, M. A., MELOAN, C. E.: J. Agric. Food Chem. **24**, p. 410 (1976).
40. LOCKET, S.: Clinical Toxicology, H. Klimpton Ed. London (1957).
41. MARI T., BINDER J.: Hűtőipar **25**, p. 7 (1978).
42. MAYNARD, D. N., BARKER, A. V.: Hort Science **7**, p. 224 (1972).
43. MAYNARD, D. N., BARKER, A. V., MINOTTI, P. L., PECK, N. H.: Nitrate accumulation in vegetables. Advances in agronomy. Academic Press. New York (1976).
44. MCNAMARA, A. S., KLEPPER, L. A., HAGEMAN, R. H.: J. Agric Food Chem. **19**, p. 540 (1971).
45. ORGERON, J. D., MARTIN, J. D., CARAWAY, C. T., MARTINE, R. M., HAUSER, G. H.: U. S. Publ. Health. Rep. **72**, p. 189 (1957).
46. ÖRKÉNYI R.: Orv. Hetilap **115**, p. 8 (1974).
47. PHILLIPS, W. E. J.: J. Agric. Food Chem. **16**, p. 88 (1968).
48. PHILLIPS ,W. E. J.: Can. Inst. Food Technol. **2**, p. 160 (1969).
49. PILNIK, W., VOS, L.: Voedingsmidd. Technol. **4**, p. 60 (1973).
50. RAUTU, R., UNGUREANU, A., SPORN, A.: Igiena **21**, p. 461 (1972).
51. RÉVÉSZ K.: Gyermekgyógyászat **3**, p. 15. (1952).
52. RICHARDSON, W. D.: J. Amer. Chem. Soc. **29**, p. 1757 (1907).
53. SCHÜTT, J.: Die Nahrung **21**, p. 61 (1977).
54. SIMON, C., MANZKE, H., KAY, H., MROWETZ, G.: Z. Kinderheilk. **91**, p. 124 (1964).
55. SIMON, C., KAY, H., MROWETZ, G.: Dtsch. Lebensmitt.-Rdsch. **61**, p. 75 (1965).
56. SINIOS, A.: Münch. med. Wschr. **106**, p. 1180 (1964).

57. Sinios, A., Wodsak, W.: Dtsch. med. Wschr. **90,** p. 856. (1965).
58. Sohier, Y., Poumarat, A. M., Berges, P.: Ann. Nutr. Alim. **30,** p. 689 (1976).
59. Sohchon, F.: Dtsch. med. Wschr. **81,** p. 684 (1956).
60. Swann, P. F.: J. Sci. Food Agric. **26,** p. 1761 (1975).
61. Swann, P. F.: Proc. Roy. Soc. Med. **70**, p. 113 (1977).
62. Takács S., Vigh E.: Egészségtudomány **9,** p. 342 (1965).
63. Takács S., Gyurcsik A.: Egészségtudomány **14,** p. 31 (1970).
64. Takács S., Kuncsik K., Enyedi T., Stecz J., Borsi E.: Egészségtudomány **22,** p. 239 (1978).
65. Westcott, C. C.: Food Technology **25,** p. 49 (1971).
66. Westcott, C., Pearlman, F.: Beckman Instruments. Inc. (sokszorosított anyag)
67. White, J. W. jr.: J. Agric. Food Chem. **23,** p. 886 (1975).
68. Zoltán Zs.: Mit egyen a gyerek? Medicina Kiadó, Budapest (1972).
69. WHO Techn. Rep. Ser. No. 309 (1965).
70. 4/1978. (VI. 25.) Eü. M. számú rendelet „Az élelmiszerek ártalmas vegyi szennyeződéseinek elhárításáról".

A PROXIMÁLIS TUBULUS MŰKÖDÉSE*

KÖVÉR GYÖRGY

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Élettani Intézet, Budapest

Az utóbbi évtizedben a biokémia és a fiziológia elméleti és módszertani fejlődése lehetővé tette a veseműködést vizsgálók számára, hogy jobban betekinthessenek a proximális tubulus működés epiteliális „black box"-ába. A legfontosabb felfedezések, amik ezt biztosították:

1. a plazmamembrán struktúrák folyékony mozaik modelljének a kifejlesztése [SINGER és NICOLSON (36)].
2. a citoszkeletonnak, mint a membrán funkciók regulátorának a tisztázása [NICOLSON és POSTE (27)].
3. annak a tannak a kiteljesedése, hogy az elektrokémiai potenciál gradiens anélkül, hogy más metabolikus intermedierekhez lenne kapcsolva, képes a hajtóerőt képviselni a transzport rendszerekben, pl. a Na^+-gradiens [CRANE (8)].
4. a membrán felszíneken zajló renalis transzportfolyamatok tanulmányozását lehetővé tevő finom elektrofiziológiai mérőmódszerek kialakítása [GOTTSCHALK és LASSITER (12)].
5. izolált tubulus szegmentumok in vitro perfúziójának kidolgozása.
6. hámsejt organellumok biokémiai szeparálása, különösen a tiszta membrán frakciók előállítása a luminális (brushborder) és az antiluminális (bazolaterális) membrán felszínekről [HEIDRICH és mtsai (13)].

Ezeknek az eredményeknek a fényében lehetőségünk nyílik arra, hogy jobban megértsük a proximális tubulusban zajló transzport folyamatokat, különösen a tubulushám membrán funkcióinak molekuláris aspektusai lettek világosabbak.

1. A proximális tubulus morfológiája

A proximális tubulus a Bowman kapszula parietális epitéliumának folytatása, amelyik néhány mm hosszú kanyarulatos csövecskét képez, amit *pars convoluta*-nak hívunk (1. ábra). Mielőtt a tubulus a kortikális részből a mélybe, a medullába jutna, a csövecske kiegyenesedik, ezt a részt *pars recta*-nak nevezzük.

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

1.1. A proximális tubulushám felépítése

1.1.1. Morfológiai aszimmetria

A proximális tubulus egy sejtréteggel körülvett csatornácska, amelynek sejtjei a pars convoluta-ban és a pars recta-ban morfológiailag jelentősen különböznek (2. ábra).

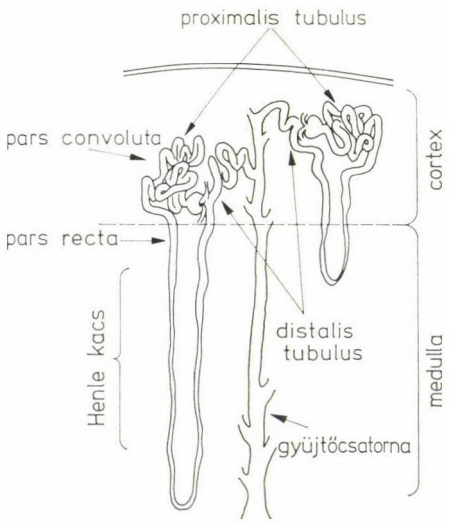
Mi most figyelmünket csak a pars convoluta-ra fordítjuk, amelyik egy homogén hengeres sejtekből álló egysejtrétegű epitélnek tekinthető, ami egy bazális membránon fekszik. A luminális vagy brush border membrán (BBM) a vizelettel, míg a bazális antiluminális membrán (ALM) a sejteket körülvevő intersticiális folyadékkal érintkezik (3., 4. ábra).

A tubulus sejtek elektronmikroszkópos felvételén már ránézésre megállapítható az aszimmetria a bolyhos felszínű luminális membrán (5. ábra) és a relatíve sima felszínű bazális membrán között.

Lényeges, hogy megértsük ennek az aszimmetriának a szabályozását, mivel ez az a tulajdonság, amelyik megszabja minden epitélnek a funkcionális kapacitását.

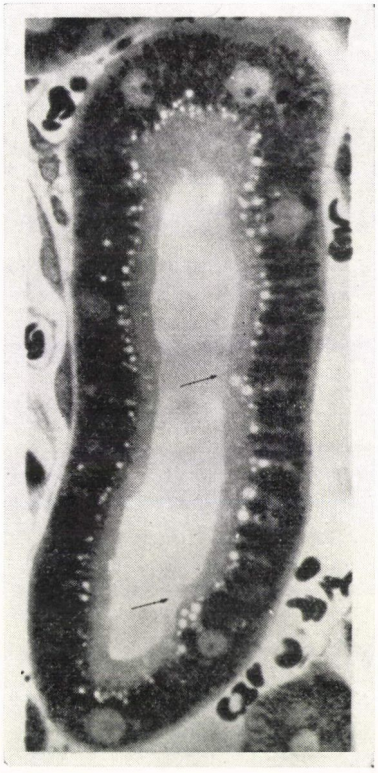
Egy jellegzetes proximális tubulussejt kb. 15 μm magas és kb. 20 μm átmérőjű. A proximális tubulusban kb. $9{,}2 \times 10^5$ mikroboholy van 1 mm hosszon, ami durván számolva 2000—6000 boholynak felel meg sejtenként. Az átlag nagysága a mikrovillusnak 2,8 μm és átmérője kb. 0,5—1,0 μm. A mikroboholyhok a sejtfelszínt a pars convoluta-ban mintegy 36-szorosra, a pars recta-ban kb. 20-szorosra növelik.

A bazális begyűrődések nem szabályosak és nem tartalmaznak határozott struktúrát. Mint a 6. ábrán látható, két tulajdonság szembeötlő, az egyik az,

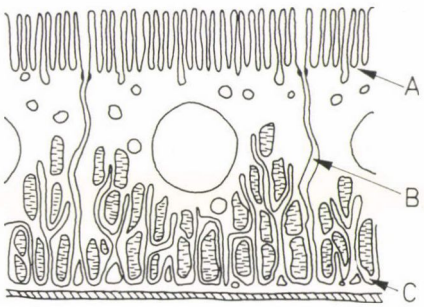


1. ábra. Kortikális és juxtamedulláris nefronok sematikus vázlata

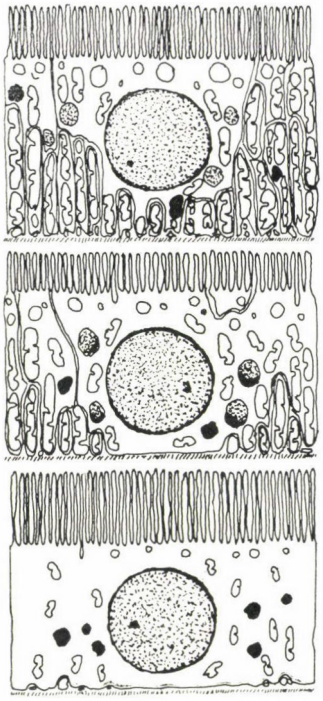
hogy a bazális begyűrődések között interdigitális összekapcsolódások lehetségesek, a másik az, hogy a mitokondriumok az antiluminális plazmamembrán közelében helyezkednek el. Ez azt sugallja, hogy az ALM-ben a transzportfolyamatok az oxidatív foszforilációs folyamatok függvényei.



2. ábra. A proximális tubulus fénymikroszkópos képe



3. ábra. A proximális tubulus sejt sematikus képe.A = brush border (kefeszegély) membrán (BBM), B = intercellularis rés, C = antiluminalis membrán (ALM)



4. ábra. A proximális tubulus sejt sematikus váza. Felső: pars convoluta sejtje. Alsó: pars recta sejtje

Jellegzetes a proximális tubulus sejtjeinek az illeszkedése, a sejtek között intercelluláris rések vannak (7. ábra), amelyeket a luminális felszínen a *tight junction*ok zárnak le. A tight junction-ok a sejt foszfolipid membránjának az elágazásai, ami fagyasztva-töréses vizsgálatokkal csak igen laza kapcsolatnak adódik [KÜHN és REALE (23)].

Az anyagok transzportja a tubuláris epitélen keresztül történhet a sejten keresztül vagy a tight-junction-on át (8. ábra), ami lehet a sejten átmenő transzportoknak a rövidrezárása.

Szemben a bazális begyűrődésekkel a mikrobolyhok (vagy kefeszegély bolyhai) határozott citoszkeleton struktúrát tartalmaznak. A BBM teljes fehérje tartalmának mintegy 12%-át képezik a kontraktilis fehérjék [BOOTH és KENNY (6)].

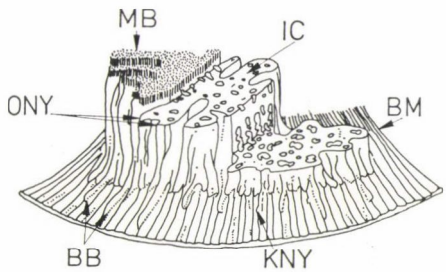
LOOR (24) ábrája mutatja a sematikus vázát a kefeszegély membránnak (9. ábra). A kontraktilis citoszkeleton funkciója még nem teljesen tisztázott, azonban az világos, hogy minden olyan folyamat, amelyik a membrán felszínt regulálja jelentősen módosíthatja az epiteliális transzportaktivitást.

A vizelet képződés a glomerulus szűrőmembránján (10. ábra) az effektív filtrációs nyomás hatására, a víznek és az oldott anyagoknak az ultrafiltráció-

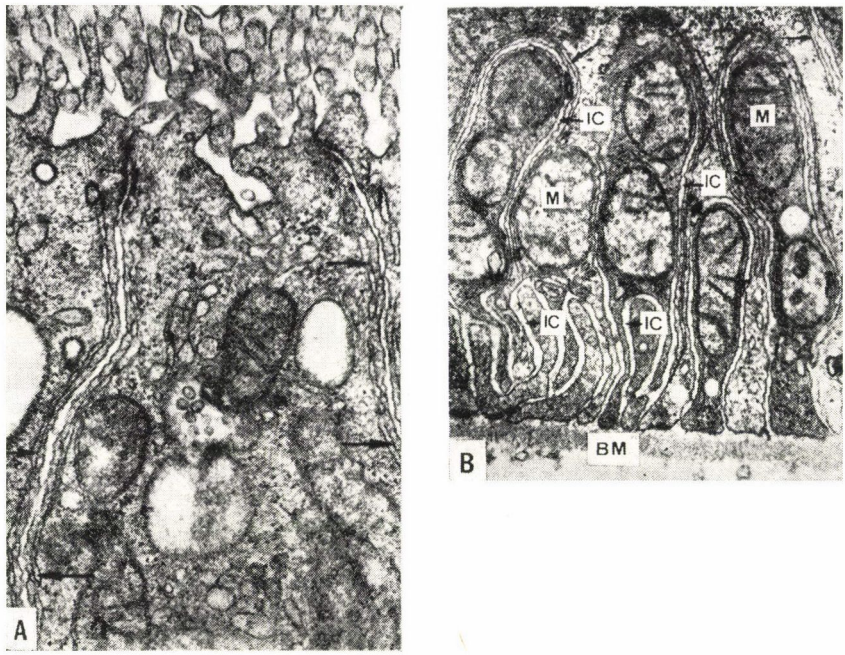


5. ábra. A proximális tubulus sejt elektronmikroszkópos képe. TL = tubulus lumen, V = vezikulák, G = Golgi apparátus, M = mitokondriumok, L = lizoszóma, IC = intercelluláris rés (nagyítás kb. 15 000×)

jával kezdődik. A filtrátum a Bowman tokban gyűlik össze. Az ultrafiltrált részecskék nagysága a glomerulus szűrőmembrán pórus- és töltésnagyságától függ. Emberi nefronban megközelítőleg 1,5 nl ultrafiltrátum képződik másod-



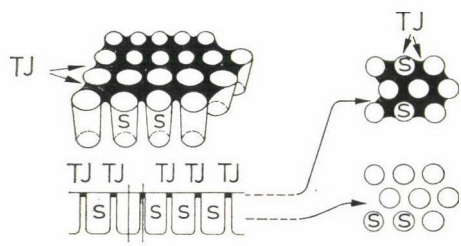
6. ábra. A proximális tubulus sejt sematikus váza. MB = mikro-bolyhok, IC = intracelluláris rész, ONY = oldalnyúlványok, KNY = kesztyű ujjszerű nyúlványok, BB = bazális begyűrődések, BM = bazális membrán



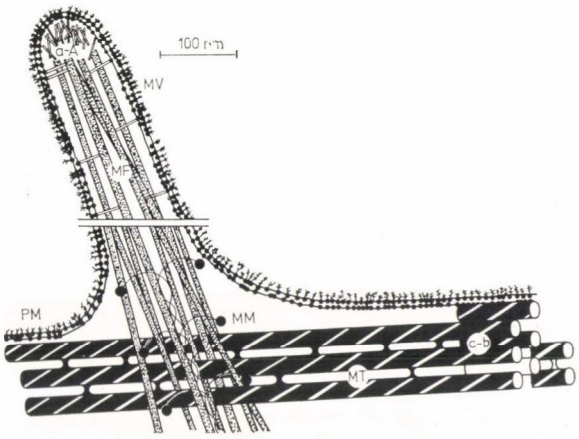
7. ábra. Tubulus sejtek elektronmikroszkópos képe (jelölés, mint előbb)

percenként. A filtrátumban a plazmáéval közel azonos koncentrációban találjuk a glukozt, aminosavakat, az ionokat és változó mennyiségben egy sor kismolekulájú fehérjét.

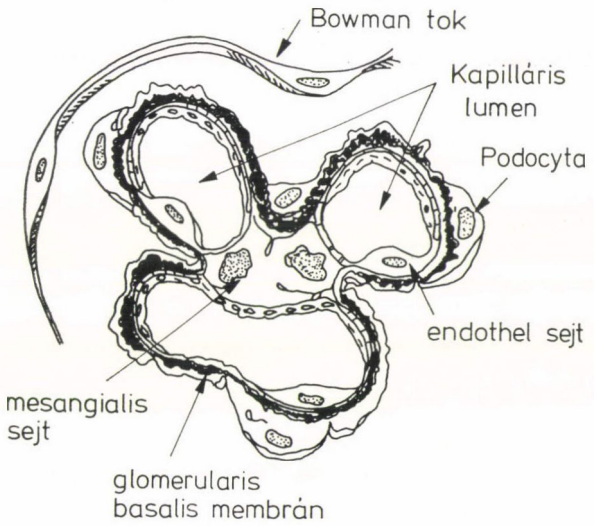
A filtrátum a Bowman kapszulát elhagyva egysejtréteggel körülvett tubuláris rendszerbe jut, ahol egyes anyagok és a víz visszaszívódnak és más anyagok aktív szekretoros mechanizmusokkal a vérből a tubulus lumenébe kerülnek. Így bidirekcionális molekuláris transzport zajlik, a vér- és a tubulusban levő vizelet között, a nefron egész hosszában.



8. ábra. A tubulus sejtek egymáshoz kapcsolódásának vázlata. TJ = tight-junction, S = tubulus sejt



9. ábra A kefeszegély membrán felépítésének sematikus váza (Loor 24). MV = mikrovillus, MT = mikrotubulus, MF = mikrofilamentum, MM = miozin filamentum, PM = plazmamembrán, α-A = α-aktinin, c-b = kereszthidak



10. ábra. A glomeruláris szűrűmembrán felépítése

1.1.2. Biokémiai aszimmetria

A proximális tubulusban bizonyos membrán-kötött enzimek az egyik felszíni membránhoz vannak kötve, mások az ellentétes membránban találhatók.

Az I. táblázatban azokat az enzimeket foglaljuk össze, amelyekről jelenlegi ismereteink szerint tudjuk hová tartoznak. A membránfehérjék térbeli elhelyezkedése az, hogy a tubulussejt egyik vagy másik felszínén található, az

I. táblázat

A tubulussejt membránjaiban található enzimek

Kefeszegély membrán (BBM)	*Antiluminális membrán (ALM)*
Diszacharidázok	Na^+-K^+-dependens- ATP-áz
5'-Nukleotidáz	Ca^{++}-Mg^{++}-dependens ATP-áz
Aminopeptidáz	Adenil-cikláz (PTH stimulált)
Alkalikus foszfatáz	
cAMP-dependens Protein-kináz	
Karboanhidráz	
HCO_3^- dependens ATP-áz	
Foszfodieszteráz	
Neutrális endopeptidáz	

epiteliális funkciók fontos meghatározója. Lehetséges, hogy a membránfehérjék mozgását a luminális membránban a citoszkeleton szabályozza.

A proximális tubulussejtben a membrán aszimmetria három formában mutatkozik:

1. transzcelluláris aszimmetria
2. transzmembranális aszimmetria
3. valószínűleg aszimmetria a síkban is.

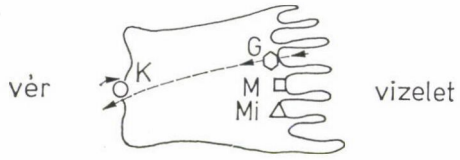
A tubuláris epitél jó példája annak a szövetnek, ahol az intramembranális fehérje mozgások korlátozása uralja a sejtfelszínt. A tubulus sejtben a membránfehérje komponensek ilyen aszimmetrikus eloszlása, amelyet a membránfehérjék mozgását korlátozó erők determinálnak, teszi lehetővé és még hatékonyabbá az intersticiális folyadék és a tubulusban levő vizelet között zajló transzportfolyamatokat.

2. Tubuláris transzportfolyamatok

2.1. Transzport aszimmetria

2.1.1. Cukortranszport

Kompetitív gátlásos vizsgálatok 4 különböző cukortranszport-rendszert mutatnak a proximális tubulusban [SILVERMAN (34)], 3 ezek közül a kefeszegélyben lokalizálódik (11. ábra).



11. ábra. A cukortranszport sematikus váza. G = glukóz, MI = mioinozit-transzporter, M = mannóz-transzporter, K = közös-transzporter

1. A G vagy glukóz transzporter a D-glukóz, D-galaktoz, D-fruktóz szállításában vesz részt.

2. Az M vagy mannóz-transzporter, amelyik a D-fruktózt is transzportálja.

3. Egy speciális rendszer, amelyik a mioinozit (Mi) szállításában vesz részt.

Az antiluminális felszínen csak egy transzporterrendszer működik (az ábrán K), amelyik a D-glükóz és tíz más szubsztrát (D-galaktóz, D-mannóz, D-fruktóz stb.) transzportját végzi.

Fiziológiás körülmények között (amikor a plazma glukóz koncentrációja 5 mM/l) gyakorlatilag minden glukóz visszaszívódik a filtrátumból a proximális tubuláris epitélen. A teljes felszívódás ideje kb. 9 sec és három megkülönböztethető transzportfolyamatot foglal magában:

1. a kefeszegélyen át való transzportot,

2. az intracelluláris részen át történő diffúziót,

3. a transzportot a bazális vagy laterális felszínen levő transzporter segítségével.

Ezen visszaszívódási folyamat során a glukóz szénlánca nem változik (nincs lebomlás).

A D-glukóz visszaszívása a proximális tubulusban koncentráció gradiens ellen történik, és így per definitionem aktív transzport.

A transzport a kefeszegélyen keresztül — a vizeletből a sejtbe — elektrogén, mivel az a Na^+-kotranszportját igényli anélkül, hogy azt az anion vándorlása vagy egy másik kation ellenirányú mozgása kísérné, Beck és Sactor (4), Turner és Silverman (40).

Legújabb elképzelés szerint a luminális transzmembranális potenciál szabályozná a BBM-en keresztül a glukóz-Na^+-carrier komplex transzlokációját [Kinne (16)]. Ez azt jelenti, hogy a transzmembranális luminális membrán potenciálváltozásai módosítják a glukóz transzportot. A netto luminális membrán potenciál értéke (—70 mV) komplex folyamat eredménye, amelynek kialakításában részt vesznek az intersticiális és citoplazmatikus töltött részecskék, valamint azok konduktanciája a BBM és ALM membránokon keresztül.

Minden elektrogén folyamat hozzájárul a netto intra- és extracelluláris potenciálkülönbség kialakításához. Ezek a folyamatok magában foglalják a H^+-ion kipumpálását a sejtből a lumenbe, az organikus — (laktát, szukcinát) és anorganikus — (Cl^- és HCO_3^-) ionok visszaszívódását, valamint a Na^+ és a kapcsolt anyagok (cukor, aminosavak) transzportját.

A Na^+ eltávolítása a citoplazmából a bazális felszínen a Na^+—K^+-dependens ATP-áz által elektrokémiai potenciál gradienst hoz létre, ami a luminális felszínen a Na^+ beáramlásának kedvez. A glukóz sejtbe való felvételéhez az az energia szükséges, amelyik a Na^+ gradiens kialakulása következtében jön létre.

A cukrok és a carrier vagy transzporter kapcsolatának első lépése az, hogy a BBM-ben levő carrier hidrofil aminosav oldallánca laza kémiai kapcsolatot — mint a hidrogénkötés — létesít a pyranóz gyűrű C-2, C-3, C-4 vagy C-6-os helyén levő OH-csoporttal vagy a pyranóz oxygén atomjával.

ALVARADO és MAHMOOD (1) javasolták, hogy a carriert tekintsük bifunkcionálisnak — azaz olyannak, amelynek két különálló, de funkcionálisan kapcsolt helye van —, egyik az organikus anyagok, másik a Na^+ számára.

ARONSON (2), TANNENBAUM és mtsai (38) kimutatták, hogy a bélben és a vese tubulus brush-border membránokban a glukóz carrier elektromosan negatívan töltött állapotban van jelen, míg a glukóz + carrier + Na-komplex elektroneutrális. Így a transzmembranális elektromos feszültségkülönbség regulálná a szabad carrier megjelenését a luminális felszínen.

A glukóztranszport a bazális felszínen független a Na^+-tól, így a glukóz transzportmechanizmus a tubuláris epitél két ellentétes felszínén a Na^+-függőséget illetően aszimmetrikus.

2.1.2. Aminosavak transzportja

Az emlős vese aminosavtranszportjának vizsgálata komplikált, mivel több rendszer működik, amelyek között átfedések vannak. Jelenlegi megbízható ismereteink azokból a vizsgálatokból adódnak, ahol valamilyen géndefektus következtében károsodott az aminosavvisszaszívódás a tubulusban.

Négy fő mechanizmus működik a tubulusokban: a neutrális — a dibázikus — a dikarboxilikus — és az iminoglicin-rendszer.

Az aminosavak, amelyek az egyes rendszerekkel szívódnak vissza, a II. táblázatban találhatók.

A renalis cortexben az aminosavak koncentráció gradiens ellen való felvételét mind *in vivo*, mind *in vitro* kimutatták.

II. táblázat

Aminosavtranszportáló rendszerek és a szállított aminosavak

Neutrális	Dibázikus	Dikarboxilikus	Iminoglicin
Triptofán	Lizin	Glutaminsav	Glicin
Fenilalanin	Arginin	Aszparaginsav	Prolin
Tirozin	Ornitin		Hidroxiprolin
Alanin	Cisztin		
Valin			
Leucin			
Izoleucin			
Szerin			
Treonin			
Aszparagin			
Metionin			
Glutamin			

Stop-flow mikroperfúziós technikával megállapították, hogy az L-aminosavak transzportja a BBM-ben Na^+-dependens [ULLRICH és mtsai (41)].

Hólyagos membrán fragmentumokban is kimutatták a Na^+-dependens aminosavtranszportot, ami arra enged következtetni, hogy a renalis aminosav visszaszívódás hajtóereje, a hexozokéhoz hasonlóan, az antiluminális oldalon elhelyezkedő $Na^+ - K^+$-dependens ATP-áz által létrehozott Na^+-gradiens [CRANE (8)].

SAMARZIJA és FROMTER (30) megfigyelték, hogy Na^+ jelenlétében, ha L-fenilalanint vagy lizint, glutaminsavat stb. adtak a proximális tubuláris perfuzátumhoz, csökkent a BBM két oldalán levő potenciálkülönbség. Nem tapasztalták a jelenséget, ha a nátriumot kolinnal helyettesítették. Ennek a jelenségnek a magyarázata az, hogy a Na^+ és az aminosavak kotranszportja a BBM-en keresztül elektrogén, hasonlóan, mint a D-glukóz esetében. A pozitív töltések beáramlása, amelyik a Na^+ és aminosavak kotranszportjából eredményeződik, a luminális membrán parciális depolarizációját hozza létre.

Számos vizsgálatot végeztek az L-aminosavak transzportján, de ezeket a kutatásokat jelentősen gátolta a transzportrendszer multiplicitása és a specifikus gátlóanyag hiánya. Az utóbbi években nyilvánvalóvá vált, hogy bármelyik anyag, amelyik a Na^+-val kotranszportálódik parciálisan depolarizálja a membránt.

FASS és mtsai (10) közölték, hogy a D-glukóz visszaszívódása gátolja az aminosavak felvételét a tubulus sejtbe. Mivel közös carrier feltételezése nehezen elképzelhető, a jelenség csak úgy magyarázható, hogy a glukóz transzportja már módosította a membránpotenciált, amelynek következtében csökken az aminosavak transzportja.

A D-aminosavak a tubulusban sokkal lassabban szívódnak fel, mint az L-izomérek, a vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy vese tubulus sejtekben a D-izoméreknek is van mérhető affinitásuk a transzporterekhez [SILBERNAGL és mtsai (33)].

Eddigi megfigyelések azt látszanak igazolni, hogy az antiluminális membránban négy különböző transzportrendszer vesz részt az aminosavak szállításában.

1. A dikarboxil-sav rendszer, amelyiket nehéz fémsókkal gátolni lehet.
2. A glicin, szerin, alanin és a cisztein szállítását végző rendszer.
3. A fenilalanint transzportáló szisztéma.
4. A bázikus aminosavakat transzportáló rendszer.

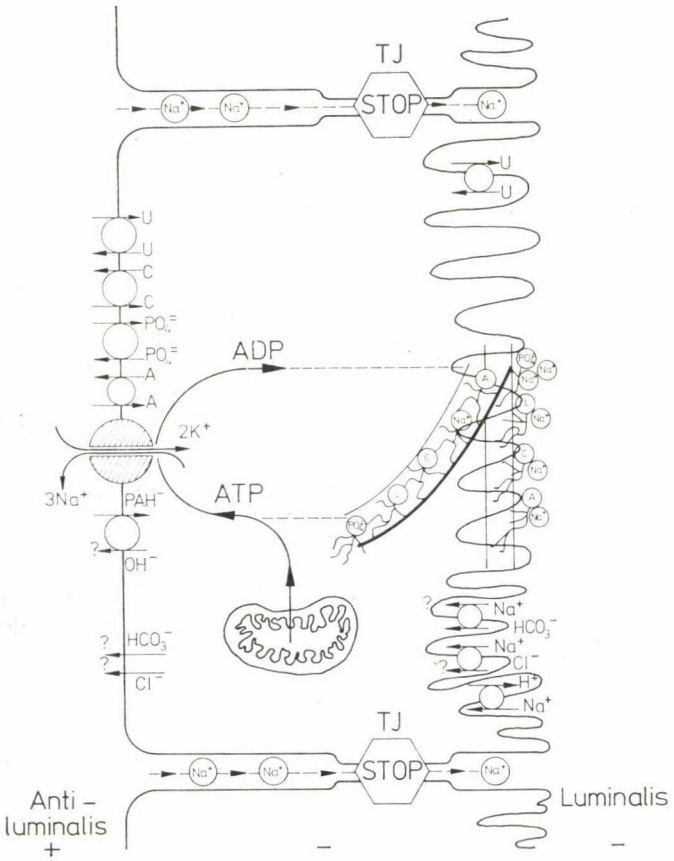
Az antiluminális aminosavtranszport relatíve Na^+-független. A jelenlegi adatok alapján úgy tűnik, hogy az ALM aminosavtranszport hasonló, mint a hexózok ALM transzportja, nevezetesen Na^+-független facilitált diffúziós mechanizmus.

2.2. A tubuláris transzportrendszerek kapcsolata

Egységes képbe összefoglalva a proximális tubulus vivőanyagot igénylő (carrier-mediated) transzportjait, úgy tűnik, hogy az ALM-ben levő Na^+-K^+-dependens ATP-áz működésének eredményeképpen a tubulus sejt belseje és környezete között fenntartott Na^+-gradiens kulcsszerepet játszik a transzportok lebonyolításában.

A Na^+ kipumpálása a citoplazmából a peritubuláris folyadékba Na-ra nézve transzmembranális elektrokémiai potenciálgrádienst hoz létre (a sejt belseje még negatívabb lesz, mint a tubulus lumen), amelyik elősegíti a tubuláris folyadékból a tubulus sejtbe való belépését a cukroknak, aminosavaknak, foszfátnak és laktátnak (ez az első lépés az aktív visszaszívódásban).

A nátrium elektrokémiai gradiense elvileg elősegítheti egyes anyagoknak az intersticiális térből való aktív extrakcióját (ez az első lépés az aktív szekré-



12. ábra. A tubuláris transzportrendszerek kapcsolata: U = urát, C = cukor, A = aminosav, L = laktát, PAH = para-amino-hippursav [SILVERMAN és TURNER (35) után]

cióban), azonban az ALM-ben levő transzportrendszerek zömükben függetlenek a nátriumtól (12. ábra).

A nátrium sejtből való kipumpálása nagyenergiájú foszfát vegyületek jelenlétét igényli. Mint láttuk, a mitochondriumok a bazális felszínnél helyezkednek el, amelyekben az oxidatív foszforiláció folyik és biztosítja a nagyenergiájú vegyületek keletkezését.

A nátriumpumpa működése azt eredményezné, hogy ahogyan a tubuláris folyadék halad előrefelé a tubulusban a nátrium visszaszívódása következtében, annak koncentrációja fokozatosan csökkenne, ami jelentős gátat jelentene a proximális tubulusnak a glomerulustól távolabbi szakaszán való transzportok számára. GOTTSCHALK és MOREL (11) mikroinjekciós vizsgálataikkal igazolták, hogy a nátrium visszaszívódása körforgásszerűen történik a proximális tubulusban, azaz a visszaszívódott nátrium helyébe a peritubuláris folyadékból nátrium jut vissza (back-diffusion) a tubulus sejteket összekötő tight-junction-on át. Így a tubuláris folyadékban a nátrium koncentrációja nem változik és a proximális tubulus végén a nátrium koncentrációja megegyezik a plazmáéval. Mi magunk [KÖVÉR (19)] hasonló technikával kimutattuk, hogy a kalcium ionoknak is a nátriumhoz hasonló körforgása van. A tight-junction-nak és az intercelluláris réseknek igen fontos szerepe van a proximális tubuláris nátrium- és vízvisszaszívódásban azon túlmenően, hogy „puffer szerepet" játszanak az aktív transzportok következtében kialakuló ion-egyensúly eltolódások helyreállításában [KÖVÉR és MOREL (20), MOREL (26)].

Az előbbi megfontolásokból az a konklúzió adódik, hogy az epitéliális transzportot a plazmamembrán működésén kívül, három ponton befolyásolhatjuk:

1. a mitochondriumokban, az oxidatív foszforiláció szintjén,
2. a Na-pumpa módosításával,
3. a tight-junction-ok, illetve az intercelluláris rések megváltoztatásával.

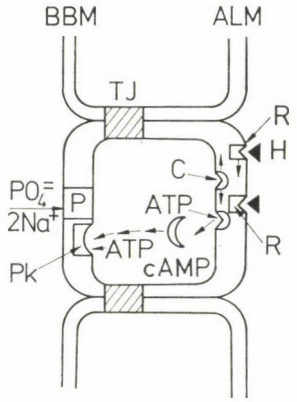
Ezek a regulációs mechanizmusok lényeges szerepet játszanak a normális proximális tubuláris visszaszívódási folyamatok biztosításában. Megváltozásuk a vesék só- és vízürítésének, így a szervezet só- és vízháztartásának zavarait idézi elő, amelyik több, a szervezet számára fontos anyag, pl. aminosavak, cukor, laktát stb. elvesztésével járhat együtt.

3. A proximális tubulusműködés szabályozása

3.1. Hormonhatások

Számos hormonreceptor van a vesében. Ezek között vannak receptorok a parathormon (PTH), a kalcitonin, adrenalin, prosztaglandinok stb. számára [AUSBACH (3)]. Mindezek a hormonok növelik az adnil-cikláz aktivitását és a ciklikus AMP tartalmat a veseszövetben in vitro vizsgálatokban. Ezek közül azonban csak a PTH növeli közvetlenül a cAMP kiválasztást a vizeletben.

A tubulus sejt morfológiája a hormonális hatások specifikus mechanizmusait igényli. A PTH érzékeny adenil-cikláz free-flow elektroforetikus szeparációval együtt izolálódik a $Na^+ - K^+$-dependens – ATP-ázzal, ami arra enged következtetni, hogy az ALM-ben lokalizálódik [SHLATZ és mtsai (31)]. Ugyanakkor a cAMP érzékeny protein-kináz a brush-border membránban található [KINNE és mtsai (15)].



13. ábra. A foszfát visszaszívódás szabályozásának sémája. P = foszfát transzporter, PK = protein-kináz, C = adenil-cikláz, R = receptor, H = hormon

A CUATRECASAS (9) által javasolt hormonhatás modellben a membránfehérjék oldalirányú mozgása a membránban az alapja a funkcionális komplex képződésnek (pl. hormon receptor és adenil-cikláz kapcsolata). A komplexnek ilyen formában való képződése a tubulus sejtekben a tight-junction miatt komoly nehézségekbe ütközik.

KINNE és SCHWARTZ (17) ajánlották az alábbi modellt a tubuláris foszfát reabszorbció szabályozására (13. ábra).

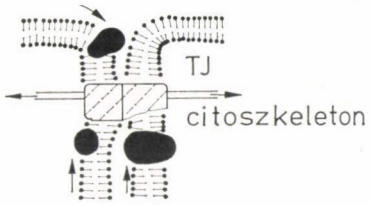
A PTH először kötődik a specifikus ALM receptorhoz a membrán peritubuláris felszínén, így aktiválja a membránban kötött adenil-ciklázt. Ennek eredményeképpen nő a celluláris cAMP mennyisége, amelyik transzcelluláris migrációval jut át a luminális oldalra, ahol aktiválja a protein-kinázt. Ez utóbbi létrehozhatja a citoplazmás membrán alkotórészek foszforilálását csökkentve így a brush-border membránban a foszfát transzport mechanizmus aktivitását. Ezen a módon a PTH közvetve megváltoztathatja, mind a Na^+, mind a Na^+-kotranszportált folyamatokat, pl. a D-glükóz visszaszívódását.

3.2. Az epiteliális plazmamembrán aszimmetria strukturális meghatározói

NICHOLSON és PORTE (27) a membrán fehérjestruktúra fő meghatározójának a citoszkeletont tekintik. Azonban, mint az a 9. ábrán látható a brush-border mikrofilamentumok jóval nagyobbak annál, hogy az individuális membrán-

összetevők organizátorai lehetnének. Lehetséges azonban, hogy nagy fehérje aggregátumok modulált vagy regulált eloszlással rendelkezhetnek az alattuk fekvő kontraktilis filamentumok hálózatának szinkronizált aktivitása következtében.

Úgy tűnik, hogy a tight-junction a fő struktúra, amelyik fenntartja a plazmafehérjék eloszlását. A tight-junction-ok mint kerítés működnek a lumi-



14. ábra. A tight-junction (TJ) barrier szerepének sematikus váza

nális és antiluminális plazmamembránok között. STACHELIN (37) fagyasztva töréses módszerrel nyert adatokkal bizonyította, hogy a tight-junction szálai a két szomszédos plazmamembrán kifeszített részecskéi, így az ellen tud állni a membránfehérjék mozgásának (14. ábra).

BENTZEL és mtsai (5) közölték, hogy a citokininek a mikrofilamentumokra való hatásukkal megváltoztathatják a junctio permeabilitását.

PISAM és RIPOCHE (29) hólyag mucosában kimutatták, hogy a lectin receptorok az apikális regióban találhatók. A tight junction-ok szétzúzása után a lektin-kötő helyeket, mind az oldalsó, mind a bazális felszínen megfigyelhették. CHANT és SILVERMAN (7) azt találták, hogy proximális tubuláris brush-border membrán antigénre termelt ellenanyag kutyában, intakt tubulus hám esetén kizárólag a luminális felszínhez kötődik. A tight-junction-ok szétterpése után, izolált tubulus sejtben a kötődés az egész sejtfelszínen kimutatható.

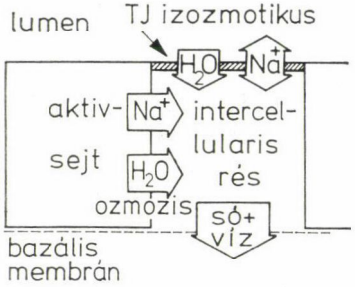
A tight-junction mint egy gát hat a fehérjék síkban való mozgására a plazmamembrán kettős rétegében, így létrehozza és fenntartja a funkcionális aszimmetriát, amelyik uralja a proximális tubulus sejt viselkedésének egészét. Ez a tubuláris hám membrán organizációjának a „durva" mechanizmusa. A tight-junction-ok által meghatározott, az ellentétes pólusokon elhelyezkedő, intramembranális fehérje aggregátumok „finom" szabályozójának a membrán alatt elhelyezkedő kontraktilis aktin, akto-miozin citoszkeleton tekinthető.

Valószínű, hogy a citoszkeleton módosíthatja magát a tight-junction-t is.

3.3. Az intercelluláris rések szerepe a só- és víztranszportban

Számos kísérleti megfigyelés bizonyítja, hogy a proximális tubuláris epitél igen permeabilis struktúra, amelyik a luminális és a peritubuláris folyadék közötti alacsony ellenállású utak jelenlétének a következménye. Morfoló-

giai és elektrofiziológiai megfigyelések szerint ezeket az alacsony ellenállású utakat „shuntöket" az intercelluláris rések és a tight junction-ok képezik, amelyeken a só- és víz könnyen átjuthatnak. Ezek a shuntök teszik lehetővé az anyagok aktív transzportjából adódó ozmotikus koncentrációkülönbségek kiegyenlítődését, az ionok bidierekcionális vándorlását.



15. ábra. Az intercelluláris rések szerepe a só- és vízvisszaszívódásban

A nátriumpumpával a tubulus sejt bazális vagy laterális felszínére kipumpált nátrium és anionjai a klorid vagy a bikarbonát az intercelluláris résekben levő folyadékot enyhén hiperozmotikussá teszik. Az ozmotikus koncentrációgradiens következtében víz áramlik keresztül a tight junction-on az intercelluláris résbe. Amint a víz beáramlik, a sejtek közötti térben a folyadék nyomása emelkedik, ami a folyadékot a bazálismembrán, illetve peritubuláris intersticiális tér felé hajtja. Így a reabszorbeált só és víz az intercelluláris résekből a kapillárisokba jut (15. ábra).

Ezt a folyamatot jelentősen befolyásolják a renalis, peritubuláris hemodinamikai tényezők (vérnyomás, a plazma kolloid ozmotikus nyomása, haematokrit stb.), mint azt NIZET (28) vizsgálatai bizonyítják. Mi magunk is több kísérletben tapasztaltuk, hogy izozmotikus hipervolémiában a proximális tubuláris só- és vízvisszaszívódás jelentősen csökken a fellépő hemodinamikai változások következtében [KÖVÉR és mtsai (21), KÖVÉR és TOST (22)].

A proximális tubuláris visszaszívódást befolyásoló „fizikai faktorok" hatását tanulmányozták izolált perfundált proximális tubuluson is *in vitro* és az eredmények megegyeznek az *in vivo* tett megfigyelésekkel [IMAI és KOKKO (14), KOKKO és mtsai (18)].

4. Proximális tubuláris diszfunkciók

A renalis tubuláris diszfunkciók az aminosav ürítéstől a felnőtt Fanconi syndromáig változatos klinikai képet idéznek elő, amelyek a tubuláris plazmamembrán abnormális viselkedésének a következményei.

Molekuláris szinten a membránléziók két típusát tudjuk elkülöníteni, az egyik típus genetikusan determinált rendellenességek, a másik az energetikai zavarokból adódó eltérések.

4.1. Megváltozott génstruktúra következményei

A rendellenességek a membrán funkcionális fehérjéinek, a carrier vagy transzportfehérjék sérülésének következtében jönnek létre. Valószínűtlen azonban az, hogy minden transzportabnormalitás egyszerű carrier aktivitás sérülés lenne. Ugyanis bármelyik anyag nettó transztubuláris fluxusa nemcsak a tubulus sejt ellentétes felszínén levő carrier működésének az eredménye, hanem azt a tubulus sejt ellentétes pólusain az anyag passzív permeabilitása is meghatározza.

Hartnup syndromában a neutrális L-aminosavak visszaszívódása mind a bélben, mind a vesében jelentősen károsodott. A bélben a reabszorbciós defektus oka a BBM-ben keresendő. Ennek bizonyítéka az, hogy a bélben a neutrális aminosavat tartalmazó dipeptid felvétele nem károsodott, ezek a dipeptidek aztán a sejtben az intercelluláris peptidázok hatására hasadnak és a dipeptidből származó aminosav könnyen átjut az ALM-en, így a zavar csak a BMM-ben lehet. Hasonló vizsgálatot vesében még nem végeztek, valószínű azonban, hogy a mechanizmus itt is ugyanaz, mint a bélben.

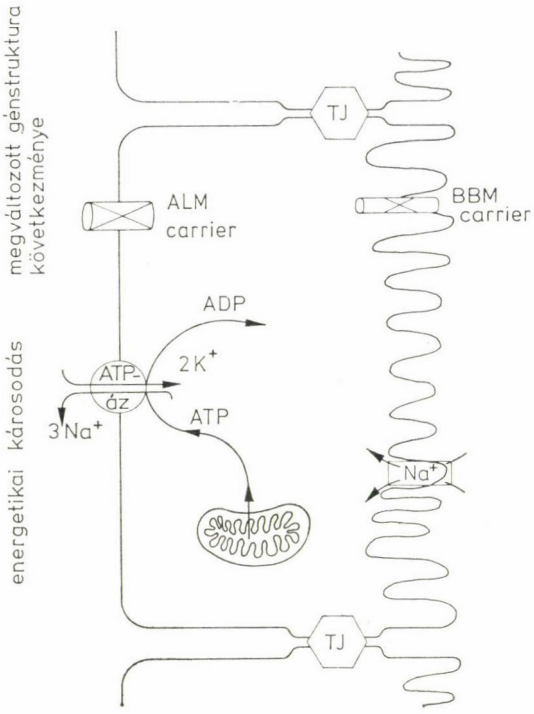
A dibázikus aminosavak arginin, lizin, ornithin (ALO csoport) és a cisztin visszaszívódásának vizsgálata jelentős figyelmet kapott a cisztinuriában, ekkor ugyanis mindezen aminosavak visszaszívódása károsodott [Their és Segal (39)].

Silbernagl és Deetjen (32) javasolták, hogy az ALO-tagjai és a cisztin két transzportmechanizmussal szállítódnak a BBM-ben. Így a cisztinuria oka az lenne, hogy az ALO-tagjainak reabszorbciós károsodása magas ALO koncentrációt eredményezne a tubuláris folyadékban, ami gátolná a cisztint transzportáló mechanizmust.

Iminoglicinuria jellegzetes transzportkárosodás a tubulusokban, amelyik a prolin, hidroxiprolin és a glicin visszaszívódás károsodásával jár. Ennek oka valószínűleg egy közös reabszorbtív mechanizmus rossz működése a BBM-ben [McNamara és mtsai. (25)].

4.2. Energetikai károsodások (Fanconi syndroma)

Fanconi syndromában glucosuria, foszfáturia, aminosavürítés, csökkent szérum húgysavszint, proximális tubuláris acidozis és natriurezis áll fenn. Nyilvánvaló, hogy itt a kefeszegély és a Na-dependens transzportfolyamatok multiplex károsodása idézi elő a tüneteket. A legtöbb esetben azonban semmiféle látható elváltozás nincs a tubulus sejtekben. Ilyen esetben a molekuláris transzportrendszer károsodása több okra vezethető vissza.



16. ábra. A proximális tubuláris diszfunkciók vázlata

1. a Na-pumpa csökkent működése, azaz a $Na^+ - K^+$-dependens ATP-áz csökkent aktivitása.

2. az ATP-áz működéséhez szükséges ATP csökkent mennyisége.

3. megváltozott intramembranális kapcsolat a Na-elektrokémiai grádiens és a másodlagosan kotranszportált anyag-carrier komplex között.

4. megváltozott intramembranális kapcsolat a luminális membránpotenciál és a specifikus transzporter között.

A 16. ábrán összefoglalva láthatók azok a változások, amelyek a tubuláris működés zavarainál előfordulhatnak. E zavarok ismeretének fényében láthatjuk, hogy a proximális tubulus sejtek között levő tight junct-ionok milyen jelentősen tudják módosítani a proximális tubulus sejtben fennálló funkcionális aszimmetriát és változtatják meg időlegesen a cukrok, aminosavak, a Na és a víztranszportját.

5. Konklúzió

Nyilvánvaló, hogy ha meg akarjuk érteni pontosan a tubulus működését normál és patológiás állapotokban, akkor integrálnunk kell azokat az ismereteket, amelyeket izolált szubcelluláris organellumokban, az individuális tubulus-

sejteken, az intakt tubuluson és magán az egész vesén nyertek. Csak ebben az egységben leszünk képesek megérteni azokat a bonyolult mechanizmusokat, amelyek a proximális tubulusban végbemennek.

IRODALOM

1. Alvarodo, F., Mahmood, A.: Cotransport of organic solutes and sodium ions in the smole interstine: a general model. Amino acid transport. Biochemistry **13,** 2882—2890 (1974).
2. Aronson, P. S.: Electrical dependence of phlorizin binding to isolated rabbit renal cortical brush border membrane vesicles. Kidney Int. **12,** A 548 (1977).
3. Ausbach, G. D.: Hormone receptors in the kidney. in: Membranes and Disease, Raven Press, New York, pp. 291—300 (1975).
4. Beck, J. C., Sactor, B.: Energetics of the Na^+-dependent transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. J. Biol. Chem. **250,** 8674—8680 (1975).
5. Bentzel, C. J., Hainan, B., Edelman, A., Anagnostopoulos, T., Benedetti, E. L.: Effect of plant cytokinins on microfilaments and tight junction permeability. Nature **264,** 666—668 (1976).
6. Booth, A. G., Kenny, A. J.: Proteins of the kidney microvillus membrane. Biochem. J. **159,** 395—407 (1976).
7. Chant, S., Silverman, M.: Immunologic characterization of plasma membranes from the dog kidney proximal tubule. Kidney Int. **11,** 348—356 (1977).
8. Crane, R. K.: The gradient hypothesis and other models of carrier mediated active transport. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **78,** 99—159 (1977).
9. Cuatrecasas, P.: Membrane receptors. Ann. Rev. Biochem. **34,** 169—214 (1974).
10. Fass, S. J., Hammerman, M. R., Sactor, B.: Transport of amino acids in renal brush border membrane vesicles. Uptake of the neutral amino acid L-alanine. J. Biol. Chem. **252,** 583—590 (1977).
11. Gottschalk, C. W., Morel, F., Mylle Margarat: Tracer microinjection studies of renal tubular permeability. Am. J. Physiol. **209,** 173—177 (1965).
12. Gottschalk, C. W., Lasiteb, W. E.: Micropuncture methodology, in Handbook of Physiology Vol. **8,** pp. 129—144 (1973).
13. Heidrich, H. G., Kinne, R., Kinne-Saffran, E., Hanning, K.: The polarity of the proximal tubule cell in rat kidney. J. Cell. Biol. **54,** 232—245 (1973).
14. Imai, M., Kokko, J. P.: Effect of peritubular protein concentration on reabsorption of sodium and water in isolated perfused proximal tubulus. J. Clin. Invest. **51,** 314—325 (1972).
15. Kinne, R., Shlatz, L. J., Kinne-Saffran, E., Schwartz, J. L.: Distribution of membrane-bound cyclic AMP-dependent protein kinase in plasma membranes of cells of the kidney cortex. J. Memb. Biol. **24,** 145 (1975).
16. Kinne, R.: Membrane — molecular aspects of tubular transport. in: Int. Rev. Physiol. Kidney and Urinary Tract Physiology II. Vol. 11. University Park Press, Baltimore (1976).
17. Kinne, R., Schwartz, J. L.: Resolution of the epithelial cell envelope into luminal and contraluminal plasma membranes as a tool for the analysis action. in: Membranes and Disease. Raven Press, New York, pp. 331—344 (1976).
18. Kokko, J., Burg, M. B., Orloff, J.: Characteristics of NaCl and water transport in the renal proximal tubule. J. Clin. Invest. **50,** 69—75 (1971).
19. Kövér, G.: Effect of hypercalcaemia on tubular calcium and phosphate transport. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **45,** 95—107 (1974).
20. Kövér, G., Morel, F.: Proximal tubular reabsorption during stop-flow. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **42,** 319—326 (1972).
21. Kövér, G., Bartha, J., Tost Hilda: The effect of saline-induced extracellular volume expansion on the kidney function. Int. Urol. Nephrol. **8,** 237—245 (1976).
22. Kövér, G., Tost Hilda: The effect of indomethacin on kidney function: indomethacin and furosemid antagonism. Pflügers Arch. **372,** 215—220 (1977).
23. Kühn, K., Reale, E.: Junctional compelxes of the tubular cells in the human kidney as revealed with freezefracture. Cell Tis. Res. **160,** 193—205 (1975).
24. Loor, F.: Cell surface design. Nature **264,** 272—273 (1976).

25. McNAMARA, P., OZEGORRIC, B., PEPE, L. M., SEGAL, S.: Proline and glicine uptake by renal brush border membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73,** 4521—4525 (1976).
26. MOREL, F.: La réabsorption isoosmotique proximale du rein. Mécanisme et régulation. J. Physiol. (Paris) **72,** 515—530 (1976).
27. NICOLSON, G. L., POSTE, G.: Cell surface organization and modification with cancer (first of two parts). N. Eng. J. Med. **295,** 197—203 (1976).
28. NIZET, A.: Quantitative influence non-hormonal blood factors on the control of sodium excretion by the isolated dog kidney. Kidney Int. **1,** 27—37 (1972).
29. PISAM, M., RIPOCHE, P.: Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. J. Cell. Biol. **71,** 907—920 (1976).
30. SAMARZIJA, J., FROMTER, E.: Electrical studies on amino acid transport across brush border membrane of rat proximal tubule in vivo. Pflügers Arch. **359,** R 119 (1975).
31. SHLATZ, L. J., SCHWARTZ, J. L., KINNE-SAFFRAN, E., KINNE, R.: Distribution of parathyroidhormone-stimulates adenylate-cyclase in plasma membrane of cells of the kidney cortex. J. Memb. Biol. **24,** 131 (1975).
32. SILBERNAGL, S., DEETJEN, P.: The tubular reabsorption of L-cystine and L-cysteine. A common transport system L-arginine or pot? Pflügers Arch. **337,** 277—284 (1972).
33. SILBERNAGL, S., FOULKES, E. C., DEETJEN, P.: Renal handling of amino acids. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **74,** 105—167 (1975).
34. SILVERMAN, H.: Glucose transport in the kidney. Biochem. Acta **457,** 303—351 (1976).
35. SILVERMAN, M., TURNER, R. J.: The renal proximal tubule. in: Biomembranes 10, Plenum Press, New York, pp. 1—50 (1979).
36. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science **175,** 720—731 (1972).
37. STAEHELIN, J. A.: Structure and function of intercellular junctions. Int. Rev. Cytol. **39,** 191—283 (1974).
38. TANNENBAUM, C., TOGGENBURGER, G., KESSLER, M., ROTHSTEIN, A., SEMENZA, G.: High-affinity phlorizin binding to brush border membranes from small intestine identity with (a part of) the glucose transport system, dependence on the Na^+-gradient, partial purification. J. Supramol. Struct. **6,** 519—533 (1977).
39. THIER, O., SEGAL, S.: Cystinuria. in: The Metabolic Basis of Inherited Disease, McGraw Hill, New York pp. 1504—1519 (1972).
40. TURNER, R. J., SILVERMAN, M.: Sugar uptake into brush border vesicles from dog kidney. II. Kinetics. Biochim. Biophys. Acta **511,** 470—486 (1978).
41. ULLRICH, K. J., RUMRICH, G., KLOSS, S.: Sodium-dependence of the amino acid transport in the proximal convolution of the rat kidney. Pflügers Arch. **351,** 49—60 (1974).

MODELLMEMBRÁNOK A MEMBRÁNMŰKÖDÉS VIZSGÁLATÁBAN*

GYÖRGYI SÁNDOR

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, Budapest

A membrán-biofizika kétségkívül jelentős fejlődése nemcsak az alkalmazott módszerek spektrumának kiszélesedésében jelentkezett, hanem a membránműködés mechanizmusának egyre mélyebb megismerésében is megnyilvánult. Ezt a fejlődést számos konkrét gyakorlati igény is gyorsítja. Így például a membránra ható anyagok (gyógyszerek, növényvédőszerek) hatáserősségének kvantitatív jellemzése új, érzékeny módszerek kifejlesztését, a hatásmechanizmus pontos felderítése pedig a membránműködés molekuláris mechanizmusának ismeretét igényli.

Még a legegyszerűbb biológiai membránok is túlságosan bonyolultak ahhoz, hogy a bennük külső hatásokra (pH, ionkoncentráció, hőmérsékletváltozás, módosító anyagokkal való kölcsönhatás) bekövetkező szerkezeti változások pontosan azonosíthatók, ill. molekuláris szinten értelmezhetők legyenek. Érthető tehát, hogy a membránkutatások rohamos fejlődésével együtt, de különösen az elmúlt évtizedben ugrásszerűen megnőtt a membránműködés egyes alapvető jellemzőit modellező rendszereken *(modellmembránokon)* elvégzett vizsgálatok száma.

A biológiai membránok speciális felépítéséből és működéséből következik, hogy a strukturális (és funkcionális) alkotórészei közül elsősorban a lipid kettősréteg az, amely viszonylag egyszerűen modellezhető és amelynek az alapvető tulajdonságai megtalálhatók a lipid modellmembránokban is. Közismert, hogy a membrán lipidrétege nemcsak a megfelelő közeget biztosítja a fehérjék működése számára, hanem maga is aktív szerepet játszik elsősorban az apoláris, de tulajdonképpen mindenféle anyag transzportjának szabályozásában, számos membránműködést módosító anyag hatásának kialakulásában. A membrán-lipidekből készült — egy vagy több komponensű — modellmembránok szerkezete megegyezik az eredeti membránéval, s így a módosító anyagok hatására bekövetkező szerkezeti átalakulások, a hatóanyag-lipid kölcsönhatás is hasonló ahhoz, ami a biológiai folyamatok során létrejön.

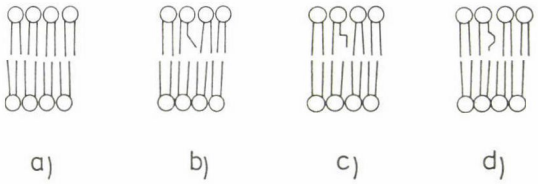
A lipid modellmembránok talán legnagyobb előnye, hogy a lipidmolekulák egymás közötti, ill. a poláris fejek és a víz között fellépő kölcsönhatások

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

azonossága miatt ugyanolyan „dinamikus" szerkezetűek, mint a biológiai membránok lipid rétege. A folyadékkristályos tulajdonságú lipid kettősrétegekben már igen kis energiafelvétellel, a környezet kismértékű megváltozására olyan szerkezeti változások mennek végbe, amelyek eredményeképpen megváltozik a molekulák rendezettsége, térkitöltésük, s ezzel a membrán permeabilitása, a rajta keresztül végbemenő transzportfolyamatok sebessége. Ezt a membránok szabályozó funkciója szempontjából alapvető tulajdonságot a lipid modellmembránok, a lipid-víz rendszerek is egyértelműen és azonos módon mutatják.

A membránok lipidrétegében bekövetkező szerkezeti változásokat két csoportba sorolhatjuk: (1) az *intermolekuláris* struktúra módosulásáról beszélünk, ha a lipidmolekulák egymáshoz viszonyított helyzete, térkitöltése, a molekulatengely iránya, esetleg a molekulák tömegközéppontjának rendezettsége változik, míg az *intramolekuláris* rendet az egyes molekulák apoláris részében kialakuló strukturális hibák szabják meg. Alacsonyabb hőmérsékleten ezek a szénhidrogén láncok kinyújtott ún. all trans konfigurációban találhatók (l. 1.a. ábra), de mivel a C—C kötések 120°-os elfordulásához viszonylag kis (~ 2kJ/mól) energia kell, a hőmérséklet emelésével, külső hatásokkal létrehozhatók az ilyen ún. gauche állapotok. A 120°-os elfordulással járó erősen megnövekedett helyigény miatt (1.b. ábra) inkább a két (1.c.), ill. négy (1.d. ábra) gauche-t tartalmazó konfigurációk jönnek létre. Mindkettő jól definiált szerkezeti hiba, vakancia (ún. kink) létrejöttét jelenti, amelyek koncentrációjának megnövekedése ismét csak nagyobb permeabilitást, transzportsebességet eredményez.

A modellmembránok segítségével tehát minden olyan hatás vizsgálható, amely az intermolekuláris, ill. intramolekuláris rendezettség megváltozásával jár együtt. További előny, hogy a szerkezeti átalakulás vizsgálatával egyidőben lehetőség van a membrán permeabilitás változás kvantitatív meghatározására is, s így a szerkezet és funkció kapcsolatának molekuláris szintű vizsgálatára. Ebből a szempontból elsősorban az egyszeres és többszörös kettősréteggel körülvett vezikulák (liposzóma), ill. a kis, 1—2 mm átmérőjű nyíláson létrehozható sík bimolekuláris lipidmembránok (BLM) alkalmazhatók előnyösen. Sokszor használunk ún. buborék-membránokat, amelyek nagy felületük miatt különö-



1. ábra. Foszfolipidek szénhidrogén láncában létrejövő intramolekuláris konformációváltozás. a: alap- (all trans) állapot, b: egyszeres láncelfordulás (gauche állapot), c: két gauche-t, d: négy gauche-t tartalmazó lánctörés

sen alkalmasak a viszonylag kis permeabilitású lipidmembránon keresztül létrehozott transzportfolyamatok vizsgálatára.

A membránműködést befolyásoló anyagok közül elsősorban a különböző nagyságú poláris csoportot, ill. apoláris láncot vagy molekularészt tartalmazó amfipatikus vegyületek azok, amelyek legnagyobb valószínűséggel a lipidréteggel lépnek kölcsönhatásba. Ez a kölcsönhatás a lipidréteg összetétele mellett nagymértékben függ a molekula szerkezetétől. Kis poláris fejet és hosszabb, egyszeres szénhidrogénláncot tartalmazó vegyületek (mint pl. a normál alkoholok) teljesen benyúlnak a lipidmolekulák közé és elsősorban a szénhidrogénláncok közötti van der Waals kölcsönhatások módosítása révén változtatják



2. ábra. Membránműködést módosító anyagok lehetséges kölcsönhatásainak szemléltetése (részletes magyarázatot l. szövegben)

meg az intermolekuláris rendet (2.a. ábra). Nagyobb fejcsoport esetén (2.b. ábra) energetikailag az a kedvezőbb állapot, ha a molekula csak részben nyúlik be a membránba és az így létrehozott változás iránya és mértéke attól függ, hogy a molekula jelenléte a szénhidrogén láncok közötti, ill. a fejcsoportok között meglevő vonzó és taszító kölcsönhatások közül melyeket és milyen mértékben módosítja. Ugyanakkor — rövidebb, benyúló apoláris lánc esetén — vakanciák jöhetnek létre, megnő a kinkképződés valószínűsége. Tisztán poláris vegyületek (pl. ionok) is kölcsönhatásba léphetnek a membrán lipidrétegével, a fejcsoportokkal és koncentrációjuktól függően lazíthatják, vagy stabilizálhatják a membrán szerkezetét (2. c. ábra). Mivel a modell lipidmembránok összetétele és szerkezete közel megegyezik a megfelelő biológiai membránok lipidrétegének paramétereivel, a módosító anyagokkal kialakuló kölcsönhatások is azonosak, s így a modellrendszereken létrehozott strukturális és funkcionális változások extrapolálhatók a biológiai membránokra.

További előnye az egyszerű összetételű és szerkezetű modellmembránoknak, hogy viselkedésük leírható a folyadékkristályos rendszerekre kidolgozott elméleti modellek segítségével és lehetőség van az elméleti modell és az ugyancsak a folyadékkristályok vizsgálatában már jól bevált kísérleti módszerekkel (mikrokalorimetria, optikai, mágneses rezonancia spektroszkópia stb.) kapott eredmények illesztésére, illetve kísérletileg nem mérhető paraméterek kiszámítására. Az utóbbi években kifejlesztett és alkalmazott elméleti modellek jelentős segítséget adtak és adnak a membránműködés mechanizmusának megismerésére irányuló kutatásoknak.

Az ezt követő közlemények (SUGÁR 1981, BÁTHORI és mtsai 1981, SZABON és TÖLGYESI 1981, SZŐGYI és mtsai 1981, BLASKÓ 1981) konkrét példákon keresztül szemléltetik a lipid modellmembránok adta lehetőségeket, a modellrendszerek alkalmazhatóságát mind a módosítatlan membrán működésének, mind pedig a membránra ható anyagok hatásmechanizmusának megismerésében, ill. a membránra gyakorolt hatás mértékének kvantitatív jellemzésére.

IRODALOM

BÁTHORI Gy., HOLLY S., GRANDICS P., NÁRAY A.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 187—195 (1981).
BLASKÓ K.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 219—225 (1981).
SZABON J., TÖLGYESI F.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 195—200 (1981).
SZŐGYI M., CSERHÁTI T., SZABON J.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 201—207 (1981)
SUGÁR I.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 177—186 (1981).

KÜLSŐ TÉNYEZŐK HATÁSA A FOSZFOLIPID MEMBRÁNOK SZERKEZETÉRE*

SUGÁR ISTVÁN

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, Budapest

A modellmembránok szerkezetét külső terek — hőmérséklet [MARSH és mtsai (1977)], hidrosztatikai nyomás [LIU és KAY (1977), DE SMEDT és mtsai (1978)], elektromos tér [COSTER és ZIMMERMAN (1975)], pH és a külső ion koncentráció [TRÄUBLE és mtsai (1976)], valamint poláros, apoláros és amfifil karakterű adalék anyagok (SZŐGYI és mtsai 1981) — lényegesen megváltoztathatják.

Membrán szerkezetek

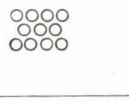
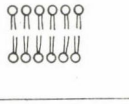
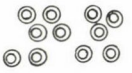
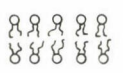
A foszfolipid membránok permeabilitása szempontjából fontos három különböző membránstruktúra sematikus képét mutatja az 1. ábra.

A *gél vagy kristályos* állapotot a nagyfokú rendezettség jellemzi. A molekulák szorosan, hatszöges rendben illeszkednek egymáshoz [HUI (1976)] és molekulánként kb. 40 Å^2 felületet foglalnak el. Ha a molekulák egymáshoz viszonyított rendjét az ún. *intermolekuláris rendet* nulla és egy közötti számmal jellemezzük, akkor a rendezett gél állapotban közel egy ($\sim$1) az intermolekuláris rend. A gél állapotban azonban nemcsak a laterális, de a vertikális, a membrán felületre merőleges, periodicitás is teljes. Ezt a vertikális rendet a továbbiakban *intramolekuláris rendnek* nevezzük, mivel az a lipidek szénhidrogén láncainak állapotával kapcsolatos. Gél állapotban a molekulák szénhidrogén láncai (az 1. ábrán a körökkel jelölt poláris fejcsoportokhoz kapcsolódó vonalak) kinyújtott ún. all-trans állapotban vannak és irányuk a membrán felületre merőleges.** Így a láncok CH_2 csoportjai a térben meghatározott rend szerint követik egymást. A szomszédos CH_2 csoportok vertikális távolsága 1,27 Å [NAGLE és WILKINSON (1978)]. A gél fázisú membránok permeabilitása a tökéletes illeszkedés miatt jelentéktelen.

A *folyadékkristályos állapotban* is jelentős az intermolekuláris rend, a szabályos hatszöges illeszkedés [HUI és mtsai (1975)], noha nagyobb 50—60 Å^2

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

** Valószínűleg a rétegek közötti kölcsönhatás miatt többrétegű ún. multilamelláris membránok esetén a szénhidrogén láncok és a membránfelület közötti szög eltérhet a merőlegestől [JANIAK és mtsai (1976)].

	INTERMOLEKULÁRIS REND	INTRAMOLEKULÁRIS REND	PERMEABILITÁS
KRISTÁLYOS FÁZIS	 ~1	 ~1	kis elektronvezetés lehetséges
ÁTMENETI FÁZIS	 ~0	 ~0	ionok és kis molekulák nagy intersticiális- és közepes mértékű kink-vezetése
FOLYADÉK KRISTÁLYOS FÁZIS	 ≲1	 ~0	ionok és kis molekulák közepes mértékű intersticiális és kink-vezetése

1. ábra. Az egykomponensű lecitin membránok struktúrái a rendezettség mértéke szerint osztályozva

az egy molekulára jutó felület. Az intramolekuláris rend azonban lényegesen eltér a gél fázisnál tapasztalttól. A szénhidrogén láncok időben állandóan változó, szabálytalan, tört vonal alakot mutatnak. Ebben az állapotban megszűnik a membrán felületére merőleges, intramolekuláris rend. A láncok rendezetlensége az ún. trans-gauche átmenetek következménye. Gauche állapotú a lánc valamely C—C kötése, ha a kötés körül, a trans állapothoz képest, plusz vagy mínusz 120°-os elfordulás történik. Ilyenkor az egyenes lánc a gauche állapotú kötés helyénél megtörik és az eredeti lánciránytól 60°-kal elhajlik. A gauche állapotú kötések energetikailag stabilak, energiájuk 2,1 kJ/mol-lal magasabb, mint a transz állapotú kötéseké [Flory (1969)]. Folyadékkristályos állapotban dipalmitoilfoszfatidilkolin (DPPC) membránok esetén átlagosan 4—5 gauche állapotú kötés található egy szénhidrogén láncban [Yellin és Levin (1977)].

A trans-gauche izomerizációk miatt a molekulák átlagos hossza és így a membrán vastagsága DPPC membránok esetén kb. 10 Å-mel kisebb [Janiak és mtsai (1976)], mint a gél állapotban, ugyanakkor megnő a molekula laterális irányú helyigénye. Az 1. ábrán látható kettős körök a molekulák megnövekedett helyigényére utalnak. Tehát folyadékkristályos állapotban nemcsak a molekulák közötti — intersticiális — tér, de a szorosan pakolt rendszer felülete is megnő a gél állapotú esethez képest.

A folyadékkristályos állapotú membrán laza szerkezete miatt lényegesen permeábilisabb ionokra és kis molekulákra nézve mint a gél fázis. Módosítatlan foszfolipid membránok esetében az anyagtranszport két lényeges mechanizmusát tételezik fel: a kinkvezetést [Träuble (1971)] és az intersticiális vezetést. Az intersticiális vezetés a lipid molekulák közötti szabad téren keresztül történő anyagtranszport, míg a kinkvezetés egy speciális lánckonfor-

mációval kapcsolatos vezetési típus. A szénhidrogén lánc ún. 4 g kink konformációt vesz fel, ha négy gauche állapotú kötés $tg^+ tg^- tg^- tg^+t$ sorrendben követi egymást (g^+: $+120°$-os, g^-: $-120°$-os elfordulásból adódó gauche állapotú kötés, t: trans állapotú kötés). A kink egy három oldalról határolt szabad teret hoz létre a membránban, melynek átlagos mérete kb. 25 Å^3 [TRÄUBLE és HAYNES (1971)]. E szabad térrészbe bekerült ion vagy kisméretű molekula a kink hőmozgása révén átjuthat a membránon.

Az *átmeneti fázis* a legkevésbé rendezett struktúra. A nagy sűrűségingadozások miatt felbomlik az intermolekuláris rend és nagy szabad terek nyílnak időlegesen a molekulák között. Az átmeneti fázisban levő membrán intersticiális vezetéséhez képest elhanyagolható mértékű a kinkvezetés. Biológiai szempontból nagyon jelentős az átmeneti fázis tanulmányozása, ugyanis számos biológiai membrán lipidrétege átmeneti fázisban van in vivo körülmények között, illetve a külső körülmények megváltozásakor a sejt megváltoztatja lipidösszetételét, oly módon, hogy a membrán ismét átmeneti fázisba kerüljön [WAKAYAMA és OSHIMA (1978)].

Membrán energetika

A membrán energia meghatározásához a következő kölcsönhatási és konformációs energiákat kell figyelembe vennünk:

a szénhidrogén láncok közötti Van der Waals kölcsönhatást,
a láncok közötti sztérikus taszítást,
a fejcsoportok vonzó és taszító kölcsönhatásait,
a víz és a fejcsoportok közötti kölcsönhatást, valamint
az egyes láncok konformációs energiáját.

A statisztikus mechanika módszereit alkalmazó membrán modellek segítségével számszerűen becsülhetők a fenti kölcsönhatások a folyadékkristályos- és gélfázisban egyaránt.

JACOBS és mtsai (1975) modelljét alapul véve az 1. táblázatban tüntettük fel az egyes energiajárulékokat DPPC membránok esetén. A táblázat alapján a következő észrevételeket tehetjük.

a) A membrán stabilitását a legerősebb kölcsönhatás a láncok közötti Van der Waals vonzás biztosítja.

b) Gél állapotban a láncok közötti erős sztérikus taszító, kölcsönhatás megakadályozza a helyigényes trans → gauche átalakulásokat, míg a folyadékkristályos fázisban a lazább struktúra (kisebb taszító kölcsönhatás) lehetővé teszi a gauche állapotú kötések kialakulását.

c) A lipid molekulák láncainál rövidebb hidrofób vagy hidrofób résszel rendelkező amfifil adalékanyagok beékelődve a lipid mátrixba helyileg csökkentik a lipid láncok közti taszító kölcsönhatást. A gél fázisú membránban csökken az intramolekuláris rend.

1. táblázat

Energiaviszonyok DPPC membránban

A kölcsönhatás vagy energia típusa	Gélfázis kJ/mol	Folyadékkristályos fázis kJ/mol
Vonzás		
lánc—lánc	—240	—80
fej—fej	—2	—0,8
Taszítás		
lánc—lánc	140 (139,95 + 0,05)*	35 (= 19 + 16)*
fej—fej—víz	47	16
Lánc konformáció	0,1	10

* A lánc—lánc taszítás az all-trans állapotú láncok taszításából plusz a gauche állapotok megjelenése miatti taszításból tevődik össze.

d) A fejcsoportok és a víz közötti taszító kölcsönhatás a vonzó kölcsönhatás egyötöde. Következésképp, ha e kölcsönhatás mértékét, pl. az ionkörnyezet megváltoztatásával, növeljük vagy csökkentjük, lényegesen befolyásolhatjuk a membrán stabilitását. Az ionok tehát akkor is kiváltják hatásukat, ha mint azt az alkáli kationokról feltételezik, nem közvetlenül a fejcsoportokkal lépnek kölcsönhatásba, hanem a membránhoz kötött víz szerkezetét változtatják meg. Természetesen a fejcsoportok töltéserősségének, s így a fejcsoportok közötti taszító kölcsönhatás módosításával is befolyásolható a membránszerkezet (többértékű kationok hatása).

Hőmérséklet és nyomás hatása a foszfolipid membránok szerkezetére

Az első részben ismertetett membrán fázisok külső hatásokra egymásba átalakíthatók. Hőmérséklet emelés hatására a membrán gél fázisból folyadékkristályos fázisba megy át. DPPC vezikulák esetén az átalakulási hőmérséklet 41,4 °C és az átmeneti fázis kb. 3 °C széles [Báthori (1980)]. Liu és Kay (1977) a hidrosztatikai nyomás növelésével folyadékkristályos → gél átmenetet tudtak kiváltani. Például DPPC multilamelláris rendszerek esetén 50 °C-on 40 MPa nyomás kellett a fázisátalakulás kiváltásához és a hőmérséklet emelkedésével lineárisan nőtt a fázisátalakulási nyomás értéke.

Továbbfejlesztve Jacobs és mtsai (1975) modelljét a továbbiakban egységes statisztikus mechanikai modellt adunk a fenti jelenségek molekuláris szintű értelmezésére. Jacobs és mtsai (1975) a bilayer egy rétegének állapotösszegére a következő kifejezést kapták:

$$Q(N, A, T) = Q_I(N, A, T) \quad Q_{II}(T, P)^{2N} \quad \exp - N(A_0/A)\, H_s(2n + \delta)/kT,$$

ahol

$$Q_I = \left(\frac{\alpha^2 A_0}{N}\right)^N \exp N(0{,}06 - 0{,}12\alpha + 0{,}382\alpha^2 + 0{,}243\alpha^3)$$

az egy síkban elhelyezkedő merev korongok konfigurációs integrálja,

$$Q_{II} = 1 + \sum_{i=1}^{m} (1 + 2 \exp - \varepsilon/kT)^{m-i} \quad 2 \exp - [\varepsilon + P\gamma A_0(m - i + 1)/N]/kT$$

egy szénhidrogén lánc konfigurációs állapotösszege. A Q_{II} kifejezésében szereplő P, a merev korongok közötti nyomás:

$$P = (N\,kT/A_0)\,(2/\alpha + 1{,}9 + 0{,}67\alpha + 1{,}5\alpha^2)/(1 + \alpha).$$

A fenti összefüggésekben a következő jelöléseket használtuk: T az abszolút hőmérséklet, k a Boltzmann-állandó, 2N a membrán egyik rétegében található szénhidrogén láncok száma. m(= n — 2) a szénhidrogén lánc azon C—C kötéseinek a száma, amelyek trans-gauche átmenetet megvalósíthatnak, n a lánc szénatomjainak száma (DPPC esetén n = 16), *i* jelöli, hogy a láncban a fejcsoporttól számított hányadik C—C kötésen találunk először gauche átmenetet, A a membrán aktuális felülete, A_0 a szorosan illeszkedő molekulákból felépülő ún. szorosan pakolt felület, és $\alpha \left(= \frac{A - A_0}{A_0}\right)$ a relatív felületváltozás.

A modell paraméterei a következők: ε (= 2,1 kJ/mol) a gauche állapotú kötés energiája, H_s (= −7,8 kJ/mol · CH_2) a hosszú szénhidrogén láncok egy CH_2 csoportra vonatkoztatott szublimációs hője. γ (= 0,047085) és δ (= −6,4) illesztett paraméterek. Az illesztés úgy történt, hogy a modell a lehető legjobban adja meg a különböző foszfolipid membránok átalakulási hőmérsékletét. γ egy geometriai faktor δ pedig a fej—víz kölcsönhatás erősségét jellemző mennyiség. A Q(N, A, T) állapotösszeg ismeretében kiszámíthatjuk a gél és folyadékkristályos fázisra jellemző termodinamikai átlagokat, pl.: egy molekulára jutó felületet, egy láncra jutó gauche állapotú kötések számát, membrán vastagságot, entrópiát, fázisátalakulási hőmérsékletet.

Mint korábban kimutattuk [Sugár (1979)] az eredeti Jacobs modell szerint a gél fázisú membrán térfogata kb. 10%-kal nagyobb, mint a folyadékkristályosé. Ez az eredmény ellentétben áll a kísérleti eredményekkel, amelyek szerint 2—4%-kal nagyobb a folyadékkristályos fázisban a membrán térfogata [Nagle és Wilkinson (1978)]. A modell e hiányosságának kiküszöbölése különösen fontos, ha a hidrosztatikai nyomás térfogatcsökkentő hatását helyesen kívánjuk modellezni. Az eredeti Jacobs modell alapján ugyanis az a furcsa helyzet állna elő, hogy a nyomás növelésekor egyszer csak 10%-kal megnövekedne a membrán térfogata.

A membránfelület függése a láncok konformációjától

Az eredeti modell [JACOBS és mtsai (1975)] szerint a membrán szorosan pakolt felülete (A_0), az intramolekuláris rendtől függetlenül, állandó. Azonban, ahogy azt az első részben megmutattuk, a láncokban a gauche állapotok megjelenése növeli az egyes molekulák effektív keresztmetszetét, s így megnövekszik a membrán szorosan pakolt felülete is (lásd az 1. ábrát). A konformációfüggő szorosan pakolt felület a következő feltételezések segítségével könnyen kiszámítható:

a) Folyadékkristályos fázis esetén a szorosan pakolt láncok csak kink konformációkat vesznek fel, mivel a lehetséges konformációk közül ez a legkevésbé helyigényes. Egy 2g kink (tg^+tg^-t) kialakulásakor a lánc vertikális hossza $h_0 = 1{,}27$ Å-mel rövidül, ami másrészt megfelel egy C—C távolságnak is [TRÄUBLE és HAYNES (1971)]. Így a szorosan pakolt láncok esetén a lánc átlagos vertikális hossza (l_s):

$$l_s = [n - (\langle g \rangle / 2)]\, h_0 ,$$

ahol $\langle g \rangle$ a láncok átlagos gauche száma és nh_0 a lánc hossza all-trans állapotban.

b) Mivel a szorosan pakolt szénhidrogén láncok térfogata független az intramolekuláris konformációtól, ezért

$$\mathcal{A}_0' l_s = A_0' l_0 ,$$

ahol $l_0 (= nh_0)$ és $\mathcal{A}_0'$ a konformációtól függő szorosan pakolt szénhidrogén láncok felülete, A_0' a szorosan pakolt all-trans állapotú szénhidrogén láncok felülete.

c) Végül pedig vegyük tekintetbe, hogy all-trans állapotú foszfolipid molekulák esetén a fejcsoport felülete $\left(\frac{A_0}{N}\right)$ kissé nagyobb, mint a hozzá kapcsolódó két szénhidrogén lánc keresztmetszete $\frac{A_0}{N} > \frac{2A_0'}{N}$ [NAGLE (1976)] ezért a két lánc effektív keresztmetszete $\left(\frac{2\mathcal{A}_0'}{N}\right)$ csak egy bizonyos, nullánál nagyobb, gauche szám fölött lesz nagyobb, mint a fejcsoport felülete $\left(\frac{A_0}{N}\right)$. Ekkor már nem a fejcsoportok felülete, hanem a láncok effektív felülete határozza meg a membrán szorosan pakolt felületét. Így a membrán konformációtól függő szorosan pakolt felülete ($\mathcal{A}_0$):

$$\mathcal{A}_0 = \max \begin{cases} A_0 \\ 2\mathcal{A}_0' = A_0(1 - [\langle g \rangle / 2n])^{-1} . \end{cases}$$

Ha a JACOBS és mtsai (1975) által megadott Q(N, A, T) állapotösszegbe A_0 helyett $\mathcal{A}_0$-át helyettesítjük be, akkor számolásunk szerint, a gél → folyadékkristályos átmenetkor bekövetkező térfogatváltozás már pozitívnak adódik és meglehetősen jó egyezést mutat a kísérleti eredményekkel (lásd 2. táblázat).

Megjegyezzük még, hogy az $\mathcal{A}_0$ kiszámításához ismernünk kell az átlagos gauche számot ($\langle g \rangle$). Szerencsére a $\langle g \rangle$-ot megadó

$$\langle g \rangle = - kT \frac{\partial \ln Q_{II}}{\partial \varepsilon}$$

képletben nem szerepel $\mathcal{A}_0$ explicite, ezért nem szükséges ön-konzisztens közelítéssel számolnunk.

Az izotróp nyomás energiája. Ha a membránra izotróp nyomás (légnyomás vagy hidrosztatikai nyomás) hat a rendszer energiájának megadásakor új energiatagot, a nyomási energiát is figyelembe kell venni (E_p):

$$E_p = -pV = -p\mathcal{A}_0(\alpha + 1)\, 2\langle l \rangle,$$

ahol p a nyomás, V a membrán térfogata $2\langle l \rangle$ a membrán átlagos vastagsága. Az átlagos molekulahosszt ($\langle l \rangle$) a JACOBS és mtsai (1977) által megadott képlet szerint számítjuk:

$$\langle l \rangle = \frac{1}{2}(m + \langle i \rangle + 1) + f,$$

ahol f a fejcsoportok hossza [f = 8 Å (PHILLIPS és mtsai (1972)] és $\langle i \rangle$ az első gauche átlagos helye a láncban.

A modell eredményei

A ln Q/N mennyiség — amely arányos a membrán szabad energiájával — az (α) relatív felület függvényében ábrázolva két lokális maximummal rendelkezik. A kisebb relatív felülethez ($\alpha \simeq 0{,}035$) tartozó maximum a membrán gél fázisával, míg a nagyobb $\alpha = (\simeq 0{,}2)$-hoz tartozó maximum a folyadékkristályos fázissal kapcsolatos állapotot jelöli ki. A magasabb maximumhoz tartozó állapot a stabil. Megadható azonban (T, p) értékpárok olyan halmaza, amelyek mellett a két lokális maximum egyforma magas. Ezek az értékpárok adják a rendszer fázisátalakulási hőmérsékleteit (T_m) és a hozzájuk tartozó fázisátalakulási nyomásokat (p_m). Ezen hőmérséklet és nyomás értékek mellett a membrán átmeneti fázisban van. A 2. táblázatban feltüntettük a fázisátalakulás jellemző mennyiségeit: a T_m, p_m mellett az átalakulási entalpiát, a térfogat-, membrán vastagság-, felület-, gauche számváltozás értékeit kü-

2. táblázat

Foszfolipid membránok

	P_m	T_m	ΔH	$\langle l \rangle_t$	$\langle \Delta l \rangle$	A_t
	MPa	°C	kJ/mol	Å	Å	Å²
DMPC	0,1	24,5	33	20,5	−3,9	51,6
n = 14						
678 g/mol	0,1	23,3 (J)	28,2 (H)			
	0,1	41,7	46,1	21,5	−5,5	54
	0,1	41,4 (J)	41,4 (H)	21,6 (C)	−3 (C)	56,3
DPPC						
n = 16	40	48,8		21,6	−5,45	53,42
734 g/mol	40	50				
DSPC	0,1	55,5	58,9	22,5	−7,1	55,7
n = 18						
790 g/mol	0,1	54,3 (J)	46,1 (H)			

(C) CHAPMAN és mtsai (1967).
(H) HINZ és STURTEVANT (1972).
(J) JACOBS és mtsai (1977) cikkéből vett átlagolt értékek.
(L) LIU és KAY (1977).
(N) NAGLE és WILKINSON (1978).
(S) DE SMEDT és mtsai (1979).
(Y) YELLIN és LEVIN (1977).
f index jelöli a folyadékkristályos fázisra vonatkozó adatokat

lönböző foszfolipid membránok esetén. Ahol erre módunk volt feltüntettük a számolt értékek mellett a kísérleti adatokat is.

A rendszer entalpiáját (H) a következő képlet alapján számoltuk:

$$H = -\partial \ln Q/\partial(1/kT) = N[2\langle g \rangle \varepsilon + H_s(2n + \delta)/(\alpha + 1)] + pV,$$

a dP_m/dT_m kiszámításakor pedig a Clapeyron egyenletet használtuk.

A 2. táblázat alapján látható, hogy a különböző foszfolipid membránok fázisaira jellemző számolt és mért mennyiségek nagyságrendi egyezést mutatnak. Különösen jó értékeket kaptunk a folyadékkristályos fázisok esetében. Megjegyezzük azonban, hogy a mérési eredmények multilamelláris rendszerek vizsgálatából adódtak és a multilamelláris rendszerek struktúrája csak T_m fölött tekinthető az egy lamellából felépülő membránokkal analóg struktúrájúnak. Így nem várható, hogy az egy lamellára vonatkozó modell eredményei tökéletesen egybevethetők a 2. táblázat kísérleti adataival.

A modellünkből számolt entalpiaváltozás (ΔH) értékek kb. 4 kJ/mol-lal jobban megközelítik a kísérleti adatokat, mint a JACOBS által számolt értékek. A ΔH számolt értékek szisztematikus eltérése a kísérleti értékektől, a fentieken kívül, abból is adódik, hogy a modell függetlenül a szomszédos CH_2 csoportok

számított és mért adatai

ΔA	$o\mathcal{A}_{el}$	$\Delta o\mathcal{A}_0$	V_l	ΔV	dP_m/dT_m	$\langle g_t \rangle$	$\langle \Delta g \rangle$
Å²	Å²	Å²	Å³	Å³	MPa/°C		
10	43,8	3,8	1060	42,5	4,99	3,4	3,3
			1096 (N)	30,5 (N)	4,9 (S)	3,5 (Y)	2,5 (Y)
12,6	45,1	5,1	1160	43,3	5,45	4,7	4,6
13,8			1218 (N)	45,3 (N)	4,37 (S)	4,5 (Y)	3,5 (Y)
12,25	44,95	4,9	1154	41,35	5,62	4,6	4,5
				45 (L)			
14,5	46	6	1254	37,1	6,18	6	5,8
			1347 (N)	59,3 (N)		6,5 (Y)	4 (Y)

Δ a folyadékkristályos minusz a gél fázisra vonatkozó adat
P_m: átalakulási nyomás
T_m: átalakulási hőmérséklet
H : entalpia
l : a membrán vastagság fele
A : membrán felület/molekula
$o\mathcal{A}_0$: szorosan pakolt felület/molekula
V : térfogat/molekula
g : gauche szám /molekula

állapotától minden CH_2 csoport esetében három (g^+, g^-, t) állapotot enged meg, ez nagyobb entrópiaváltozást és így nagyobb entalpiaváltozást eredményez.

Modellünkben direkt módon figyelembe vettük $o\mathcal{A}_0$ megadásakor, hogy a fejcsoportok helyigénye all-trans állapotú láncok esetén nagyobb, mint a fejekhez kapcsolódó láncpárok keresztmetszete. ($A_0 = 40$ Å² és $2A_0' = 38{,}5$ Å² [Scott és Cheng (1979)]. Ha eltekintünk ettől a különbségtől, akkor modellünkből a kísérleti eredményeknél mintegy háromszor nagyobb 10—15%-os térfogatváltozások számolhatók.

Eredményeink szerint, ellentétben a kísérleti eredményekkel, növekvő szénlánchossz esetén csökken a számolt térfogatváltozás. Erre vonatkozóan semmilyen magyarázatot nem tudunk adni. A dP_m/dT_m esetében talált eltérő viselkedés már értelmezhető ΔH és ΔV hibájával.

Végül lényegesnek tartjuk kiemelni, hogy a fej—víz, fej—fej kölcsönhatást jellemző $H_s\delta/(\alpha+1)$ mennyiség pozitív, azaz taszítást jelent. A víz membrán szerkezetet lazító hatását egyébként a foszfolipid-víz rendszerek fázisdiagramja is jól mutatja [Sugár (1980)]. 20% víztartalom alatt ugyanis a

víztartalom csökkenésével nő a multilamelláris rendszer termostabilitása. A víz szerkezetlazító hatására utalnak GERSHFELD (1968) monolayerek kohéziós energiájára vonatkozó mérései. Monolayerek esetében ugyanis, a kohéziós energia a hosszú szénhidrogén láncok szublimációs hőjének csupán egyötöde.

IRODALOM

BÁTHORI, Gy.: Személyes közlés (1980).

COSTER, H. G. L., U. ZIMMERMANN: The mechanism of electrical breakdown in the membranes of Valonia utricularis J. Membrane Biol. **22,** 73—90 (1975).

DE SMEDT, H., R. BOBGHGRAEF, F. CEUTERICK, K. HERMANS: Pressure effects on lipid-protein interactions in ($Na^+ + K^+$)-ATPase Biochim. Biophys. Acta **556,** 479—489 (1979).

FLORY, P. J.: Statistical Mechanics of Chain Molecules Wiley-Interscience, New York Chap. III. p. 63. (1969).

GERSHFELD, N.: Cohesive forces in monomolecular films at air-water interface Adv. Chem. Ser. **84,** 45—130 (1968).

HUI, S. W., M. COWDEN, D. PAPAHADJOPOULOS, D. F. PARSONS: Electron diffraction study of hydrated phospholipid single bilayers. Effect of temperature, hydration and surface pressure of the „precursor" monolayer. Biochim. Biophys. Acta **382,** 265—275 (1975).

HUI, S. W.: The tilting of the hydrocarbon chains in a single bilayer of phospholipid. Chem. Phys. Lipids. **16,** 9—18 (1976).

JACOBS, R. E., B. S. HUDSON, H. C. ANDERSEN: A theory of the chain melting phase transition of aqueous phospholipid dispersions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72,** 3993—3997 (1975).

JACOBS, R. E., B. S. HUDSON, H. C. ANDERSEN: A theory of phase transitions and phase diagrams for one- and two-component phospholipid bilayers. Biochemistry **16,** 4349—4359 (1977).

JANIAK, M. J., D. M. SMALL, G. G. SHIPLEY: Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimiristoyl- and dipalmitoyllecithin. Biochemistry **15,** 4575—4580 (1976).

LIU, N. I., R. L. KAY: Redetermination of the pressure dependence of the lipid bilayer phase transition. Biochem. **16,** 3484—3486 (1977).

MARSH, D., A. WATTS, P. F. KNOWLES: Cooperativity of the phase transition in single- and multibilayer lipid vesicles Biochim. Biophys. Acta **465,** 500—514 (1977).

NAGLE, J. F.: Theory of lipid monolayer and bilayer phase transitions: effect of headgroup interactions J. Membrane Biol. **27,** 233—250 (1976).

NAGLE, J. F., D. A. WILKINSON: Lecithin bilayers. Density measurements and molecular interactions Biophys. J. **23,** 159—175 (1978).

PHILLIPS, M. C., E. G. FINER, H. HOUSER: Differences between conformations of lecithin and phosphatidylethanolamine polar groups and their effects on interactions of phospholipid bilayer membranes Biochim. Biophys. Acta **290,** 397—402 (1972).

SCOTT, H. L., W. H. CHENG: A theoretical model for lipid mixtures, phase transitions, and phase diagrams. Biophys. J. **28,** 117—132 (1979).

SUGÁR, I. P.: A theory of the electric field-induced phase transition of phospholipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta **556,** 72—85 (1979).

SUGÁR, I. P.: On the phase diagram of dipalmitoylphosphatidylcholine Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **15,** 73—75 (1980).

SZŐGYI, M., T. CSERHÁTI, J. SZABON: MTA Biol. Oszt. Közl. **24,** 201—207 (1981).

TRÄUBLE, H.: The movement of molecules across lipid membranes: a molecular theory. J. Membrane Biol. **4,** 193—208 (1971).

TBÄUBLE, H., D. H. HAYNES: The volume change in lipid bilayer lamellae at the crystalline-liquid crystalline phase transition. Chem. Phys. Lipids **7,** 324—335 (1971).

TRÄUBLE, H., M. TEUBNER, P. WOOLLEY, H. EIBL: Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effects of pH and univalent cations on membrane structure. Biophys. Chem **4,** 319—342 (1976).

WAKAYAMA, N., T. OSHIMA: Membrane properties of an extreme thermophile. J. Biochem. **83,** 1687—1692 (1978).

YELLIN, N., I. W. LEVIN: Cooperative unit size in the gel-liquid crystalline phase transition of dipalmitoyl phosphatidylcholine-water multilayers: an estimate from Raman spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta **468,** 490—494 (1977).

SZERKEZET ÉS FUNKCIÓ VIZSGÁLATOK LIPID VEZIKULÁKON*

BÁTHORI GYÖRGY*, HOLLY SÁNDOR+, GRANDICS PÉTER" és NÁRAY ANIKÓ"

* Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Biofizikai Intézet,
+ MTA Központi Kémiai Kutató Intézete,
" Semmelweis Orvostudományi Egyetem, II. sz. Kémiai-Biokémiai Intézet

Jelen munka célkitűzése az volt, hogy tanulmányozzuk a lipid kettősréteg folyadékkristályos fázisátalakulásának szerepét különféle biológiai funkciókban (alkáliion transzport, membrán fúzió és lízis). Erre a célra legalkalmasabbnak az ún. lipid vezikula bizonyult, amely jól modellezi az élő sejt membránjának biomolekuláris lipidrétegét. Izoláltan (más biológiai folyamatoktól függetlenül) tanulmányozható rajta a célkitűzésben említett mindhárom funkció, ugyanakkor egyértelműen mutatja a lipidek folyadékkristályos fázisátmenetét is. A lipid vezikulák előállítása céljából módosítottuk a KREMER (1977) által leírt módszert. Az így előállított liposzómák viszonylag nagyátmérőjűek (100—200 nm), homogén méreteloszlásúak voltak és nem tartalmaztak lipid bomlástermékeket, valamint oldószer (alkohol) maradványokat. A fázisátalakulások detektálására apparens abszorpció elvén alapuló optikai módszert dolgoztunk ki. A lipid kettősréteg molekuláris szerkezetében és mozgásaiban a fázisátalakulás során létrejövő változások felderítésére infravörös spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk. Tekintettel a víz erős abszorpciójára az infravörös tartományban, mintáink mérésére Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai (FT-IR) módszert alkalmaztunk, amelynek segítségével a lipid molekula fejcsoportjának rezgési színképe tanulmányozható. Erről a régióról relatíve kevés információ áll rendelkezésre, ugyanakkor mind a transzporthoz szükséges lipid-ion kölcsönhatásban, mind a fúzió első lépésében a két vezikula közti fal—fal kölcsönhatásban kulcsszerepet játszik.

Végül egy modellrendszert fejlesztettünk ki a lipid vezikula-élősejt kölcsönhatás (fúzió) tanulmányozására. Kísérleteinkben patkány timusz limfocitákba juttattunk be különféle anyagokat a vezikulák segítségével. Ezek a kísérleteink egyúttal a vezikulák egyik gyakorlati alkalmazhatóságának (célzott intracelluláris gyógyszer bejuttatás) irányába mutatnak.

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

Felhasznált anyagok és módszerek

A lipid vezikulákat részben szintetikus lecitinből (dipalmitoilfoszfatidilkolinból, DPPC Merck) részben tojás-lecitinből készítettük.

Az elektronmikroszkópos felvételek szerint vezikuláink egyrétegűek voltak, nem tartalmaztak többszörös kettősrétegű frakciókat. Átmérőjük kb. 120 nm; a méreteloszlásuk csak abban az esetben homogén, ha kiinduláskor alkalmazott etanol oldat nem tartalmaz 10 mg-nál több lecitint milliliterenként és az injektálás legalább 10 ml vizes oldatba történik. Ennél nagyobb lecitin, ill. alkohol mennyiségek alkalmazása során mind az analitikus UC, mind az oszlopkromatográfia tanúsága szerint a méreteloszlás inhomogénné vált.

Az infravörös spektroszkópiai mérések az esetek túlnyomó részében nem mutattak ki alkoholt a készítményekben (két esetben maradt vissza alkohol).

Vizsgálataink során meghatároztuk, hogy a vezikulák hány százalékát zárták be annak az oldatnak, amelyben készítettük őket. A meghatározás az oldatban levő anyagok mennyisége alapján történt. Erre a célra mintegy tíz alkalommal 0,1 M dinátrium hidrogénfoszfátot, két esetben triciált c-AMP-t egy alkalommal pedig triciált GDP-t használtunk. A fúziós kísérletek során a patkány timusz limfocitákba triciált c-AMP-ot, triciált GDP-t, piridoxálfoszfátot és jelzetlen c-AMP-ot juttattunk be. A β-méréseket Packard gyártmányú β-folyadékszcintillációs készüléken végeztük.

A vezikulákat KREMER módszere szerint állítottuk elő. Esetenként 1, illetve 10 ml kevert vizes oldatba különféle lipid koncentrációjú etanol oldatot fecskendeztünk be. Az injektálás konstans sebességét egy automata injektáló eszközzel (Infumat, MTA KUTESz) biztosítottuk. Az elkészült oldatból az alkoholt dializálással, néhány esetben diafiltrálással (Amicon diafiltráló cella) távolítottuk el. Egyes esetekben vákuum desztillálást (Rotadeszt, MTA KUTESz) alkalmaztunk.

A vezikulaátmérő méreteloszlását részben oszlopkromatográfiával (Sepharose 4B), részben analitikus ultracentrifúgával ellenőriztük.

A fázisátalakulás detektálására alkalmazott apparens abszorpció elvének lényege, hogy a különféle kolloid méretű részecskék az átmérőjük nagyságrendjébe eső hullámhosszúságú fényt erősen szórják, s ezt egy közönséges spektrofotométerben intenzitáscsökkenésként észleljük.

Méréseink során a lipid vezikulákat tartalmazó mintát egy Perkin-Elmer 200 típusú UV-VIS spektrofotométerben programozottan felfűtöttük, majd hűtöttük (sebessége 0,2—1,0 fok/perc között volt változtatható). A minta hőmérsékletét egy termoelem segítségével elektronikusan detektáltuk. A jelet megfelelő erősítés után egy XY-író (EMG NE 230) X tengelyére vittük. Az Y tengelyre a spektrofotométer analóg kimenetéről levett jelet kapcsoltuk.

Az infravörös spektroszkópiai méréseket a MTA Központi Kémiai Kutató Intézetében egy Nicolet 7199 típusú rendszeren végeztük. KRS-5-ből

készült küvettát használtunk (20 μm rétegvastagság). Első lépésben többször felvettük az adott hőmérsékleten az oldószerek (víz, 0,1 M KCl) spektrumát, majd ezek átlagát a készülék memóriájában tároltuk. Ezután ugyanilyen körülmények között elkészítettük a lipid vezikula és víz együttes spektrumát. Ezen spektrumokból készített átlagspektrumból — a beépített számítógép segítségével — kivontuk a víz átlagspektrumát. Ezeknél a méréseknél 1 ml vizes oldószer kb. 50 mg DPPC-t tartalmazott.

Eredmények, diszkusszió

1. A fázisátalakulás detektálása apparens abszorpció segítségével:

Az 1. és 2. ábra lipid vezikulák, illetve összehasonlításul lipid diszperziók fázisátalakulását mutatja. Az ábrák tanúsága szerint a két folyamat néhány részletben eltér egymástól. Diszperziók esetében a 41,5 °C-nál található ún. főátmenet szűkebb hőmérséklet-tartományban megy végbe, valamint 25 és 30 fok között egy előátmenet, az ún. pretransition található. Az utóbbi átmenet hiszterézissel bír és feltehetőleg a vezikulák aggregációjához rendelhető (Petersen és Chan 1978).

A vizsgálatokban mért fázisátalakulási hőmérséklet megegyezik a DSC-vel mért értékkel (Szőgyi és mtsai 1980).

2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai vizsgálatok:

Az infravörös spektrumban látható abszorpciós sávok a lipid molekulák funkcióscsoportjainak rezgőmozgásaitól (vibrációk) származnak. A molekula vibrációs spektrumának változásaiból a molekula konformációjának változásaira is következtethetünk.

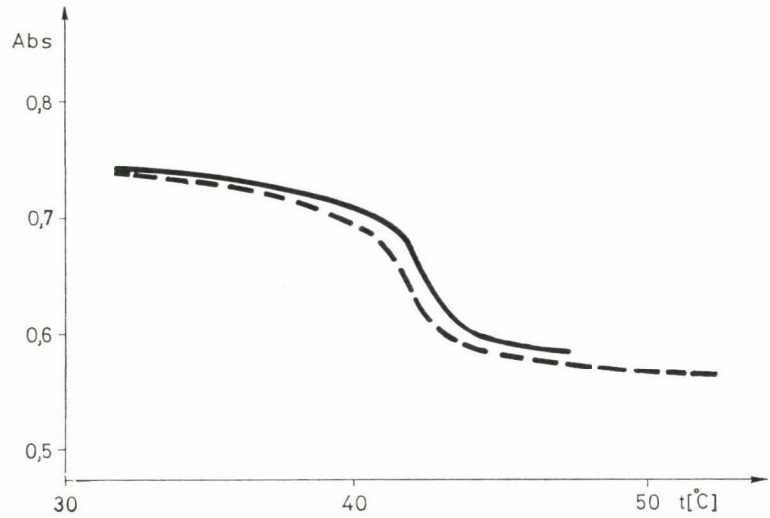
Vizsgálatainkat 28 °C, 37 °C, 42 °C és 48 °C-on végeztük. Ezek közül négy spektrumkészletet mutatunk be illusztrációképpen a 3—6. ábrákon. A spektrumokat a beépített számítógép segítségével elemeztük és megállapítottuk, hogy:

— A metiléncsoport szimmetrikus és aszimmetrikus vegyértékrezgése a magasabb frekvenciák felé tolódott el.
— A foszfátcsoport vegyértékrezgésében nem tapasztaltunk a sáv helyében és alakjában változást. A spektrumban tapasztalható változások mind az intramolekuláris, mind az intermolekuláris rend változására felvilágosítást adnak. Példaként tekintsük a szimmetrikus CH_2 vegyértékrezgést. Az intermolekuláris rend változása intenzitásbeli változást, az intramolekuláris rendé pedig hullámhossz-eltolódást, valamint kisebb mértékben intenzitásváltozást okoz (Gaber és Peticolas 1977).

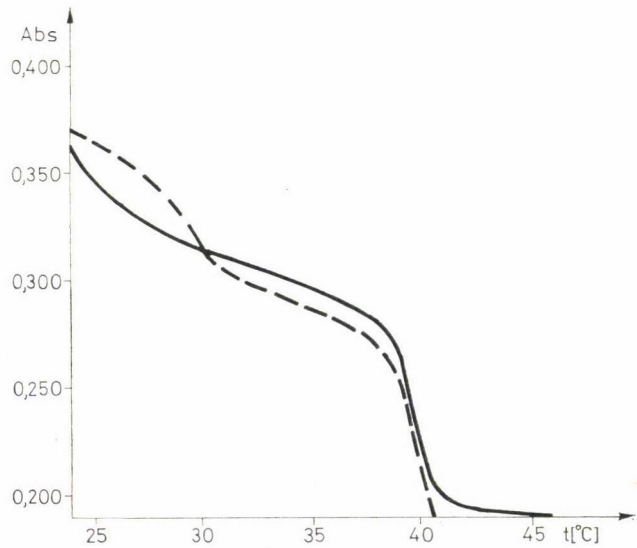
A fenti eredmények általában megegyeznek Cameron és mtsai (1978, 1980) lipid diszperziókon nyert adataival. Egyetlen jelentős különbség, hogy 48 °C-on a vezikulák metiléncsoportjainak aszimmetrikus C—H vegyérték-

rezgési sávja a folyadékkristályos állapotban felhasad (2923 cm^{-1}). Ezt a vezikulák és a diszperziók közti finomabb szerkezeti különbségek következményének tartjuk.

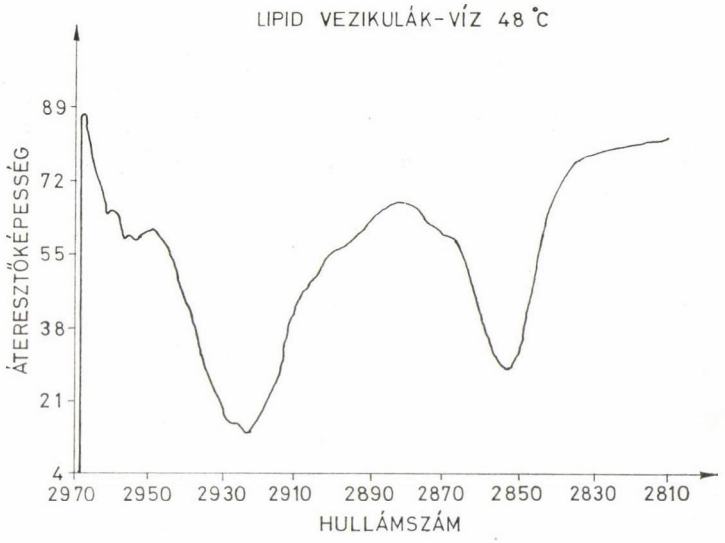
Elkészítettük a lipid vezikulák spektrumát 0,1 M KCl-ot tartalmazó vizes közegben is. Itt azt tapasztaltuk, hogy a foszfát, valamint a szén—



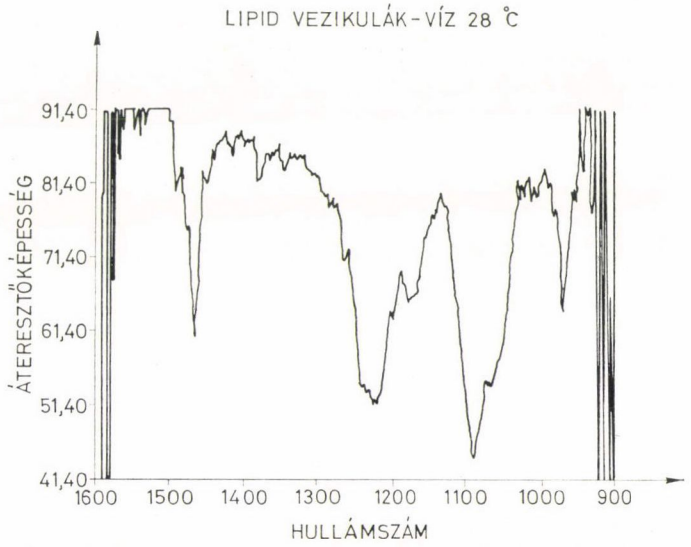
1. ábra. Dipalmitoilfoszfatidilkolin lipid vezikulák fázisátalakulása. Szaggatott vonal: fűtés, folytonos vonal: hűtés. Fűtési sebesség 20 °C/óra



2. ábra. Dipalmitoilfoszfatidilkolin diszperzió fázisátalakulása. Szaggatott vonal: fűtés, folytonos vonal: hűtés. Fűtési sebesség 20 °C/óra



3. ábra. Spektrumrészlet a metiléncsoport vegyértékrezgéseinek régiójából

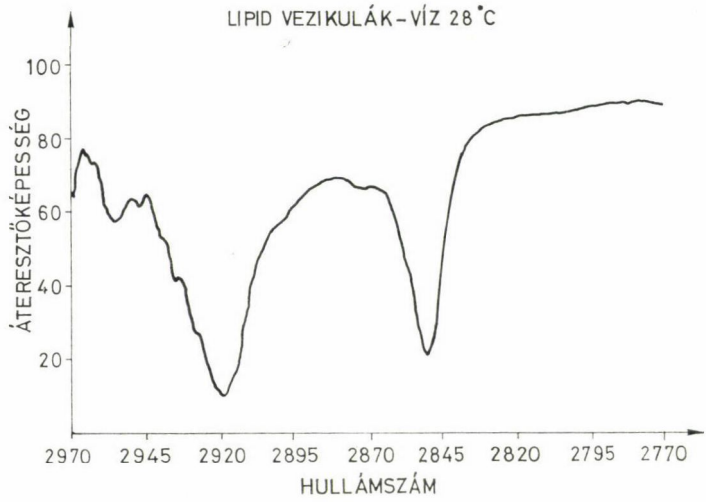


4. ábra. Spektrumrészlet a foszfátcsoport vegyértékrezgéseinek régiójából

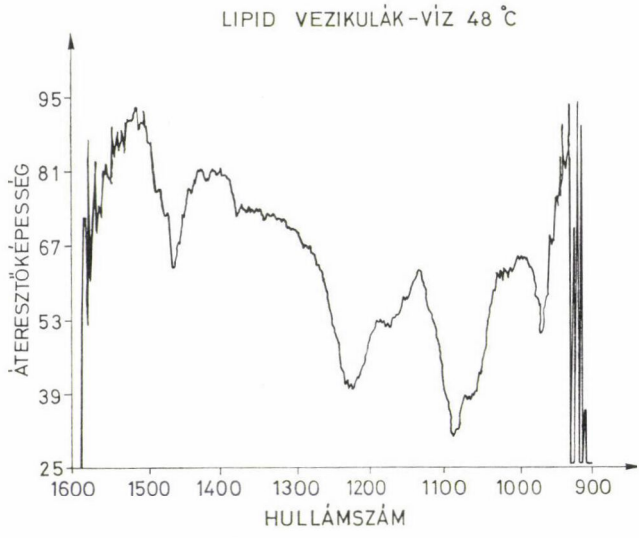
oxigén kötés vegyértékrezgéséhez tartozó sávegyüttes alakváltozást szenvedett a vízben felvett spektrumokhoz képest (1100 és 1000 cm^{-1} között). A változásért feltehetőleg a kálium ionok töltésárnyékoló hatása a felelős.

3. Fúziós kísérletek:

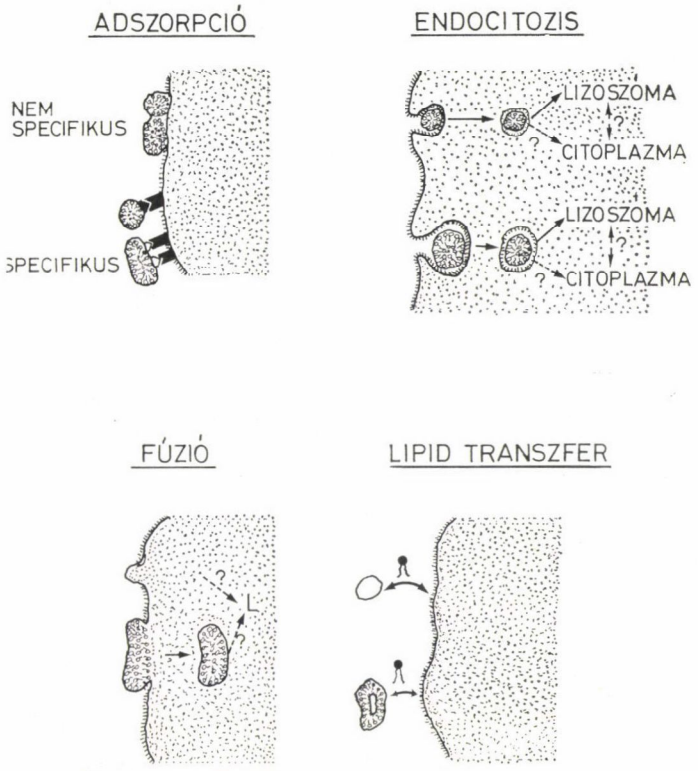
Meghatároztuk három különféle anyag segítségével, hogy az általunk készített lipid vezikulák optimális esetben a kiválasztott anyagnak hány százalékát tudják magukba zárni. Méréseink szerint a bezárt térfogat 10—15% közötti értékeket vehet fel. Megállapítottuk, hogy a patkány timusz limfociták a tojáslecitinből készült vezikuláknak csupán 1—2%-át veszik fel, ami azonban kb. 400 db vezikulát jelent sejtenként. Figyelembe véve a 10—15%-os



5. ábra. Spektrumrészlet a metiléncsoport vegyértékrezgéseinek régiójából



6. ábra. Spektrumrészlet a foszfátcsoport vegyértékrezgéseinek régiójából



7. ábra. A lipid vezikulák és sejtek kölcsönhatásának különféle módozatai

bezárt térfogatot ez egy rendkívül rossz bejuttatási hatásfokot jelent. Ezért a módszer csak biológiailag igen aktív anyagok esetén használható. Ebből a meggondolásból esett a választásunk a c-AMP-ra. A c-AMP hatását a limfociták szteroidkötő képességének változásával teszteltük és megállapítottuk, hogy a kötőképességet mintegy 160%-kal lehet növelni a kezeletlen kontrollhoz képest. A c-AMP önmagában hatástalan, mivel nem jut be a sejtbe.

A semleges lipidekből pl. lecitinből készült vezikulák és a sejtek közti kölcsönhatás lehetséges módozatairól jelenleg az irodalomban vita folyik (Poste és Papahadjopoulos 1978, Pagano és mtsai 1978). Kísérleteink Pagano és Huang álláspontját látszanak alátámasztani, amely szerint semleges lipidekből készült, folyadékkristályos állapotú vezikulákkal is létrehozható az élősejt — vezikula fúzió. A 7. ábrán a kölcsönhatás lehetséges módozatai láthatók, Pagano szerint.

A meglevő eredményeink és az irodalomban észlelhető tendenciák alapján vizsgálatainkat szeretnénk kiterjeszteni összetett (többféle lipidet tartalmazó) rendszerekre is. A transzport témakörben elsősorban a lipid—ion kölcsönhatás vizsgálatának kiszélesítését tervezzük a FT-IR technikával. Vizsgálni

kívánjuk néhány módosító anyag hatását a lipid struktúrákra (a vibrációs spektrumokra). A fúziós vizsgálatok folytatásánál, együttműködések segítségével, a gyakorlati hasznosítást szeretnénk célul kitűzni. Ezen a területen a lehetőségek szinte korlátlanok (GREGORIADIS 1980).

IRODALOM

CAMERON, D. G., MANTSCH, H. H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **83,** 886—892 (1978).
CAMERON, D. G., CASAL, H. L., MANTSCH, H. H.: J. Biochem. Biophys. Meth. **1,** 21—36 (1979).
GABER, B. P., PETICOLAS, W. L.: Biochim. Biophys. Acta **465,** 260—274 (1977).
GREGORIADIS, G.: Nature **283,** 814 (1980).
KREMER, J. W. H., v. d. ESKER, M. W. J., PATHMAMAHARAN, C., WIERSEMA, P. H.: Biochemistry **16,** 3932—3935 (1977).
PAGANO, R. E., WEINSTEIN, J. N.: Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **7,** 435—468 (1978).
PAGANO, R. E., SANDRA, A., TAKEICHI, M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **308,** 185—199 (1978).
PETERSEN, N. O., CHUAN, S. I.: Biochim. Biophys. Acta **509,** 111—128 (1978).
POSTE, G., PAPAHADJOPOULOS, D.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **308,** 164—184 (1978).
SZŐGYI, M., CSERHÁTI, T., SZABON, J.: Biol. Oszt. Közl. **24,** (1981).

LIPID—VÍZ DISZPERZIÓK FÁZISÁTALAKULÁSÁNAK VIZSGÁLATA TERMO-DEPOLARIZÁCIÓS ANALÍZISSEL (TDA)*

SZABON JÁNOS és TÖLGYESI FERENC*

MTA Központi Fizikai Kutató Intézete,
* Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest

A lipid—víz diszperziók fizikai tulajdonságaik alapján a liotróp folyadékkristályok csoportjába tartoznak. A liotróp folyadékkristályok szinte minden élő rendszerben megtalálhatók (sejtmembránok lipid kettősrétege, velő szürke állománya, az idegrostok mielinrétege).

A liotróp folyadékkristályok is, mint általában a folyadékkristályok, optikailag anizotrópok (BATA 1973). Ennek alapján a bennük végbemenő szerkezetváltozások kimutatására felhasználhatjuk a termotróp folyadékkristályok vizsgálatánál már eddig is alkalmazott termooptikai módszereket. Ilyen módszer a termo-depolarizációs analízis (TDA).

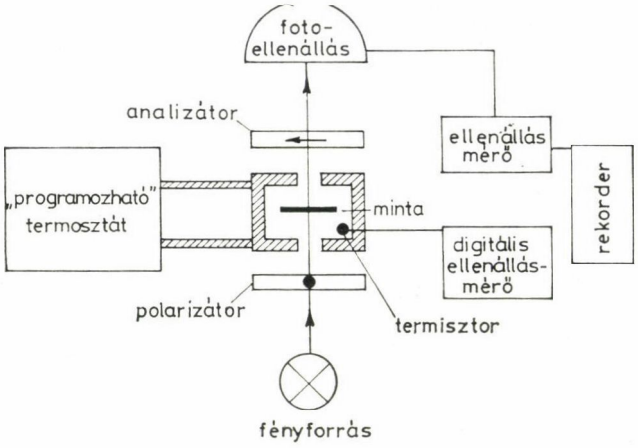
Munkánkban ismertetjük a módszer elvét, bemutatjuk a vizsgálatokhoz összeállított mérőrendszert, beszámolunk az első mérési eredményekről, amelyeket DPPC** + víz, ill. DPPC + víz + felületaktív anyag diszperziókon nyertünk. Összehasonlítást teszünk a TDA és DSC módszerek érzékenysége között.

Mérési módszer

A termo-depolarizációs analízis elve igen egyszerű. Ha a vizsgálandó anyagot (folyadékkristályt) síkban polarizált fénnyel világítjuk meg, a folyadékkristályok optikai anizotrópiája miatt a fénysugár az anyagon áthaladva depolarizálódik. Ha külső hatásra (pl. melegítésre) a folyadékkristály szerkezete, molekuláinak rendezettsége módosul, az átbocsátott fénysugár depolarizáltsága is változik. Mérve a depolarizált fény intenzitását információt nyerhetünk a fázisátalakulás hőmérsékletéről, kinetikájáról.

Az 1. ábrán láthatjuk a fönti elvre épített mérőkészüléket. A kontakthőmérős termosztáttal egyenletes sebességgel ($\sim$0,01—4,6 °C/perc) lehet fűteni, ill. hűteni a mintát. A berendezés optikai része egy polarizációs mikroszkóp keresztezett állású polarizátorokkal. A fényintenzitás mérésére fotoellenállást és analóg kimenetű ellenállásmérőt használunk. A minta, pontosabban a

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.
** DPPC = dipalmitoil-foszfatidilkolin



1. ábra. Mérőkészülék termo-depolarizációs analízisre

minta közvetlen környezetének hőmérsékletét termisztor — digitális ellenállásmérő párral mérjük, miután a termisztort előzőleg hitelesítettük. A hőmérsékletmérés pontossága 0,1 °C.

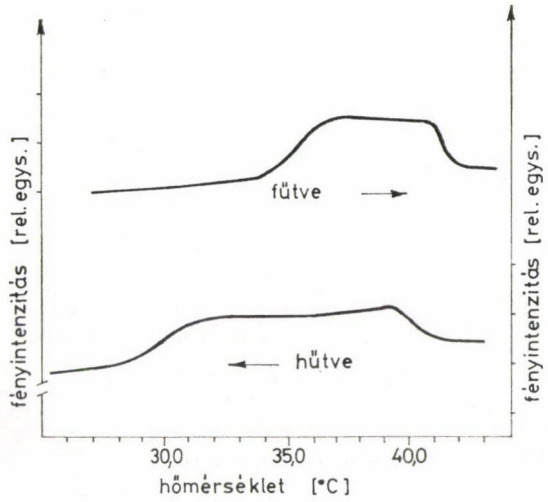
A termotróp folyadékkristályok körében már régóta végeznek TDA vizsgálatokat (Barrall és Sweeney 1968, Miller 1972, Suter 1974), de liotróp folyadékkristályokon tudomásunk szerint eddig nem történtek ilyen mérések.

Az egyik leggyakrabban vizsgált foszfolipid a DPPC, ezért első méréseinket ezzel az anyaggal végeztük.

Koch—Light gyártmányú DPPC-ből és vízből diszperziót készítettünk úgy, hogy a megfelelő mennyiségeket összemérve az elegyet — a DPPC fő fázisátalakulási hőmérséklete fölött — 50 °C-on összeráztuk. A DPPC koncentrációja 342 mol/m^3 volt. A diszperzióból egy keveset két gondosan megtisztított üveglap közé helyeztünk. A vizsgálandó réteg vastagsága így legfeljebb néhány mikrométer volt.

Mérési eredmények

A fenti módszerrel kapott TDA-görbét a 2. ábrán láthatjuk. Az első fázisátalakulás fűtésnél 34,1—36,4 °C között jelentkezik. Ez az ún. „pretransition". Ez a kristályos — kristályos átmenet, amikor pl. röntgendiffrakciós mérések (Janiak és mtsai 1976) szerint egyebek mellett a lipid kettősrétegek „meggyűrődnek". Ebből eredően megnövekszik a fényszórás és ez okozhatja a depolarizált fény intenzitásának növekedését. A jól ismert fő fázisátalakulás („main transition") 40,7 — 41,4 °C között van, ekkor a lipidmolekulák szén-



2. ábra. DPPC + víz diszperzió TDA-görbéje. A fűtés, ill. hűtés sebessége 0,4 °C/perc

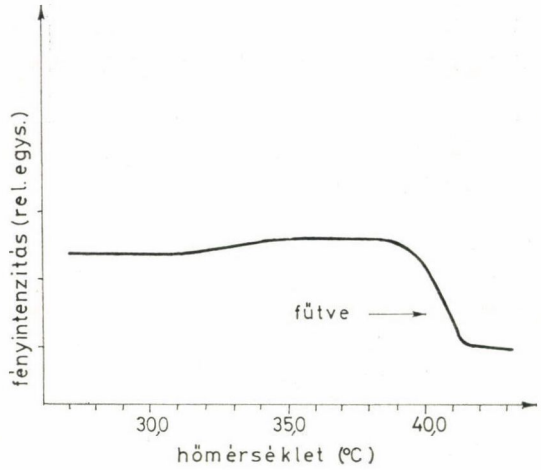
láncainak konformációja ugrásszerűen megváltozik, megnő az ún. „gauche"-ok száma (GABER és mtsai 1978). Méréseink szerint a „pretransition" túlhűthető, hűtésnél 31,3—28,4 °C között zajlik le.

SZŐGYI és mtsai vizsgálták felületaktív anyagok, a nonil-fenil-etilénoxid polimer sor hatását DPPC liposzómák permeabilitására és e hatás összefüggését az illető anyagok biológiai aktivitásával (SZŐGYI és mtsai 1980). Kísérleteik szerint a leghatékonyabbnak a 9 etilénoxidot tartalmazó tag bizonyult. Ehhez a kísérletsorozathoz kapcsolódva megmértük ez utóbbi felületaktív anyag hatását a DPPC + víz diszperzió fázisátalakulási hőmérsékleteire. A mintakészítés az előzőekben már leírt módon történt, azzal a különbséggel, hogy most a diszperzióhoz az említett felületaktív anyagból is adtunk, 38 mol/m^3 koncentrációban. Eredményül a 3. ábrán látható görbét kaptuk.

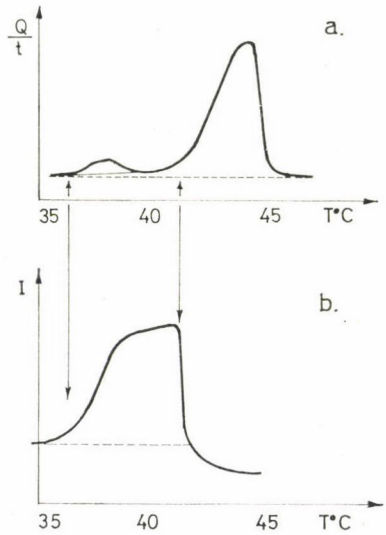
A változás az előbbi görbéhez képest szembetűnő: a „pretransition"-kor fellépő intenzitásnövekedés jelentősen lecsökkent; másrészt mind a két fázisátalakulás az alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódott el (31,6—34,5 °C, ill. 40,1—41,2 °C), a „pretransition" jelentősebb mértékben. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vizsgált felületaktív anyag a „pretransition" jelenségére van nagyobb hatással.

A fázisátalakulások vizsgálatára az egyik legelterjedtebb módszer a differenciál szkenning kalorimetria (DSC). Annak érdekében, hogy ezzel összehasonlíthassuk a TDA-t, a két módszerrel párhuzamosan végeztünk méréseket. Mintaként ismét a fentebb leírt DPPC + víz diszperzió szerepelt. Eredményünk a 4. ábrán látható.

Az összehasonlításból kitűnik, hogy — ellentétben a DSC-vel — a TDA módszerrel ugyanolyan érzékenyen tudjuk detektálni a „pretransition"-t



3. ábra. DPPC + víz + felületaktív anyag diszperzió TDA-görbéje. A fűtés sebessége 0,4 °C/perc



4. ábra. DPPC + víz diszperzió DSC (a) és TDA (b) görbéje azonos fűtési sebesség mellett

mint a fő fázisátalakulást. Termotróp folyadékkristályokkal végzett mérések tapasztalata szerint van olyan átalakulás, amelyet DSC-vel nem lehet észlelni, TDA-val viszont igen; ez igaz fordítva is (SUTER 1974). Így a két módszer együttes alkalmazása látszik célszerűnek. A TDA módszer további előnye — mint láttuk — hogy nem igényel drága műszert és a vizsgálatokhoz kis anyagmennyiség is elegendő.

IRODALOM

BARRALL, E. M., J. SWEENEY: Mol. Cryst. Liq. Cryst. **5**, 257 (1968).
BATA, L.: Folyadékkristályok, jegyzet KFKI (1973).
GABER, B. P., M. YAGER, W. L. PETICOLAS: Biophys. J. **21**, 161 (1978).
JANIAK, M. J., D. M. SMALL, G. G. SHIPLEY: Biochem. **15**, 4575 (1976).
MILLER, G. W.: Thermochimica Acta **3**, 467 (1972).
SUTER, H.: G-I-T Fachzeitschrift für das Laboratorium **18**, 1251 (1974).
SZŐGYI, M., CSERHÁTI, T., SZABON J.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, (1981).

MEMBRÁNMŰKÖDÉST BEFOLYÁSOLÓ ANYAGOK VIZSGÁLATA MESTERSÉGES MEMBRÁNON*

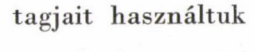
SZŐGYI MÁRIA, CSERHÁTI TIBOR* és SZABON JÁNOS**

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, * Növényvédelmi Kutató Intézet, ** Központi Fizikai Kutató Intézet

A hatóanyag szervezetbe, sejtekbe való bejuttatásához gyakran használnak felületaktív anyagokat. Számos irodalmi adat (LEVY és mtsai 1966, SUZUKI és mtsai 1967, GIBALDI, FELDMAN 1970) utal arra, hogy gyógyszerek pl. barbiturátok, szulfonamidok, antibiotikumok felszívódása, vérszintje szignifikánsan megnő nem-ionos felületaktív anyagok jelenlétében. A peszticid szerformákban alkalmazott felületaktív anyagok ugyancsak sok esetben jelentős módon megváltoztatják a hatóanyag biológiai aktivitását (VALKENBURG 1973). Tekintve, hogy a bioszférába évről évre nagyobb mennyiségbe kerülő felületaktív anyagok maguk is rendelkeznek biológiai aktivitással, szükség van pontos hatásmechanizmusuk megismerésére, molekuláris paramétereik és hatásosságuk közötti összefüggés vizsgálatára.

Munkánk célja a nem-ionos felületaktív anyagok csoportjába tartozó nonil-fenil-etilénoxid polimerek membránalkotó lipid molekulákkal való kölcsönhatásának tanulmányozása, molekula szerkezetük és hatásosságuk közötti kapcsolat vizsgálata.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez a nonil-fenil-etilénoxid polimer sor n = 4—30 etilénoxid csoportot tartalmazó tagjait használtuk . A molekula lipofil része állandó, a hidrofil rész az etilénoxid csoportok számával változtatható. Tekintve, hogy a felületaktív anyagok jelentős membránműködést befolyásoló hatással rendelkeznek, így a homológ sor tagjai ideális vegyületek a molekula struktúra és membránkárosító hatás közötti kapcsolat vizsgálatára.

Meghatároztuk a molekulák biológiai hatásának értelmezése szempontjából fontos diffúziós sajátságaikat, valamint lipofilitásukat. A diffúziós együtt-

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

ható meghatározását az általunk korábban kidolgozott eljárással végeztük (TAMÁS, SZŐGYI 1973). Az agárgélbe vitt felületaktív anyag diffúzióját desztillált víz felé vizsgáltuk. A kidiffundált felületaktív anyag koncentrációját extinkció mérés alapján határoztuk meg. A diffúziós együttható kiszámításánál a hivatkozásban közölt módon jártunk el.

A molekulák lipofilitására jellemző R_M értéket reverz fázisú vékonyréteg kromatográfiás módszerrel határoztuk meg (CSERHÁTI, JÁNOS 1980).

A felületaktív molekulák és a membrán közötti kölcsönhatás pontos felderítése érdekében a membránalkotó lipid komponensek közül dipalmitoyl foszfatidilkolinból (DPPC) készítettünk liposzómát (a Koch—Light gyártmányú lipid tisztaságát vékonyréteg kromatográfiás módszerrel ellenőriztük). A lipidet 0,16 M-os ^{42}KCl-ot tartalmazó oldatban duzzasztottuk, majd vízhűtés és nitrogén-átáramoltatás mellett 20 percig ultrahanggal besugároztuk. (A besugárzást MSE 150 wattos, 20 kHz-es dezintegrátorral végeztük.) 16—18 órával az ultrahang besugárzás után a liposzómát Sephadex G-50-ből készült kromatográfiás oszlopra vittük, hogy a külső aktív oldattól elválasszuk. A mosófolyadék 0,16 M-os KCl oldat volt, átfolyási sebessége 0,5 cm^3/perc. Az oszlopról lejövő frakciók közül aktivitás mérés [szcintillációs üreges NaI(Tl) kristály] alapján választottuk ki a továbbiakban felhasznált, legnagyobb aktivitást tartalmazó liposzóma frakciókat. A szétválasztást minden esetben a frakciók aktivitásának meghatározása révén ellenőriztük. A liposzómából 3—3 cm^3-t dializáló zsákokba mértünk. Ezek közül egyet kontrollnak tekintettünk, a többihez felületaktív anyagot adtunk (100 μg/cm^3). A dializáló zsákokban levő liposzómát 0,16 M-os inaktív KCl-t tartalmazó (10 cm^3) pohárba tettük. A külső oldatot három órán keresztül negyedóránként cseréltük és mértük a kiáramló ^{42}KCl percenkénti impulzusszámát. A kísérletet szobahőmérsékleten. ill. 42 °C-on a DPPC fázisátalakulási hőmérsékletén végeztük.

A dializáló zsákokban levő liposzóma lipid tartalmát foszforméréssel határoztuk meg.

Kísérleti eredményeink kvantitatív értékelését, a permeabilitási állandók kiszámítását JOHNSON és BANGHAM (1969) által kidolgozott módon végeztük.

DSC-módszerrel mértük a DPPC felületaktív anyagok hatására bekövetkező fázisátalakulási hőmérséklet és fázisátalakulási entalpia változását. A méréseket Perkin—Elmer DSC-2 típusú készülékkel végeztük, fűtési sebesség 1,25 °C/perc. Az entalpia változás meghatározása indium standarddal való kalibrálással történt.

A biológiai aktivitás adatokat *Bac. subtilis* törzsön határoztuk meg. Bouillon táptalajban növesztett 10^6 bakt/cm^3 kiindulási csíraszámú baktériumkultúra szaporodását mértük, rázatott tenyészetben turbidimetriás módszerrel, 600 nm hullámhosszon. A felületaktív anyag koncentrációja 30, 50 és 100 μg/cm^3 volt.

Eredmények és értékelésük

Az 1. ábrán a molekulák vizes közegben mért diffúziós egyensúlyi állandóját (D) tüntettük fel a lipofilitást jellemző R_M érték függvényében.

Mint az ábrából látható, a nonil-fenil-etilénoxid polimerek vízben mért diffúziós egyensúlyi állandója a molekulák lipofilitásának logaritmusával csökken. Kísérleti eredményeinket a következő függvénykapcsolat írja le:

$$D = a + b \log R_M$$

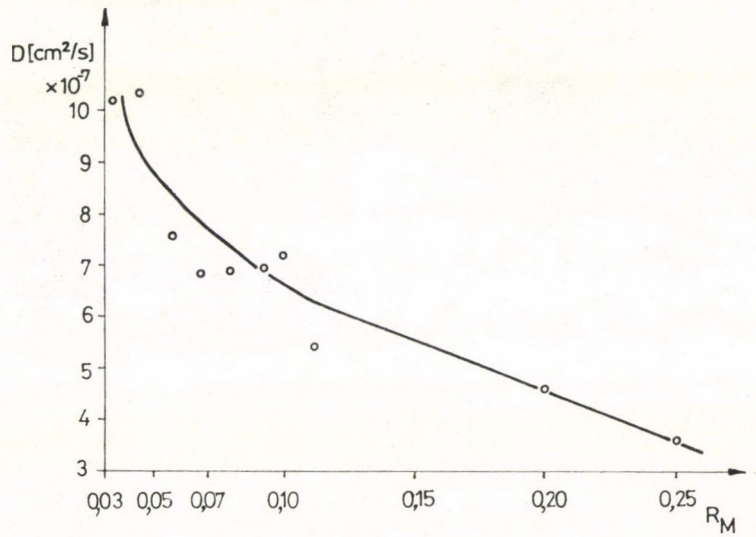
$$D = -0{,}429 - 6{,}9 \log R_M \qquad n = 68$$

$$r = 0{,}6992; \qquad r_{99\%} = 0{,}4078.$$

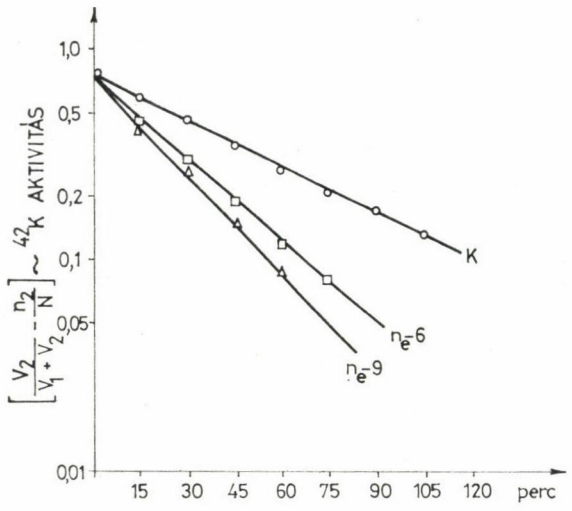
A fenti összefüggés arra az eddig nem kellő mértékben tanulmányozott jelenségre hívja fel a figyelmet, hogy a diffúziós egyensúlyi állandó a molekulasúly és a molekulaalak mellett a molekula hidratációs képességének, a molekulán belül a hidrofil és lipofil részek arányának függvénye is lehet.

A 2. ábrán azoknak a kísérleteknek az eredményét tüntettük fel, amelyeket a felületaktív molekulák liposzóma ^{42}K-leadására gyakorolt hatásának vizsgálatakor kaptunk.

A liposzóma ^{42}K-aktivitásával arányos mennyiséget ábrázoltuk az idő függvényében féllogaritmusos koordináta rendszerben. A 42 °C-on végzett mérések alapján megállapítható, hogy az $n = 6$, ill. $n = 9$ etilénoxid csoportot



1. ábra. Nonil-fenil-etilénoxid polimerek vízben mért diffúziós egyensúlyi állandója (D) a molekulák lipofilitásának (R_M) függvényében



2. ábra. ^{42}K-kiáramlás a kontroll (K), valamint az n = 6, ill. n = 9 etoxi-csoportot tartalmazó felületaktív molekulákkal kezelt liposzómából

tartalmazó molekulák jelenlétében a ^{42}K-kiáramlás jelentős mértékben nő a kontrollhoz képest. Méréseinket a homológ sor többi tagjával is elvégeztük, eredményeinket az 1. táblázatban összefoglalt permeabilitási állandók mutatják. (Az adatok 42 °C-ra vonatkoznak.)

Az adatokból kitűnik, hogy az n = 4 etilénoxidot tartalmazó molekula nem okoz változást, 6, ill. 9 etilénoxid csoport esetén a permeabilitást növelő hatás nagyobb, mint a 13, ill. 30 etilénoxid tartalmú molekuláknál.

Ha a szobahőmérsékleten mért kontrollértéket: 0,5 · 10^{-12} m/sec összehasonlítjuk a DPPC fázisátalakulási hőmérsékletén (42 °C) mért értékkel, szem-

1. táblázat

A kontroll és a felületaktív anyaggal (n = 4, 6, 9, 13, 30 etoxi-csoportot tartalmazó molekulák) kezelt liposzóma permeabilitását jellemző adatok (42 °C-on)

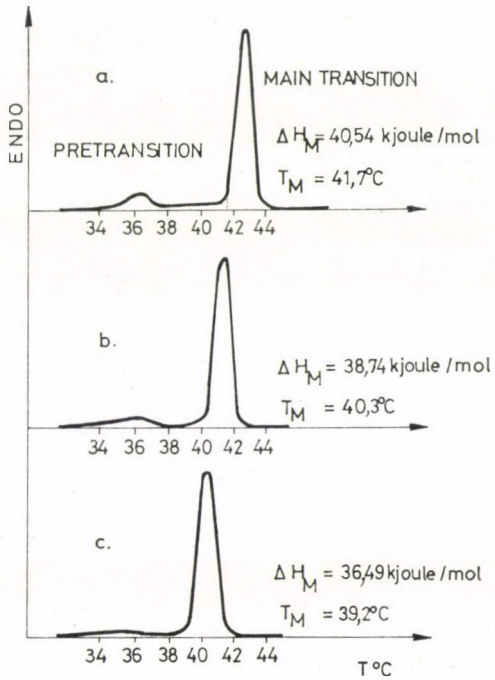
	permeabilitási állandó $\times 10^{-12}$ m/s
P_k	= 5,2
P_{n-4}	= 5,3
P_{n-6}	= 9,0
P_{n-9}	= 12,0
P_{n-13}	= 8,2
P_{n-30}	= 6,0

betűnő, hogy a permeabilitás mintegy tízszeresére nő. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a foszfolipid gélből folyadékkristályos fázisba való átalakulásakor nagymértékben csökken a membránban az intermolekuláris rend és ez elektrolitok, nem-elektrolitok megnövekedett átjutását eredményezi a membránon (SINGER 1979, PAPAHADJOPOULOS és mtsai 1973, BLOK és mtsai 1975).

A vizsgált felületaktív anyagok szobahőmérsékleten is megváltoztatják a liposzóma permeabilitását. A hatás azonos módon függ a molekulában levő etilénoxid csoportok számától, mint azt a 42 °C-on mért értékeknél tapasztaltuk.

A felületaktív molekulák és lipid közötti kölcsönhatás molekuláris szintű értelmezése a DSC mérések eredményei alapján vált lehetségessé. Példaként az n = 6 etilénoxid csoportot tartalmazó molekulával kapott eredményeket mutatjuk be a 3. ábrán.

A tiszta DPPC görbéjén („a" görbe) a pretransition 35 °C-nál, a main-transition kezdete (gél—folyadékkristály átalakulás) 41,7 °C-on van, az utóbbi átalakulási entalpiája 40,54 kJ/mol. Felületaktív anyag jelenlétében („b" görbe, 97 : 3 lipid—felületaktív anyag molarány) a DPPC főátalakulási hő-



3. ábra. DSC görbék. Az „a/' görbe a tiszta DPPC, a „b" görbe 97 : 3 DPPC-felületaktív anyag (molarány), a „c" görbe 90 : 10 DPPC-felületaktív anyag jelenlétében kapott fázisátalakulását jellemzi

mérséklete 40,3 °C-ra tolódott el, az endoterm fázisátalakulási entalpia 38,74 kJ/mol-ra csökkent.

A felületaktív anyag koncentrációjának növelésével („c" görbe, 90 : 10 lipid—felületaktív anyag molarány) az átalakulási hőmérséklet még alacsonyabb értékre tolódott el, és az entalpia további csökkenése volt tapasztalható. Jól látható a DSC görbéken, hogy a felületaktív anyag koncentrációjának növelésével a pretransition fokozatosan eltűnik.

A különböző számú etilénoxid csoportot tartalmazó molekulák 42 °C-on mért permeabilitásváltozást előidéző hatását, valamint a DSC méréseknél tapasztalt átalakulási hőmérsékleteltolódást előidéző hatását összehasonlítottuk biológiai aktivitásukkal (*Bac. subtilis* törzsön mért szaporodásgátlás). Mint az a 2. táblázatban látható, a biológiai aktivitás és a mért paraméterek között lineáris korrelációt találtunk.

Az élő sejtmembrán bonyolult összetételénél fogva, a felületaktív anyagok hatásának pontos értelmezéséhez minden bizonnyal még számos paramétert kell figyelembe venni. Tekintve, hogy a foszfolipid—víz rendszer sok tekintetben a biológiai membrán modelljeként használható (Gaber, Peticolas 1977, Yellin, Levin 1977), méréseink alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a vizsgált felületaktív anyagok biológiai aktivitásában jelentős szerepet játszik membrán permeabilitást növelő hatásuk. Erre utal számos irodalmi adat is (Bangham, Lea 1978, Schlieper, De Robertis 1977, Inoue, Kitagawa 1974, 1976, Van Zutphen és mtsai 1972), amelyek szerint más, de az általunk vizsgált nem-ionos felületaktív molekulákhoz hasonló vegyületek megnövelik a bimolekuláris lipid membránok vezetőképességét, ionok és nem-elektrolitok kiáramlását liposzómákból.

A DSC-görbéken tapasztalt eltolódás alapján arra következtethetünk, hogy a felületaktív molekula és lipid közötti kölcsönhatás részben a poláros etilénoxid lánc és a lipid fejcsoportja, részben a molekula hidrofób része és a lipid szénhidrogén láncai között jön létre. Kísérleti adatainkkal jó egyezésben van az a felületaktív anyag—lipid molekulák közötti kölcsönhatásra vonatkozó sztérikus elképzelésünk, hogy a kisebb etilénoxid tagszámú molekulák, a lipid szénhidrogén láncai közé történő beépülésükkel méretük folytán nem zavarják

2. táblázat

Nem-ionos felületaktív anyagok biológiai aktivitásának (Y) függése DPPC liposzóma permeabilitását növelő (Δp%) és átalakulási hőmérsékletét (Δt) csökkentő hatásától

$$Y = a + bx$$

x	a	b	r	$r_{90\%}$
Δp%	4,69	0,87	0,8180	0,8054
Δt	—24,66	32,00	0,7631	0,7545

meg számottevően a struktúrát. Az etilénoxid tagszám növekedésével (n = = 6, ill. 9) a molekula membrán struktúrát módosító hatása nő. Nagy etilénoxid tagszámnál a nagyméretű hidrofil rész sztérikusan gátolhatja a hidrofób rész szénhidrogén láncok közé történő beépülését, így csökken az előzőekben említett dezorganizáló hatás.

A felületaktív molekulák és lipidek közötti kölcsönhatás tehát a lipid rétegek strukturális módosulását eredményezi, amelynek következtében megváltozik a permeabilitás.

Összefoglalás

A nem-ionos felületaktív anyagok csoportjába tartozó nonil-fenil-etilénoxid polimerek vizes közegben mért diffúziós egyensúlyi állandója a molekula lipofilitásának logaritmusával csökken. A vizsgált anyagok a dipalmitoyl foszfatidilkolinból (DPPC) készült liposzóma ^{42}K-leadását az etilénoxid csoportok számától függően növelik. Felületaktív molekulák jelenlétében a DPPC fázisátalakulási hőmérséklete és entalpiája csökken. A különböző számú etilénoxid csoportot tartalmazó molekulák biológiai aktivitása és a liposzómán mért permeabilitás változást előidéző hatása, valamint a DSC méréseknél tapasztalt fázisátalakulási hőmérséklet eltolódást előidéző hatása között lineáris korrelációt találtunk. Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy a vizsgált felületaktív molekulák az etilénoxid csoportok számától függően hidrofób részükkel a lipid szénhidrogén láncai közé penetrálnak, strukturális módosulást okoznak és ennek következtében megnő a membrán permeabilitása.

IRODALOM

BANGHAM, I. A., E. I. A. LEA: Biochim. Biophys. Acta **511,** 388 (1978).
BLOK, M. C., E. C. M. VAN DER NEUT-KOK, L. L., M. VAN DEENEN, I. DE GIER: Biochim. Biophys. Acta **406,** 187 (1974).
CSERHÁTI, T., É. JÁNOS: in: Chemical Structure-Biological Activity Relationships. J. Knoll, F. Darvas Akadémiai Kiadó Bp. 221 p. (1980).
GABER, B. P., W. L. PETICOLAS: Biochim. Biophys. Acta **465,** 260 (1977).
GIBALDI, M., S. FELDMAN: J. Pharm. Sci. **59,** 579 (1970).
INOUE, K., T. KITAGAWA,: Biochim. Biophys. Acta **426,** 1 (1976).
INOUE, K., T. KITAGAWA: Biochim. Biophys. Acta **363,** 361 (1974).
JOHNSON, S. M., A. D. BANGHAM: Biochim. Biophys. Acta **82,** 193 (1969).
KAKEMY, K., T. ARITA, S. MURANISHI: Chem. Pharm. Bull. **13,** 976 (1965).
LEVY, G., K. E. MILLER, R. H. REUNING: J. Pharm. Sci. **5,** 394 (1966).
MATSUZAWA, T., H. FUJISAWA, K. AOKI, H. MINA: Chem. Pharm. Bull. **17,** 999 (1969).
PAPAHADJOPOULOS, D., K. JACOBSON, S. NIR, T. ISAC: Biochim. Biophys. Acta **311,** 330 (1973).
SCHLIEPER, P., E. DE ROBERTIS: Arch. Biochem. Biophys. **184,** 204 (1977).
SINGER, M.: Chem. Phys. Lipids **25,** 15 (1979).
SUZUKI, M., MOTOYOSHI, H. ARAI, H. HORIKAWA: Jap. J. Pharmacol. **17,** 525 (1967).
TAMÁS, Gy., M. SZŐGYI: Acta Pharm. **43,** 283 (1973).
VALKENBUBG, V. W.: Pesticide Formulations Marcel Dekker Inc. New York (1973).
VAN ZUTPHEN, H., A. I. MEROLA, G. P. BRIERLEY, D. G. CORNWELL: Arch. Biochem. Biophys. **152,** 755 (1972).
YELLIN, N., I. W. LEVIN: Biochemistry **16,** 642 (1977).

KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A MEMBRÁN-BIOKÉMIÁBAN*

CSERHÁTI TIBOR, SZŐGYI MÁRIA* és KANYÁR BÉLA**

Növényvédelmi Kutató Intézet, * Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, ** Semmelweis Orvostudományi Egyetem Számítástechnikai Csoport

A kromatográfia — az elválasztási feladatok minden eddiginél tökéletesebb megoldása mellett — bioaktív molekulák asszociációs, disszociációs és komplexképző tulajdonságának vizsgálatára, valamint biokémiai, ill. fizikokémiai jellegű paramétereik meghatározására is alkalmas. Két anyag kölcsönhatásának erőssége (a szolvatációs, ill. az adszorpciós hő) meghatározható gázkromatográfiás módszerrel abban az esetben, ha egyik anyag sem bomlékony a vizsgálat hőmérsékletén és az egyik anyag illékony, a másik pedig nem.

Egy és többértékű ionok sejtmembránt alkotó foszfolipidek lipofilitására gyakorolt hatása fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel tanulmányozható.

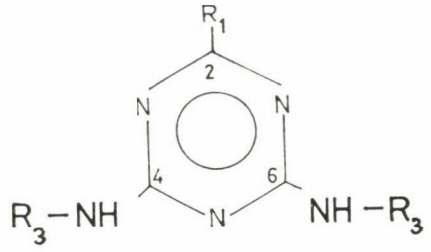
A foszfolipidek és ionok közötti kölcsönhatás vizsgálatánál alkalmazott módszer módosítva alkalmas foszfolipidek és antibiotikumok kölcsönhatásának tanulmányozására.

Egyértékű ionok foszfolipidekhez való kötődésének sorrendje adszorpciós (deszorpciós) sajátságaik alapján az ún. „leszorításos" módszerrel vizsgálható.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Közismert az a tény, hogy felületaktív anyagok jelentős mértékben befolyásolják a hatóanyag biológiai aktivitását, elősegítik a hatóanyag átjutását a membránon, módosítják a sejten belüli eloszlását (VALKENBURG 1973). A hatás oka sok más egyéb tényező mellett a két molekula közötti kölcsönhatás is lehet. Mivel a fenti vegyületek megfelelnek a bevezetésben említett gázkromatográfiás adszorpciós hő meghatározási módszerrel szemben támasztott követelményeknek, mértük a gyomirtó szerként széles körben alkalmazott triszubsztituált szimmetrikus triazinok (általános képletüket l. 1. ábra) és nem-ionos felületaktív anyagok (molekulánként 6 és 23 etilénoxid csoportot tartalmazó nonil-fenil-etilénoxid polimer: A_6 és A_{23}, valamint molekulánként

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.



	R_1	R_2	R_3
SIMAZIN	Cl	Et	Et
ATRAZIN	Cl	Et	iPr
PROPAZIN	Cl	iPr	iPr
TERBUTILAZIN	Cl	Et	terc.Bu
ATRATON	OCH_3	Et	iPr
PROMETON	OCH_3	iPr	iPr
TERBUMETON	OCH_3	Et	terc.Bu
ETAZIN	OCH_3	Et	iBu
AMETRIN	SCH_3	Et	iPr
PROMETRIN	SCH_3	iPr	iPr
TERBUTRIN	SCH_3	Et	terc.Bu

1. ábra. Triszubsztituált szimmetrikus triazinok

4 és 50 etilénoxidcsoportot tartalmazó tributil-fenil-etilénoxid polimer: S_4 és S_{50}) közötti kölcsönhatás esetén fellépő energiaváltozásokat.

A gázkromatográfiás meghatározás során mért retenciós időből (t), a vivőgáz áramlási sebességéből (F) és a kromatográfiás oszlop hőmérsékletéből (T) az alábbi egyenlet szerint határozható meg az adszorpciós hő (Ross és munkatársai 1962):

$$\Delta H = R \frac{d[\ln(Ft)]}{d(1/T)} .$$

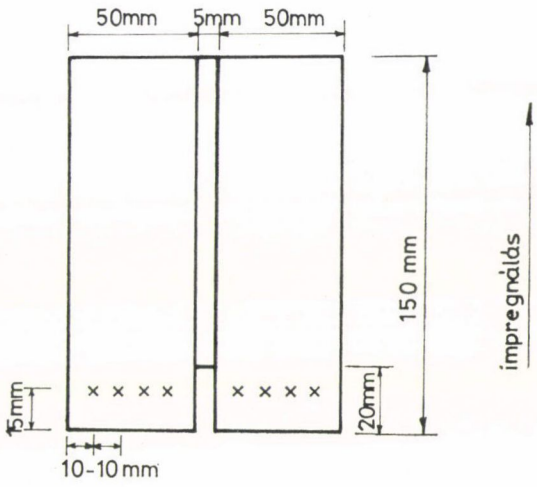
Vizsgálatainkat az alábbi körülmények között végeztük: oszlop: 60 cm $\times$4 mm belső átmérőjű üveg, hordozó: Chromosorb W 60/80 m, nedvesítő: 2,5% felületaktív anyag, detektor típus: lángionizációs, detektorhőmérséklet: 220 °C, oszlophőmérséklet: 185—200 °C, injektor hőmérséklet: 220 °C, N_2 sebesség: 50 cm^3/perc, H_2 sebesség: 30 cm^3/perc, levegő sebesség: 400 cm^3/perc, oldószer: kloroform. A retenciós időt integrátorral határoztuk meg.

Az egyértékű ionok lecitin lipofilitására gyakorolt hatását a következő módon tanulmányoztuk. Vizsgálatainkhoz Silufol lemezeket használtunk (csehszlovák gyártmány, nagy pórusú, 0,1 mm szilikagél réteg alumínium hordozón). A 15$\times$10,5 cm-es lemezeket n-hexanban oldott 5%-os paraffinolajjal impregnáltuk felszálló rendszerben a hosszanti irányban. A lemezeket

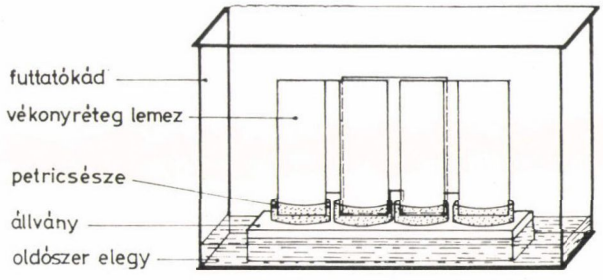
szobahőmérsékleten szárítottuk és a lemez közepéről 5 mm-es szilikagél réteget lekapartunk, a lekapart részből 2 cm-t kivágtunk (l. 2. ábra).

A futtatókád oldószergőzőkkel való telítését a kád aljára öntött 100 cm^3 oldószerkeverékkel biztosítottuk. Az oldószer fölé négy petricsészét helyeztünk el, amelyekbe a telítésre használt oldószerrel azonos, de különböző egyértékű kationokat (Li^+, Na^+, K^+, Cs^+) tartalmazó futtatószert tettünk. A futtatókádban három kromatográfiás lemezt helyeztünk el, az I. lemez az 1, 2, a II. lemez a 2, 3 és a III. lemez a 3, 4 petricsészébe merült, így egyszerre négy különböző rendszerben történő futtatás vált lehetségessé (l. 3. ábra). A fenti elrendezés segítségével sikerült kiküszöbölnünk az R_f értékeket legnagyobb mértékben befolyásoló hibákat, mint pl. a különböző lemezen, ill. különböző kádban történő futtatás bizonytalanságát.

Mivel kísérleteink elsődleges célja az egyértékű ionok közötti különbségek kimutatása volt, egy futtatókádon belül csak az ionminőség változott.



2. ábra. Vékonyréteg lemez az egyértékű ionok lecitin lipofilitására gyakorolt hatásának tanulmányozására



3. ábra. Egyértékű ionok lecitin lipofilitására gyakorolt hatásának vizsgálatára összeállított futtatórendszer

A különböző futtatásokat más, más víz-etanol aránynál és más ionkoncentrációknál végeztük; az ionkoncentráció 0,03—0,29 N, a víz—etanol arány 3 : 20 és 8 : 20 között változott. A lemezekre 20 μg lecitint vittünk fel, a futtatás után az előhívást jódgőzben végeztük. Itt kívánjuk megjegyezni, hogy a lecitin szennyezései a meghatározást nem zavarják, mivel eltérő lipofilitásuk miatt a kromatográfiás lemezen máshol jelennek meg. Adataink alapján feltételeztük, hogy a lecitin lipofilitását az ionátmérővel jellemzett ionminőség, az ionkoncentráció és a közeg dielektromos állandója egyaránt befolyásolja, ezért a fenti tényezők hatásának mennyiségi értékeléséhez megkerestük azt a legjobban illeszkedő háromváltozós függvényt, amely még fizikokémiai és biológiai megfontolások alapján is elfogadható.

Az antibiotikum—lecitin kölcsönhatás tanulmányozásánál az alábbi kísérleti nehézségekkel kellett szembenéznünk: a lecitin-antibiotikum kölcsönhatás olyan erős, hogy az egyéb körülmények között jól bevált előhívó reagensekkel lecitinfelesleg jelenlétében az antibiotikumok nem mutathatók ki (pl. a polimixin ninhidrinnel nem reagál), a szükségszerűen igen kis mennyiségben jelenlevő antibiotikum viszont nem zavarja a lecitin kimutatását, tehát a detektálás a lecitin reakció árnyékolása révén sem oldható meg. Ezért kénytelenek voltunk olyan másodlagos kromatográfiás elválasztást végezni, amely a vizsgált polimixint és sztreptomicint megbízhatóan elkülöníti a lecitintől. A kísérletet az alábbiak szerint végeztük. A Silufol lemezeket etanolban oldott 0,3%-os lecitinnel impregnáltuk leszálló rendszerben túláramoltatással 16—24 órán át, majd nitrogén áramban megszárítottuk. A hosszú impregnálási időre a lecitin szilikagél felületen mutatott csekély mozgékonysága miatt volt szükség. A lemezre 50 μg sztreptomicint és 50 μg polimixint vittünk fel, a futtatást telített vizes LiCl-metanol 1 : 1 arányú keverékével végeztük. A futtatás befejezése és az oldószer elpárologtatása után a lemezről a sztreptomicint és polimixint tartalmazó kb. 5 mm széles csíkot kivágtuk és szilikagéles felével frissen készített (még nedves, képlékeny) hagyományos Kieselgel G lemezre (20$\times$20 cm üveg hordozó, 0,25 mm rétegvastagság) fektettük a lemez aljától kb. 2 cm-re, majd óvatosan belenyomtuk a rétegbe. A lemezt megszáradás után n-butanol-piridin-ecetsav-víz 9 : 6 : 1,8 : 1,2 térfogat arányú keverékében futtattuk, majd klór-tolidines reagenssel hívtuk elő (Stahl 1962). A tolidin koncentrációját az érzékenység fokozása érdekében ötszörösére növeltük.

Az egyértékű alkáliionok lecitinhez való kötődését az általunk előzőekben alkalmazott sík felületi modellrendszer mellett (Cserháti, Szőgyi 1978), a biológiai membránok térbeli struktúráját jobban közelítő liposzómán is tanulmányoztuk. Vékonyréteg kromatográfiásan ellenőrzött lecitinből (Koch—Light gyártmányú tojáslecitin) készítettünk liposzómát ultrahang besugárzással (300 mg lecitint diszpergáltunk 6 cm^3 desztillált vízben hűtés és nitrogén átáramoltatás mellett MSE 150 wattos ultrahang dezintegrátorral). A liposzómához 15 MBq ^{86}RbCl-t adtunk és egy óra hosszat inkubáltuk az izotóppal.

Előző kísérleteink szerint az egy órás inkubációs idő alatt a $^{86}Rb^+$ csak a liposzóma felszínén adszorbeálódik és nem hatol be a liposzómába. Az inkubálás után a liposzómát négy részre osztottuk és négy Sephadex G-50-ből készült kromatográfiás oszlopra vittük fel (60 cm hosszú, 2 cm átmérőjű), amelyeket előzőleg a futtatószerrel egyensúlyba hoztunk. Az első oszlopot 0,001 N NaCl-dal, a másodikat 0,001 N KCl-dal, a harmadikat 0,001 N RbCl-dal, a negyediket pedig 0,001 N CsCl-dal mostuk (átfolyási sebesség: 0,5 cm^3/perc). Összegyűjtöttük külön-külön mind a négy esetben a liposzóma frakciókat, majd a liposzómához nem kötődött $^{86}Rb^+$-t tartalmazó frakciókat. Szcintillációs detektorral mértük a liposzómához kötődött $^{86}Rb^+$-, valamint a nem kötődött $^{86}Rb^+$-aktivitását. Az egyértékű kationoknak a liposzóma felületén adszorbeált ^{86}Rb-ionok kötődésére gyakorolt hatását a liposzóma felületén adszorbeálva maradt és a szabad ^{86}Rb-ionok aktivitásának arányával fejeztük ki.

Eredmények és értékelésük

A triazinok és nem-ionos tenzidek adszorpciós hőjét az 1. táblázatban közöljük.

Az adszorpciós hő meghatározásának variációs koefficiense 5% alatt volt. A legillékonyabb és leghőérzékenyebb S_4 esetében a variációs koefficiens értéke mintegy 18%. Az adatokból igen érdekes következtetések vonhatók le: azonos szerves-amin csoportok mellett minden esetben az $-OCH_3$ csoportot tartalmazó vegyület kötődik a leggyengébben, az $-SCH_3$ csoport a legerősebben. A $-Cl$ közbülső helyet foglal el az adszorpciós sorban. Ebből arra következtethetünk, hogy az adszorpció erősségét döntő módon a fenti három csoport határozza meg. Ezt a megállapításunkat támasztja alá az is, hogy a különböző szerves-amin szubsztituensű triazinok adszorpciós hője között jelentős különbségek nem voltak kimutathatók. A nem-ionos tenzidek esetében azonos triazin molekula adszorpciós hője az etilénoxid tagszám növekedésével nő. Ez azzal a feltételezéssel magyarázható, hogy a vizsgált molekulák az adszorpciós hőt döntő módon befolyásoló $-SCH_3$, $-Cl$ és $-OCH_3$ csoportjukkal kötődnek a nem-ionos tenzid etoxi csoportjához.

Az ionátmérővel jellemzett ionminőség, az ionkoncentráció és a közeg dielektromos állandójának a lecitin lipofilitására gyakorolt hatását leíró összefüggéseket a 2. táblázatban foglaljuk össze.

Az adatokból megállapítható, hogy az összefüggés legjobban egy egyszerű lineáris, ill. négyzetes függvénnyel közelíthető. Mindkét függvénykapcsolat 99,9% biztonsági szinten szignifikáns. Annak ellenére, hogy a négyzetes összefüggés F értéke nagyobb, a két függvény illeszthetősége között szignifikáns különbség nem volt kimutatható, tehát adataink alapján egyértelműen nem dönthető el, hogy a kapcsolat lineáris vagy négyzetes. Az előző két függ-

1. táblázat

Nem-ionos felületaktív anyagok és helyettesített szimmetrikus triazinok adszorpciós hői (kjoule/mol)

Triazinok	Felületaktív anyag			
	A_8	A_{23}	S_4	S_{59}
Atraton	32,31	34,10	22,19	28,50
Atrazin	33,27	34,73	23,74	29,76
Ametrin	34,90	36,11	25,45	30,64
Prometon	31,14	33,14	23,78	28,34
Propazin	31,76	33,48	24,28	29,67
Prometrin	34,86	36,19	26,20	30,05
Terbumeton	31,22	33,10	25,37	29,63
Terbutilazin	32,77	34,36	26,54	29,80
Terbutrin	34,10	35,19	27,33	31,05
Etazin	34,02	35,57	23,74	29,38

2. táblázat

Lecitin lipofilitásának (R_M) *függése az egyértékű kationok ionsugarától* (r), *az ionkoncentrációtól* (C) *és a közeg dielektromos állandójától* (D)

I. $R_M = a + b_1 \cdot r + b_2 \cdot C + b_3 \cdot D$

II. $R_M = a + b_1 \cdot r^2 + b_2 \cdot C^2 + b_3 \cdot D^2$

	I.	II.
a	0,824	0,773
b_1	−0,133	−0,057
b_2	0,422	1,202
b_3	0,002	0,000
b_1'	−0,423	−0.438
b_2'	0,389	0,360
b_3'	0,063	0,130
F	7,839	9,231
Szignifikancia szintek %		
b_1	99,8	99,9
b_2	83,1	89,4
b_3	17,9	44,4

vénykapcsolaton kívül próbálkoztunk exponenciálisan változó függvényekkel is. Ez esetben nem tudtunk az előzőeknél szignifikánsan jobb illeszkedést elérni. Mérési adataink értelmezéséhez az egyszerűbb és könnyebben kezelhető nem exponenciális függvényillesztést is elegendőnek tartjuk. A normalizált iránytangens értékek arra utalnak, hogy a lecitin lipofilitását döntő módon az ionminőség, kisebb mértékben az ionkoncentráció és elenyésző módon a közeg dielektromos állandója határozza meg. A fenti megállapítások érvényességéhez feltétlenül hozzá kell tennünk, hogy a kísérlet célja kimondottan az ionminőség hatásának tanulmányozása volt, azaz az ionminőségre vonatkozó adatok pontosságát csak az egy futtatókádon belüli különbségek, a másik két tényező pontosságát a lényegesen nagyobb, különböző futtatások közötti szórások befolyásolták. Megjegyezzük továbbá, hogy a vizsgált antibiotikumokkal összehasonlítva a lecitin ionérzékenysége lényegesen kisebb. Egyéb vizsgálatainkból ismert az a tény, hogy egy vegyületnek a vegyületcsoport alapmolekulájához viszonyított lipofilitását az ionkoncentráció abban az esetben növeli, ha a szubsztituensek Hansch állandója nagy pozitív érték (lipofil szubsztituensek). Az előbbiek alapján a lecitin egészében úgy viselkedik, mintha ionérzékenységét a poláros hidroxil és a quaterner amin határozná meg, az apoláros zsírsav-láncok jelentősége lényegesen kisebb.

A lecitin, polimixin és sztreptomicin elválasztásához alkalmazott futtatószerekben mért R_f értékeket a 3. táblázatban közöljük.

Az R_f értékek alapján az elválasztásra a cellulóz-réteg a legmegfelelőbb. A cellulóz lemez készítése azonban magában foglalja a lemez 110 °C hőmérsékleten történő szárítását, ami esetleg jelentős mértékben befolyásolja a lecitin-antibiotikum közötti kölcsönhatást. A fenti megfontolás alapján a gyengébb elválasztású, de hőkezelést nem igénylő Kieselgel G lemezt választottuk. Kísérleteink felhívták figyelmünket arra az igen érdekes és meglehetősen ritka jelenségre, hogy a két különböző típusú rétegen a vizsgált anyagok adszorpciós erőssége megfordul. Ez részben a sztreptomicin cellulóz vagy rokon vegyületekhez való erős kötődésével magyarázható.

A lecitin-antibiotikum kötődés vizsgálatához alkalmazott igen nagy ionkoncentrációjú futtatószer sem volt arra képes, hogy az antibiotikum-lecitin kötést számottevően megbontsa (az antibiotikum molekulák alig moz-

3. táblázat

Lecitin, polimixin és sztreptomicin R_f értékei Kieselgel G és cellulóz rétegeken n-butanol : piridin ecetsav : víz 9 : 6 : 1,8 : 1,2 térfogatarányú futtatószer rendszerben

Réteg anyaga	Lecitin	Polimixin	Sztreptomicin
Kieselgel G	0,09	0,18	0,33
Cellulóz	0,90	0,41	0,16

dultak el a felvitel helyéről). Ez a jelenség egyértelműen azt bizonyítja, hogy a lecitin-antibiotikum kötés lényegesen erősebb, mint a lecitin-egyértékű kation között létrejövő kölcsönhatás. A kérdés további tanulmányozásához a futtatási metodika módosítása (túlnyomásos rétegkromatográfia alkalmazása) szükséges.

A lecitinből készült liposzóma felszínéhez kötődött egyértékű alkálikationokkal végzett kísérleteink tanulságai a következők. A szabad ^{86}Rb-csúcs alakja alapján arra következtethetünk, hogy a liposzóma felületén a ^{86}Rb-ionok és a másik egyértékű kationok egyensúlya igen rövid idő alatt beáll. Az egyensúlyi állapot (a leszorítás mértéke) a mosófolyadékban levő ion minőségétől függ, azaz a liposzóma felületén maradó adszorbeált ion mennyiségét befolyásolni tudjuk azzal, ha a mosást különböző egyértékű ionokkal végezzük. Kísérleti eredményeinket az alábbi egyenlet szemlélteti:

$$\text{maradék aktivitás } \% = 125{,}12 - 27{,}30 \times \text{ionsugár}$$

$$r = 0{,}9167, \qquad r_{99{,}9} = 0{,}8771.$$

A liposzóma felületén mért „leszorítási" sor megegyezik a sík felületi modell alkalmazásánál kapott kötődési sorral, azaz a lecitinhez legerősebben a Cs^+, ezt követően a Rb^+ és a K^+, legkevésbé a Na^+ kötődik.

Összefoglalás

Triazin herbicidek és nem-ionos felületaktív anyagok kölcsönhatását gázkromatográfiás módszerrel vizsgálva meghatároztuk, hogy a kölcsönhatás nagysága 22,19—36,19 kJ/mol között változik a molekulák szerkezetétől függően.

Fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel megállapítottuk, hogy a lecitin lipofilitását az egyértékű kationok közül legjobban a Cs^+, legkevésbé a Li^+ csökkenti, a hatás lényegesen kisebb, mint a membránkárosító antibiotikumok (sztreptomicin, polimixin) esetében. A lecitin lipofilitása és az ionsugár közötti összefüggés lineáris és négyzetes függvénnyel egyaránt leírható.

Lecitinnel impregnált vékonyréteg-kromatográfiás lemezen a sztreptomicin és polimixin még telített LiCl oldattal sem mozdítható el, tehát a lecitin-antibiotikum kölcsönhatás nagyságrendekkel erősebb, mint a lecitin-Li^+ között létrejövő kötés.

Lecitin liposzóma felületéről az egyértékű kationok annál erősebben szorítják le egymást, minél nagyobb az ionsugaruk.

IRODALOM

1. CERHÁTI, T., M. SZŐGYI: The interaction of monovalent cations with lecithin studied by a new TLC method CMA Symposium on the Energetic Aspects of Membrane Transport (Abst: 38 p.) (1978).
2. ROSS, S., I. K. SAELENS, P. I. OLIVIER: J. Phys. Chem. **66**, 696. (1962).
3. STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg (1962).
4. VALKENBURG, V. W.: Pesticide Formulations Marcel Dekker Inc. New York (1973).

PRIMYCIN HATÁSA MEMBRÁNOK ALKÁLI KATION TRANSZPORTJÁRA*

BLASKÓ KATALIN

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézete, Budapest

A primycint VÁLYI-NAGY és mtsai (1954) fedezték fel, kémiai szerkezetét ABERHARDT (1974) és FEHR (1976) állapították meg. A molekula egy 35 szénatomos laktongyűrűből áll, amelyhez többek között egy cukor és egy guanidinocsoport kapcsolódik. Ez utóbbi révén a molekula pozitív töltéssel rendelkezik. Amfifil karakterű, egy hidrofób és két hidrofil részből áll. A primycin hatásos antibiotikum Gram pozitív baktériumokra, s újabb tapasztalatok szerint elősegíti a sebgyógyulást. Jelentőségét fokozza, hogy baktérium rezisztencia nem alakul ki vele szemben. Hátránya viszont toxikussága, jelenleg csak felületi kezelésre alkalmas.

A primycin hatásmódjára vonatkozó első biokémiai vizsgálatok eredménye szerint az antibiotikum gátolja a DNS függő RNS szintézist (VÁLYI-NAGY, DARÓCZY 1967). Számos más vizsgálat alapján azonban kiderült, hogy hatásában a membránnal való kölcsönhatásnak elsődleges szerepe van. Így pl. HORVÁTH és mtsai (1979) baktériummembrán, MÉSZÁROS és mtsai (1979) mitokondrium belső membrán permeabilitásának növekedését mérték primycin jelenlétében. KÖVÉR és mtsai (1976) kimutatták, hogy a primycin izommembránon a K^+ permeabilitás csökkentése révén depolarizációt okoz. Annak érdekében, hogy különböző membránok permeabilitására gyakorolt hatásáról átfogóbb képet kapjunk, megvizsgáltuk a primycin hatását humán vörösvérsejt alkáli kation transzportjára és bimolekuláris lipid membrán elektromos vezetőképességére.

Vizsgálati módszerek

Modellmembránként sík bimolekuláris lipid membránt (BLM) alkalmaztunk. A BLM-et egy teflon kupa oldalán levő 1,5 mm átmérőjű nyíláson készítettük a megfelelő lipid 1—2%-os n-dekános oldatából (MUELLER és mtsai 1964). A membrán két oldalán azonos koncentrációjú alkáli klorid oldat volt. Az elektromos mérésekhez kloridozott ezüst elektrodákat és Keithley elektro-

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

métert használtunk. A primycint a BLM kialakulása után adtuk a membrán egyik vagy mindkét oldalán levő vizes oldatba és mértük a membránon átfolyó áramerősséget a külső feszültség vagy az idő függvényében.

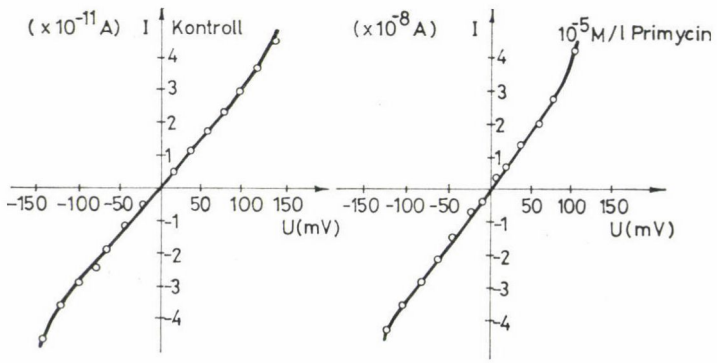
Vörösvérsejtek transzportvizsgálatát radioizotóp kinetikai módszerrel végeztük, nyomjelzőként a vizsgált ion radioizotópját alkalmazva (GYÖRGYI, KANYÁR 1972, GYÖRGYI, BLASKÓ 1974). Frissen vett vért 37 °C-on a kérdéses izotóppal equilibráltuk, majd centrifugálás és mosás után a vörösvérsejtet plazma mennyiségű műszérumban szuszpendáltuk és 20 °C-on mértük a vörösvérsejtből a plazmába kiáramlott aktivitás mennyiségét, K^+, Rb^+, Cs^+ esetében. Na^+ ionok vizsgálatakor az izotópot az extracelluláris térhez adtuk és a vörösvérsejt aktivitás növekedését mértük.

A transzportsebességet a ki-, illetve a beáramlott radioaktív ionnak az összaktivitás százalékában kifejezett értékével jellemeztük.

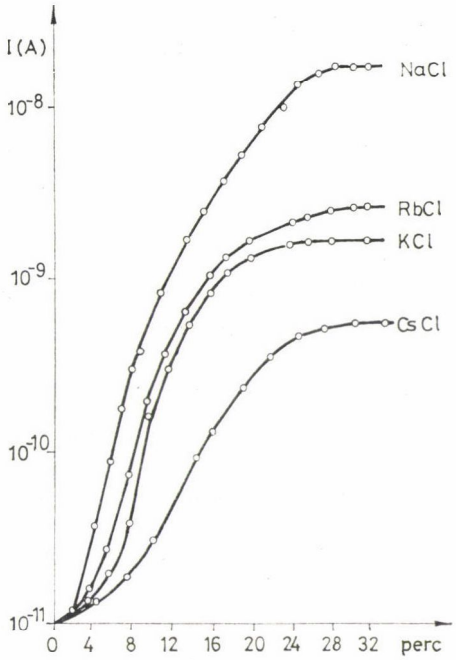
Eredmények és értékelésük

A bimolekuláris lipidmembránon történő méréshez membrán anyagként foszfatidilszerint alkalmaztunk. A módosítatlan foszfatidilszerin BLM fajlagos ellenállása, ha a membrán két oldalán azonos koncentrációjú híg (10^{-3} M) alkáli kloridoldat van 10^8 ohm cm^2 értékű (PAPAHADJOPOULOS és OHKI 1964), s az áram-feszültség karakterisztika szimmetrikus lefutású pozitív és negatív feszültségtartományokban. 10^{-6}—5×10^{-5} M primycint adva a vizes fázishoz a BLM áram-feszültség karakterisztikájának jellege nem változott, de a membrán ohmikus ellenállása mintegy 2—3 nagyságrenddel csökkent.

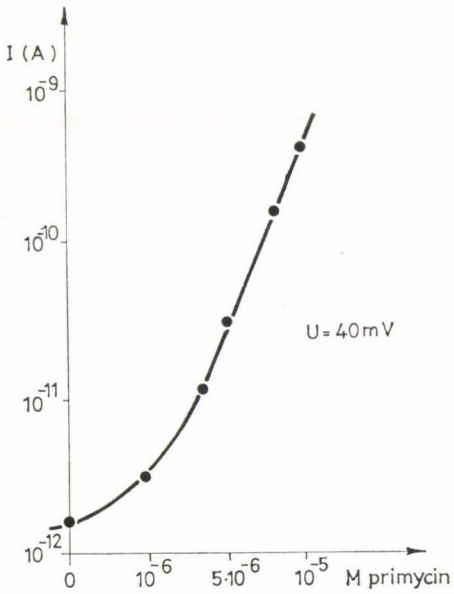
A primycinnel módosított BLM vezetőképessége nagymértékben függött a vizes fázisban levő alkáliion fajtájától, és a vezetőképesség változása jellegzetes időbeli kinetikát mutatott. A 2. ábrán a 40 mV feszültség mellett mért áramerősségeket mutatjuk be az idő függvényében. Primycint adva a vizes



1. ábra. Foszfatidilszerin BLM áram—feszültség karakterisztikái primycin nélkül és primycin jelenlétében). 10^{-3} M NaCl a membrán mindkét oldalán pH 4, t = 25 °C



2. ábra. Primycin hatása foszfatidilszerinből készült BLM vezetőképességére különböző alkáli-ionok jelenlétében. A görbék a 40 mV-nál mért áramerősség értékeket mutatják a primycin hozzáadásától számított idő függvényében



3. ábra. Foszfatidilszerin BLM vezetőképessége a primycin koncentráció függvényében. A BLM 10^{-3} M KCl-ben készült. Az áramerősséget 40 mV külső feszültség mellett mértük

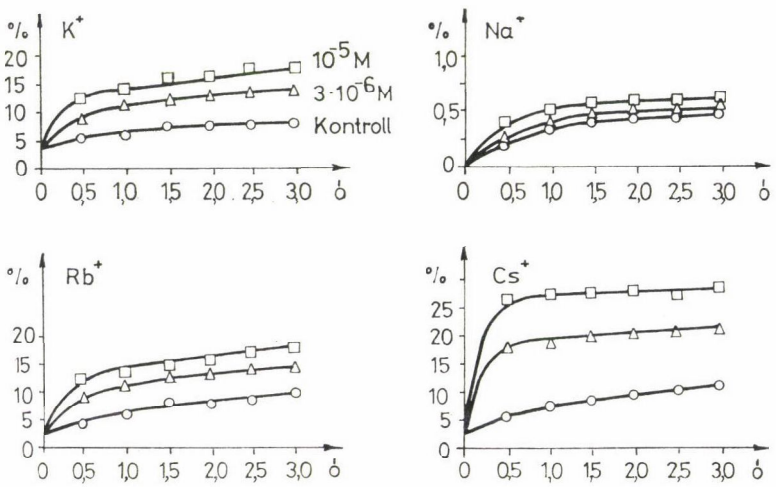
fázishoz a membrán vezetőképessége fokozatosan nőtt és mintegy félóra múlva telítésbe ment. Adott primycin koncentráció esetén az itt mért vezetőképesség értékekből a következő ionszelektivitási sorrend adódott: $Na^+ > K^+ \sim Rb^+ > > Cs^+$.

További érdekes megfigyelésünk volt, hogy a BLM vezetőképességének változása nem függött attól, hogy a primycint a membrán melyik oldalán levő vizes fázishoz adtuk. A membrán vezetőképessége és a primycin koncentrációja között nem lineáris a kapcsolat (3. ábra).

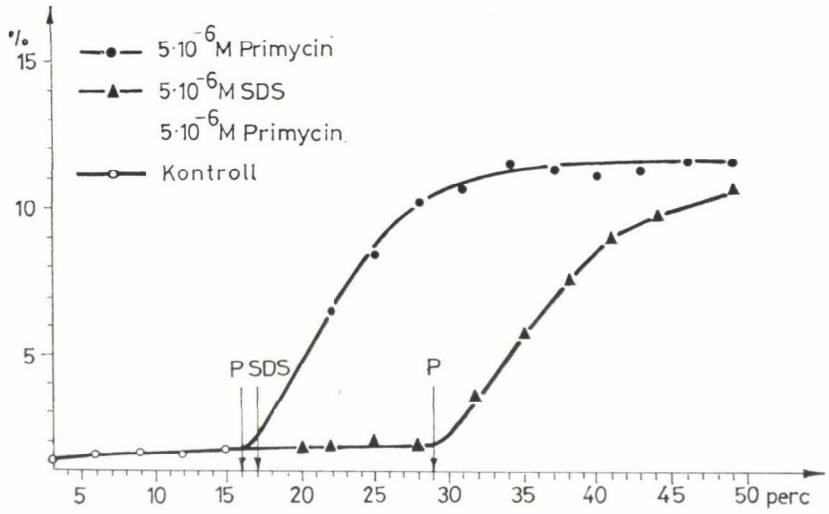
Tapasztalatunk szerint a primycin nem befolyásolta a lecitin: koleszterin 2:1 keverékéből készült BLM vezetőképességét.

A bimolekuláris lipid membránokon eddig végzett mérések eredményei alapján a primycin hatásmódjára vonatkozólag a következő feltételezéseket tettük: A primycin kölcsönhatásba lép a membrán-lipid rétegével, amelynek első lépése a molekula pozitív csoportja és a membrán felület negatív töltése közötti kölcsönhatás, amely elősegíti a molekulának a membrán felülethez való megfelelő kötődését. A molekula ezután amfifil sajátságának megfelelően beépül a lipid molekulák szénhidrogénláncai közé, környezetében fellazítva a struktúrát, jobban vezető domaineket hoz létre.

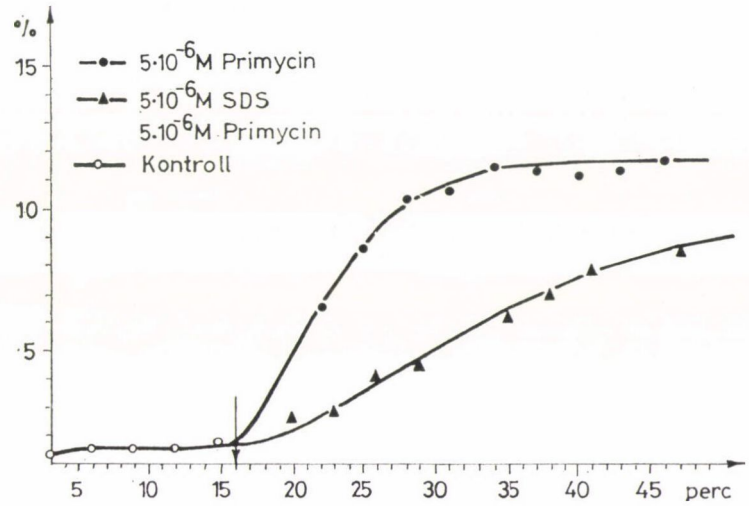
Kísérleteink másik részében a primycin humán vörösvérsejt alkáli kation transzportjára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A passzív transzport mérését 20 °C-on végeztük az aktív transzportrendszer gátlása érdekében. Megjegyezzük, hogy ouabain jelenlétében hasonló eredményt kaptunk. A primycin az alkáli kationok aktív transzportját nem befolyásolja. Jelentősen növeli azonban



4. ábra. Humán vörösvérsejtek K^+, Rb^+, Cs^+ és Na^+ passzív transzport értékei az idő függvényében különböző extracelluláris primycin koncentráció esetén. A függőleges tengelyen a transzportált radioaktív ionnak az összes aktivitás százalékában kifejezett értékei vannak feltüntetve



5. ábra. Primycin, ill. SDS hatása humán vörösvérsejt passzív Cs^+ transzportjára



6. ábra. Primycin, ill. primycin és SDS együttes hatása humán vörösvérsejt passzív Cs^+ transzportjára

a membrán kation permeabilitását. A 4. ábrán a K^+, Rb^+ és Cs^+ efflux értékeit, illetve Na^+ influx értékeit ábrázoltuk az inkubációs idő függvényében. Míg kontroll körülmények között a K^+, Rb^+ és Cs^+ passzív transzportjában nincs szignifikáns különbség, a primicin szelektíven növeli ezen ionok passzív transzportját. A legkifejezettebb hatást Cs^+ ion esetében mértük, 1,5 órával 3×10^{-6} M primycin adagolása után a Cs^+ efflux értéke mintegy háromszorosa, 10^{-5} M

primycin jelenlétében mintegy ötszöröse a kontroll értéknek. Kisebb és közel azonos mértékben emelkedett a K^+ és Rb^+ ionok transzportja. A Na^+ passzív transzport gyakorlatilag nem változott primycin hatására.

Vörösvérsejten is igazolni kívántuk az elektrosztatikus kölcsönhatás szerepét a primycin hatásban. Ezen vizsgálatokhoz negatív töltésű, hidrofób SDS-t használtunk. Cs^+ transzportra vonatkozó mérési eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be. A görbe kezdeti szakasza a kontroll alacsony transzport sebességét mutatja. A nyíllal jelölt időpontban a plazmához adtuk a primycint és a permeabilitás a már ismert módon gyorsan emelkedett. Parallel kísérletben SDS-t adtunk a plazmához. Az SDS önmagában nem befolyásolta a Cs^+ transzportot. Néhány perc után azonos mennyiségű primycint adva a rendszerhez a primycin hatásra jellemző nagyságú és kinetikájú transzport növekedést mértünk. Ha azonban a primycint és az SDS-t együtt adagoltuk a helyzet megváltozott (6. ábra). Ebben a kísérletben a nyíllal jelölt időpontban együtt adtuk azonos koncentrációban a két anyagot. Látható, hogy a permeabilitás növekedése kisebb és időben is később jelentkezett. Feltételezhető, hogy az SDS kompetitíve gátolja a primycin és a membrán közötti töltés-töltés kölcsönhatást, s így nehezebbé válik a primycin beépülése a membránba.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a primycin szelektíven növeli a foszfatidilszerin bimolekuláris lipidmembrán elektromos vezetőképességét és a humán vörösvérsejt membrán passzív alkáli kation transzportját. Az antibiotikum bázikus csoportja révén kötődik a negatív felületű membránhoz, majd amfifil karakterének megfelelően beépül a lipidmolekulák közé és lokálisan fellazítja a környezetében a membránstruktúrát, megnöveli a membrán permeabilitást. Ezt a feltételezést támasztják alá azok az eredményeink, amelyek szerint az extracellulárisan adott primycin növeli az ionok intracelluláris térből való kiáramlását, valamint az a tapasztalat, hogy a BLM áram—feszültség karakterisztikájának jellege nem függött attól, hogy a primycint a membrán melyik oldalához adtuk.

Ami pedig a kétféle rendszeren kapott eltérő ionszelektivitást illeti, ennek értelmezésénél nyilvánvalóan figyelembe kell venni a kétféle membrán jelentősen eltérő lipid összetételét és a fehérjével való kölcsönhatás lehetősége sem hagyható figyelmen kívül.

Összefoglalás

A primycin antibiotikum szelektíven növeli a humán vörösvérsejtek passzív alkáli kation transzportját és a negatív felületi töltésű bimolekuláris lipidmembrán elektromos vezetőképességét. A mesterséges membránokon nyert eredmények alapján feltételeztük, hogy az antibiotikum elektrosztatikus kölcsönhatás révén kötődik a membrán felülethez, majd hidrofób jellegének meg-

felelően beépül a lipidmolekulák szénhidrogén láncai közé és ott jobban vezető domaineket hoz létre. A primycin membránra gyakorolt hatásában a töltés—töltés kölcsönhatás szerepét humán vörösvérsejten végzett mérésekkel is igazoltuk.

IRODALOM

Abebhart, J., T. Fehr, R. C. Jain, P. de Mayo, O. Motl, L. Baczynskij, D. E. F. Gracey, D. B. MacLean, I. Szilágyi: Primycin. J. Am. Chem. Soc. **92,** 5816 (1976).

Aberhabt, J., R. C. Jain, T. Fehr, P. de Mayo, I. Szilágyi: The constitution of primycin. I. Characterization, functional groups, and degradation to the secoprimycines. J. Chem. Soc. (Perkin Trans) 1974: 816 (1974).

Györgyi, S., K. Blaskó: Examination of the competitive effect of alkali ions in the K^+, Rb^+, and Cs^+ transport of rat erythrocytes. Acta Biochim et Biophys. Acad. Sci. Hung. **9,** 97 (1974).

Györgyi, S., B. Kanyár: Application of a three compartment tracerkinetic model for comparing the K^+, Rb^+, and Cs^+ transport of erythrocytes. Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. **7,** 359 (1972).

Horváth, I., M. Kramer, P. J. Bauer, K. G. Büki: The mode of action of primycin. Arch. Microbiol. **121,** 135 (1979).

Kövér, A., J. Gesztelyi, L. Kónya, A. Daróczy: Effect of primycin on excitation-contraction coupling of striated muscle Studia Biophys. **56,** 37 (1976).

Mészáros, L., T. König, M. Paróczay, K. Náhm, I. Horváth: Effect of primycin on the permeability of mitochondrial inner membrane. J. Antibiotics **32,** 161 (1979).

Mueller, P., D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott: Formation and properties of biomolecular lipid membranes. in: Recent Progress in Surface Science, Vol. 1 pp. 379—393 Academic Press, Inc., New York (1964).

Papahadjopoulos, D., S. Ohki: Stability of asymmetric phospholipid membranes. Science **164,** 1075 (1964).

Vályi-Nagy, T., A. Daróczy,: Effects of primycin on the induction of tryptophan pyrrolase. Biochem. Pharm. **16,** 1051 (1967).

Vályi-Nagy, T., J. Úri, I. Szilágyi: Primycin, a new antibiotic. Nature **174,** 1105 (1954).

GYÖKÉR IONTRANSZPORT VÁLTOZÁSOK KÖRNYEZETI STRESSZHATÁSOKRA*

ZSOLDOS FERENC

József Attila Tudományegyetem Növényélettani Tanszéke, Szeged

A környezeti tényezők, mint pl. a hőmérséklet, a pH-viszonyok, extrém tápanyag-, víz- és O_2-ellátottság, jelentős mértékben hatnak a növények ionfelvételére és ezen keresztül az ásványi táplálkozásra.

A növények ionfelvételét az utóbbi néhány évtizedben különösen behatóan vizsgálták, és kétségtelen, hogy ma már sok, a gyakorlat számára is érdekes adat áll rendelkezésre (1, 2). Sajnos ennek ellenére sem mondható el, hogy a tápanyagfelvétel mechanizmusát részleteiben is sikerült tisztázni. Nehezíti a kutatómunkát, illetőleg az általános törvényszerűségek levonását — egyebek mellett — az is, hogy a már említett külső tényezők hatására az egyes tápelemek felvételében mutatkozó különbségek még növényfajok szerint is jelentősen változhatnak (10).

A növények ionfelvételét — fenomenológiailag — a Q_{10} érték alapján két fő folyamatra lehet szétválasztani: az egyik esetben a Q_{10} érték általában 1,0—1,2 körüli, míg a másik esetben 2—3 vagy ennél magasabb is lehet (1, 2). Az előbbinél a felvételt főleg fizikai törvényszerűségek, így pl. diffúzió, anyagáramlás, kicserélődés és ezekhez kapcsolt passzív folyamatok szabályozzák. Ezzel szemben az utóbbi esetben a felvétel elsősorban a metabolizmushoz kapcsoltan történik, és ezért aktív mechanizmusról beszélünk.

A környezeti tényezők hatása az említett két mechanizmusra nagyon is eltérő, és függ a szóban forgó elem karakterétől. Általában a hőmérséklet-, a pH-, a fény-, továbbá az oxigénviszonyok is a metabolikus úton szabályozott transzport folyamatok közvetítésével jutnak érvényre.

Az előadás (áttekintés) két különösen fontos kultúrnövény, a rizs és a búza tápanyagfelvételét befolyásoló egyes környezeti tényezők, de elsősorban az alacsony hőmérséklet (hidegstressz) és a pH-viszonyok (H^+-stressz) hatásával foglalkozik.

A hőmérséklet jelentősége régóta ismeretes, ennek ellenére — különösen termofil növényekkel kapcsolatban — pl. a hidegstressz hatással összefüggő elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos kérdések megnyugtatóan

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

még ma sem tisztázottak. A pH-val kapcsolatos táplálkozásélettani problémák, a hőmérséklethatással összehasonlítva, látszólag kevésbé látványosak; azonban éppen a kemizálással (vegyszeres gyomirtással) összefüggésben, többnyire közvetett úton, ugyancsak okozhatnak nem várt kedvezőtlen hatást.

Anyag és módszer

Tápanyag-(ion)felvételi kísérleteinket vízkultúrában, kontrollált körülmények között (CONVIRON klímakamrában) nevelt fiatal (6—8 napos) rizs és búza növényekkel végeztük (12). A rövid időtartamú ionfelvételi vizsgálatok során részben sugárzó, részben stabil izotópokat alkalmaztunk. Az ^{15}N stabil izotópok mérése tömegspektrométerrel a Nemzetközi Atomenergia Ügynökség, illetőleg az Osztrák Reaktorcentrum Mezőgazdasági Intézetében (Seibersdorf) történt. A laboratóriumi vizsgálatokat — esetenként — kiegészítettük szabadföldi kísérletek és megfigyelések (Öntözési Kutató Intézet, Szarvas, Gabonatermesztési Kutató Intézet, Szeged) eredményeivel.

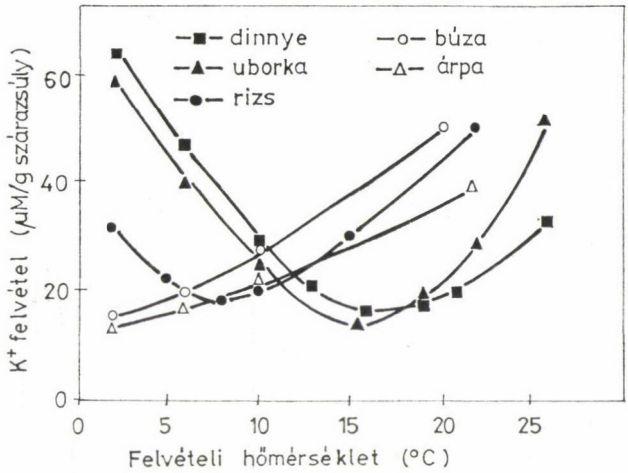
Kísérleti eredmények és megbeszélés

1. Hőmérséklet hatása az ionfelvételre. Mivel az alacsony hőmérséklet okozta károsodás jelentős limitáló faktor a mezőgazdasági termelésben, így nem meglepő, hogy ez a kérdés mind jobban az érdeklődés középpontjába kerül. A mérsékelt égövben, az ún. termofil növényeknél, már fagypont felett is, amennyiben a hőmérséklet 10—12 °C alá süllyed, jelentősebb hidegkárosodással lehet számolni (4, 6).

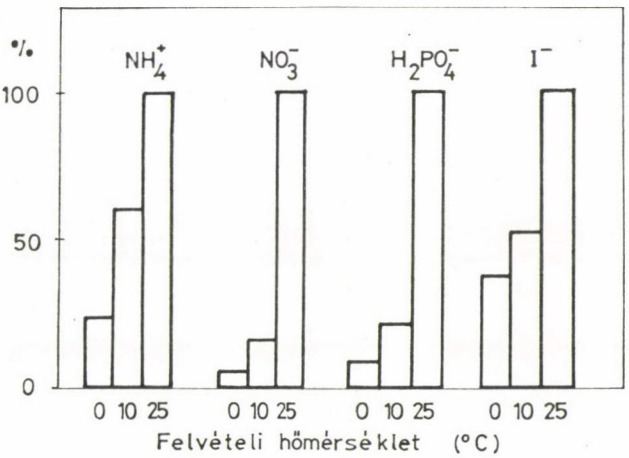
A gyökér környezetében a növekedés ideje alatt a hőmérséklet általában alacsonyabb, mint a levegőé, ugyanakkor a gyökérzóna kevésbé van kitéve olyan hirtelen változásoknak, mint a föld feletti szervek. Ennek eredménye lehet az, hogy a gyökér hőmérsékleti optimuma valamivel mindig alacsonyabb, mint pl. a hajtásé.

A gyökér, mivel kevésbé adaptálódott a szélsőségesebb hőmérsékletekhez, sokkal érzékenyebb a hirtelen változásokra, mint a föld feletti szervek. Ebből következik, hogy a legtöbb növény elpusztulna, ha olyan (főleg hirtelen változó) hőmérsékleti hatásoknak tennénk ki, mint amilyeneket a hajtás nagyobb károsodás nélkül elvisel.

Az elmondottakból következik, hogy a gyökér (környezetének) hőmérséklete döntő fontosságú a növény „túlélése" szempontjából is. Jóllehet, a hidegkárosodás tünetei az egyedfejlődés során az egyes fajok szerint is változhatnak, mindazonáltal az alapul szolgáló fizikai-kémiai és biokémiai mechanizmusok folyamatai a legtöbb hidegérzékeny (termofil) növénynél közel azonosak (7).



1. ábra. A hőmérséklet hatása excizált gyökerek K^+-felvételére termofil és nem termofil növényeknél. Felvételi oldat: 0,5 mM $K/^{86}Rb/Cl$. Felvételi idő: 50 perc



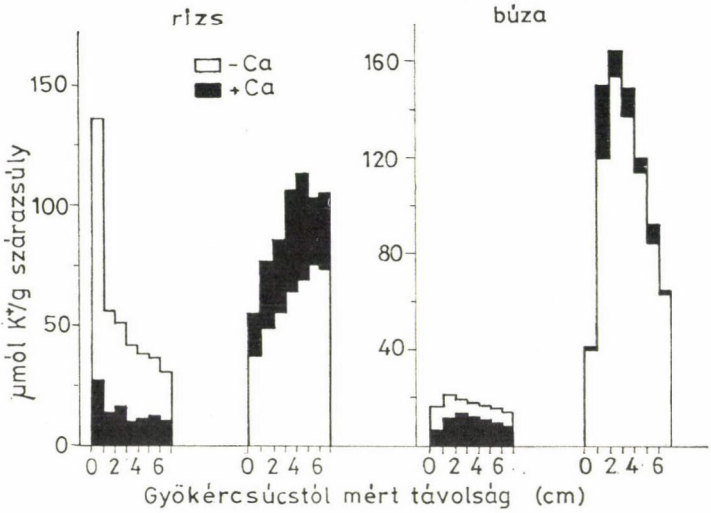
2. ábra. A hőmérséklet hatása rizsgyökerek ionfelvételére. Az izotóppal jelölt felvételi oldat: 0,5 mM $^{15}NH_4Cl$, $Na^{15}NO_3$, ill. 0,1 mM $KH_2{}^{32}PO_4$. Felvételi idő: 60 perc

Az újabb kutatások szerint a hideghatásra elsődlegesen tapasztalható fizikai reagálás: a sejtmembránok jól megfigyelhető „fázis-változása", amely természetesen nagymértékben befolyásolja a membránokhoz kapcsolódó valamennyi fiziológiai funkciót, köztük a transzport folyamatokat is.

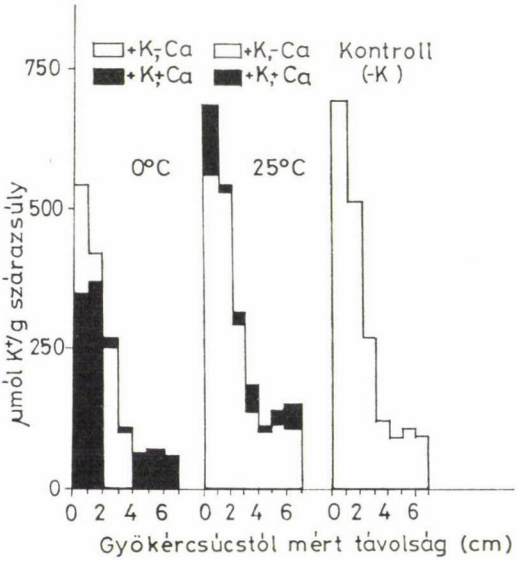
1.1. Hidegstressz hatása és utóhatása eltérő hőmérsékletigényű növények iontranszportjára. Termofil növények gyökerei hirtelen hőmérsékletcsökkenést követően K^+-felvételi anomáliát mutatnak. Ennek eredményeképpen 0 °C hőmérsékleten vagy annak közelében a várhatónál jelentősen magasabb a K^+-influx (1. ábra).

Fontos megjegyezni, hogy az anomália az esszenciális elemek közül csupán a K esetében figyelhető meg és kizárólag termofil növényekre jellemző (2. ábra).

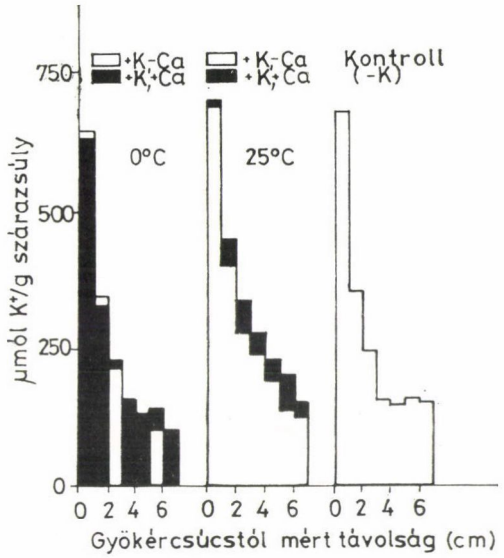
A K^+-influx anomália mértéke és a gyökér hossza, pontosabban életkora között szoros kapcsolat mutatható ki: minél rövidebb (fiatalabb) a gyökér,



3. ábra. A Ca^{2+} és a hőmérséklet hatása rizs (bal oldalt) és búza (jobb oldalt) gyökérszegmentek K^+-felvételére. Felvételi oldat: 1 mM K(^{86}Rb)Cl, 1 mM $CaCl_2$ (ahol jelölve van). Felvételi idő: 60 perc



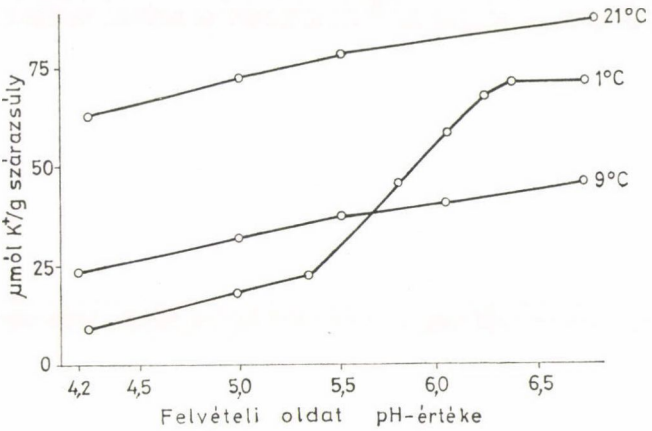
4. ábra. A Ca^{2+} és a hőmérséklet hatása rizs gyökérszegmentek K-tartalmára. Felvételi oldat: 1 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$ (ahol jelölve van). Felvételi idő: 60 perc



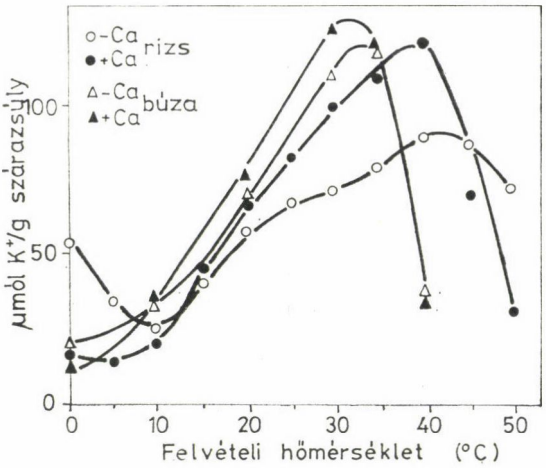
5. ábra. A Ca^{2+} és a hőmérséklet hatása búza gyökérszegmentek K-tartalmára. Felvételi oldat és idő azonos a 4. ábránál közöltekkel

annál kifejezettebb a K^+-felvételi anomália. Az is megállapítást nyert, hogy az anomáliás K^+-felvétel meghatározott gyökérzónához kötött. Rizs esetében pl. elsősorban a csúcsi 1 cm-es szegmentben mutatható ki (3. ábra).

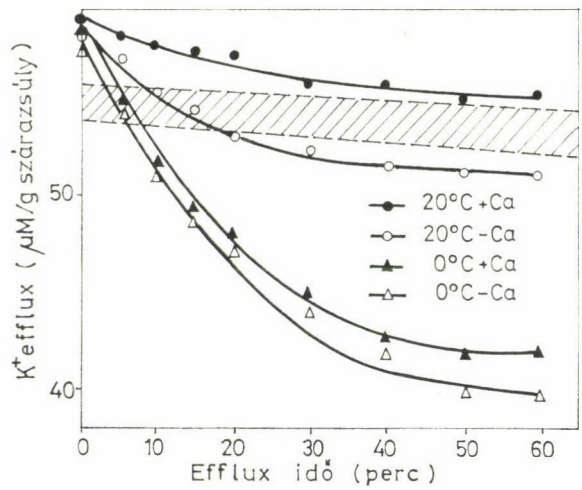
A K^+-felvételi anomália jobb megértéséhez nagyban hozzájárultak azok a vizsgálatok, amelyek az egyes gyökérszegmentek K-tartalmával foglalkoznak. Megállapítást nyert, hogy alacsony hőmérsékleten a gyökérszegmentek K-tartalma, főleg a csúcsi zónában, a sejtmembrán megnövekedett permeabilitása következtében jelentősen csökken (4. ábra).



6. ábra. A hőmérséklet és a pH hatása rizsgyökerek K^+-felvételére
Felvételi oldat: 0,5 mM $K(^{86}Rb)Cl$. Felvételi idő: 60 perc



7. ábra. A Ca^{2+} és a hőmérséklet hatása rizs- és búzagyökerek K^+-felvételére. Felvételi oldat: 1 mM K(^{86}Rb)Cl, 1 mM $CaCl_2$ (ahol jelölve van). Felvételi idő: 60 perc



8. ábra. A hőmérséklet és Ca^{2+} hatása rizs- és búzagyökerek K^+-effluxára. Előinkubálási idő: 50 perc 1 mM K(^{86}Rb)Cl oldatban; efflux-oldat: desztillált víz, ill. 1 mM $CaCl_2$. (A búza adatai a vonalkázott tartományba estek, ezért külön nem jelöltük az efflux görbéket)

Tekintettel a K^+ fontos anyagcsere-élettani szerepére, várható volt, hogy ilyen körülmények között (azaz a hidegkezelést követő jelentős K-csökkenés miatt) a hidegkárosodás más tünetei is (pl. növekedészavar) fellépnek (12).

Fontos megjegyezni, hogy teljesen azonos kísérleti körülmények között a nem termofil búzánál, sem ionfelvételi anomália, sem K-veszteség a gyökércsúcsban nem következik be, s ennek megfelelően növekedészavar sem tapasz-

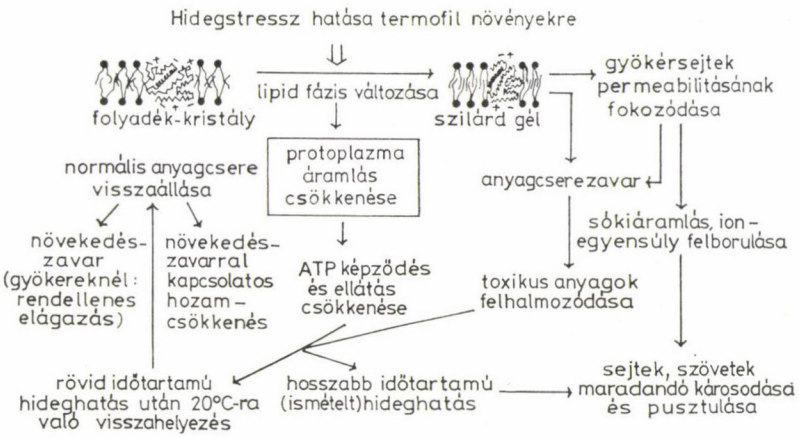
talható (3. és 5. ábra). Fentiekből arra következtetünk, hogy a termofil és nem termofil növények sejtfala, de még inkább a membrán szerkezete (összetétele) között jelentős lehet az eltérés.

Az alacsony hőmérsékletű K^+-influx anomália és az egyes termofil fajok (fajták) eltérő hidegérzékenysége között korreláció mutatkozik: minél hidegérzékenyebb a faj (fajta), annál intenzívebb az azonos időtartamra vonatkoztatott anomáliás K^+-influx. Ezért a K^+-influx anomália gyors és egyszerű kvantitatív eljárás kidolgozását tette lehetővé a hidegtűrő képesség minősítésére és objektív összehasonlítására (11).

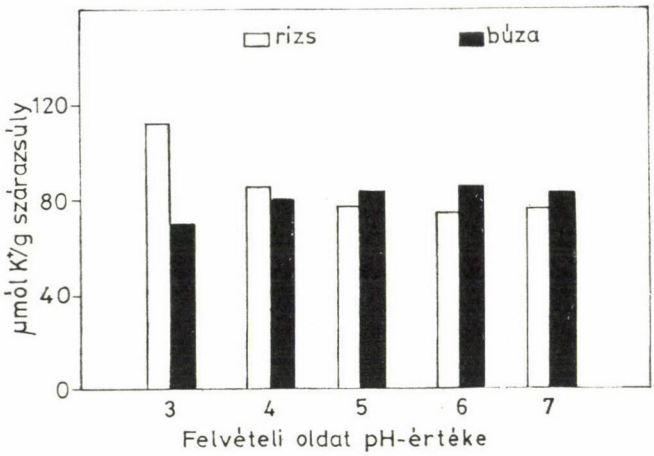
1.2. Az anomáliás K^+-transzport és jellegzetességei. Az anomálás K^+-influx egy jelentősen megnövekedett, negatív hőmérsékleti koefficiensű abszorpciós folyamatban nyilvánul meg, melynek fellépése kritikusan függ a lehűtés sebességétől. Fokozatos, lassú hűtés esetén az anomáliás K^+-influx lényegesen mérséklődik (15).

Az anomáliás K^+-influxot sem „uncouplerek" (pl. 2,4-DNP), sem légzésgátlók (pl. KCN) alapvetően nem befolyásolják (10). Ezzel szemben a felvételi oldat pH-ja, továbbá Ca^{2+} tartalma igen érzékenyen hat a folyamatra: 5,5 pH alatt vagy meghatározott mennyiségű Ca^{2+} jelenlétében az anomália gyakorlatilag megszűnik (6. és 7. ábrák).

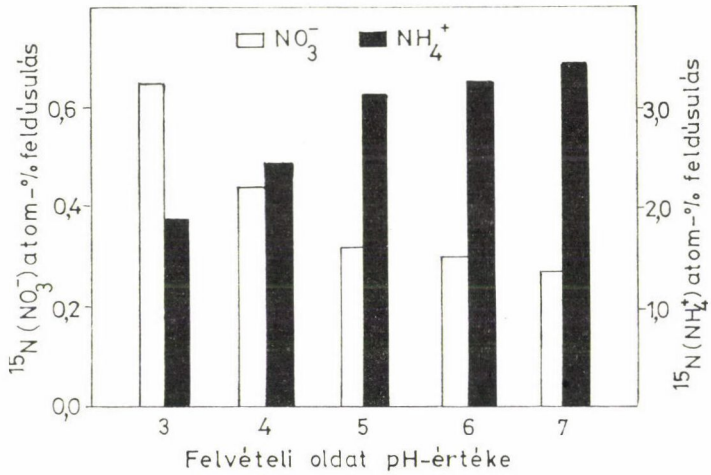
Az influx anomáliához hasonlóan efflux anomália is kimutatható: termofil növények gyökerei alacsony hőmérsékleten jelentős mennyiségű K-ot bocsátanak a külső (vizes) közegbe (8. ábra). Ca^{2+} jelenléte, amint ezt a 4. ábra adatai is jól szemléltetik, a K^+-effluxot nem befolyásolja, sőt ilyen körülmények között a K-veszteség mértéke még fokozottabb, nyilván az influx gátlása miatt. Búzánál hasonló kísérleti körülmények között ez a hatás nem mutatható ki (8. ábra).



9. ábra. Termofil növények (gyökerek) hidegstressz hatására végbemenő (membrán) károsodásának lehetséges főbb útjai



10. ábra. A pH hatása rizs- és búzagyökerek K^+-felvételére. Felvételi oldat: 1 mM $K(^{86}Rb)Cl$ + + 0,5 mM $CaCl_2$. Felvételi idő: 60 perc

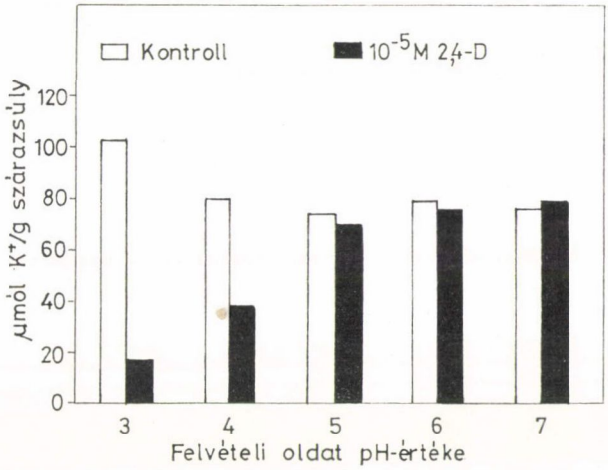


11. ábra. A pH hatása rizsgyökerek NO_3^- és NH_4^+-felvételére. Felvételi oldat: 1 mM $Na^{15}NO_3$ + 0,5 mM $CaCl_2$, ill. 1 mM $^{15}NH_4Cl$. Felvételi idő: 60 perc

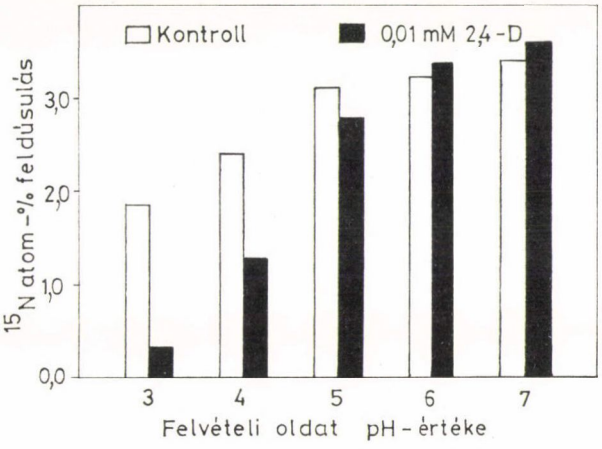
1.3. Termofil növények hidegkárosodásának lehetséges mechanizmusa. Stresszhatások általában közvetlen vagy közvetett módon a szövetek és sejtek sérülését idézik elő, amely a metabolikus folyamatok és a sejtstruktúrák (membránstruktúrák) károsodásához vezetnek (5, 6). A plazmamembrán struktúrájában és funkciójában alacsony hőmérsékleten bekövetkező változás nyilvánvalóan kulcskérdés, mivel ezen keresztül történik az egyes ionok felvételének szabályozása, továbbá a különböző elektrolitok (vagy egyéb anyagok, így pl. szabad aminosavak) membránkárosodáskor többnyire bekövetkező kiszivárgása (leakage).

A membránlipidek fázisállapotát jórészt a lipidek zsírsavláncainak telítettségi foka és a poláris csoportok minősége határozza meg, azonban a környezeti (stressz) tényezők közvetlen hatása ugyancsak jól ismert (7). Adott lipidösszetétel mellett alacsonyabb hőmérséklet hatására az eredetileg folyadék-kristályos membránszerkezet szilárd (gél) struktúrát vesz fel (9. ábra). A továbbiakban nem foglalkozunk a sémán bemutatott egyes részletfolyamatokkal, annál is inkább, mivel a termofil növények hidegkárosodásának lehetséges mechanizmusát számosan leírták (6, 7, 15).

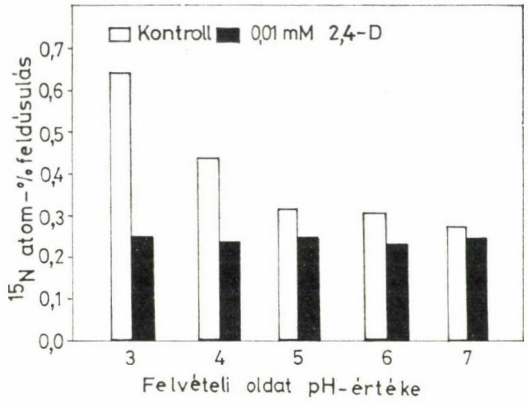
2. A pH hatása az ionfelvételre. A külső közeg (talaj, tápoldat) pH-ja, főleg extrém körülmények között, jelentősen befolyásolja a gyökér ionfelvé-



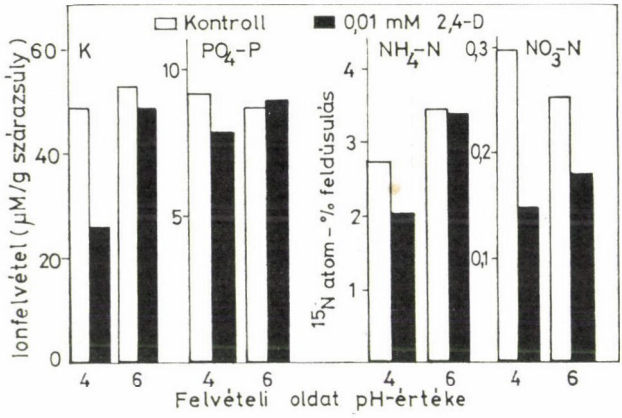
12. ábra. A pH és 2,4-D együttes hatása rizsgyökerek K^+-felvételére. Felvételi oldat: 1 mM K(^{86}Rb)Cl, 0,01 mM 2,4-D (ahol jelölve van); felvételi idő: 60 perc



13. ábra. A pH és 2,4-D együttes hatása rizsgyökerek NH_4^+ felvételére. Felvételi oldat: 1 mM $^{15}NH_4Cl$, 0,01 mM 2,4-D (ahol jelölve van). Felvételi idő: 60 perc



14. ábra. A pH és 2,4-D együttes hatása rizsgyökerek NO_3^- felvételére. Felvételi oldat: 1 mM $Na^{15}NO_3$, 0,01 mM 2,4-D (ahol jelölve van). Felvételi idő: 60 perc



15. ábra. A pH és 2,4-D együttes hatása búzagyökerek ionfelvételére. Felvételi oldat: 1 mM K(^{86}Rb)Cl, 0,1 mM $KH_2{}^{32}PO_4$, 1 mM $^{15}NH_4$, 1 mM $Na^{15}NO_3$ és 0,01 mM 2,4-D (ahol jelölve van). Felvételi idő: 60 perc

telét. Néhány régebbi munka nem tulajdonított a pH-viszonyoknak különösebb jelentőséget (9), de újabb adatok azt bizonyítják, hogy a pH csökkenése, pl. vegyszeres gyomirtásnál, nagyon is kedvezőtlenül hat az ionfelvételre és más élettani folyamatokra is (12, 13). Általános szabály, hogy az alacsony (savas) pH az anionok, míg a magasabb (lúgos) a kationok felvétele számára kedvezőbb. Ezzel kapcsolatban bizonyos kompetitív gátló hatás is megmutatkozik.

2.1. A pH (H^+-stressz) hatása az ionfelvételre. A fiziológiás pH-tartomány általában 4—8 pH értékek között található. Azonban az optimumot illetően az egyes növényfajok között meglehetősen nagy eltérés mutatkozik (8).

A pH legszembetűnőbb hatását úgy az ionfelvételben, mint a sejtmembrán (plazmalemma) permeabilitás változásában erősen savanyú környezetben

lehet megfigyelni (10. és 11. ábrák). A H^+ ion koncentráció emelkedése (pH csökkenés) következtében nyilvánvalóan nagymértékben (károsan) fokozódik a plazmalemma permeabilitása és ezzel együtt egyes anyagok (ionok, szabad-aminosavak stb.) kiszivárgása a sejtekből (6, 15).

A 11. ábra adatai egyébként jól mutatják a két N-vegyület pH-tól függő és nagyon eltérő transzport tulajdonságait is. Adataink, ha közvetve is, amellett szólnak, hogy az NH_4^+ membrántranszportjában az NH_3 játszhat elsődleges szerepet. E megállapítás az NH_4-N gyakorlatból is jól ismert gyorsabb felvételével (hasznosulásával) ugyancsak összhangban van és jól magyarázza a két N-vegyület között alacsonyabb hőmérsékleten is tapasztalható különbséget (2. ábra).

A H^+ ionok káros hatását a külső környezetben levő Ca^{2+} ionok, amelyek a plazmalemma stabilitásának fenntartásában igen fontos szerepet játszanak, jelentős mértékben csökkentik (9, 13). Magas pH-nál, ahol elsősorban az OH^- ionok hatásával kell számolni, lényegesen kisebb mértékűek a sejtmembránok permeabilitásában, illetőleg az iontranszportban megfigyelhető változások (9).

2.2. A pH és a hormonbázisú herbicidek együttes hatása az ionfelvételre. A gyakorlatban még napjainkban is széles körben alkalmaznak vegyszeres gyomirtóként ún. hormonbázisú (2,4-D és MCPA) herbicideket. Mivel jól ismert, hogy a növényi hormonok (auxinok) felvételét és ezen keresztül növekedésélettani hatását a H^+ ion koncentráció jelentős mértékben befolyásolja (3), ezért fontosnak tartottuk az ilyen hatóanyag tartalmú vegyszeres gyomirtószerek ionfelvételre gyakorolt hatásának tanulmányozását eltérő pH-viszonyok mellett. A kapott vizsgálati adatokat a 12., 13., 14. és 15. ábrák mutatják be.

Az ábrák jól szemléltetik, hogy 2,4-D jelenlétében a pH csökkenésével az igen alacsony herbicid koncentráció esetében is szembetűnő a gátló hatás. A kapott eredmények végül is nem meglepők, ha arra gondolunk, hogy erősen savanyú környezetben olyan mértékben fokozódik a gyökér 2,4-D felvétele, amely már viszonylag rövid idő alatt toxikus koncentrációt ér el (14).

Fentiekből nyilvánvaló, hogy az auxin-herbicidek fiziológiailag sokkal toxikusabbak savanyú közegben, mint pl. a semleges körüli pH értékeknél. Az auxin típusú vegyületek meglehetősen lipofilek, gyenge savak (pk: 4,7). Ezzel magyarázható, hogy savanyú közegben a sejtek a nem disszociált auxin molekulákat gyorsabban felveszik, mint magasabb pH-nál az auxin anionokat (3).

Összefoglalás

Külső (stressz) tényezők hatása az ionfelvételre növényfajok szerint eltérő, és jelentős mértékben függ a szóban forgó elem karakterétől. A hirtelen hőmérséklet-csökkenés (hidegstressz), valamint az alacsony pH (H^+-stressz) hatására történő K^+-felvétel alapján a növényeket két nagyobb csoportra

lehet felosztani. Az egyik (termofil) csoport 0 °C-on, vagy alacsony pH-nál anomáliás K^+-felvételt mutat, míg a másikra ez nem jellemző. A herbicidek ionfelvételre gyakorolt hatását, hatóanyagtól függően, a mindenkori pH-viszonyok jelentősen befolyásolják. Az auxin-bázisú gyomirtószerek fitotoxicitása savanyú környezetben fokozottabb.

IRODALOM

1. Bowling, D., J. F.: Uptake of Ions by Plant Roots. Chapman and Hall, Wiley and Sons. New York (1976).
2. Epstein, E.: Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Wiley and Sons, Inc. New York (1972).
3. Goldsmith, M. H. M.: Ann. Rev. Plant Physiol. **28,** 439—478 (1977).
4. Langridge, J., McWilliam, J. R.: in Thermobiology, pp. 231—292 (Ed. A. H. Rose), Academic Press, London, New York (1967).
5. Levitt, J.: Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York (1972).
6. Lyons, J. M.: Ann. Rev. Plant Physiol. **24,** 445—466 (1973).
7. Lyons, J. M., Raison, J. K., Steponkus, P. L.: The Plant Membrane in Response to low Temperature: An Overview. in: Low Temperature Stress in Crop Plants. The Role of the Membrane pp. 1—24 (Eds. J. M. Lyons, D. Graham, J. K. Raison). Academic Press, New York—London (1979).
8. Mengel, K., Kirkby, E. A.: Principles of Plant Nutrition. (Eds. Int. Potash Inst. Worblaufen—Bern). Der Bund AG. Bern, Switzerland (1978).
9. Moore, D. P.: in: The Plant Root and Its Environment. pp. 135—151 (Ed. E. W. Carson) Univ. Press Virginia (1974).
10. Zsoldos, F.: Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. **119,** 169—173 (1968).
11. Zsoldos, F.: Newsletter on the Application of Nuclear Methods in Biology and Agriculture **5,** 18—19 (1975).
12. Zsoldos, F., Karvaly, B.: Physiol. Plant. **43,** 331—336 (1978).
13. Zsoldos, F., Karvaly, B., Tóth, I., Erdei, L.: Physiol. Plant. **44,** 395—399 (1978).
14. Zsoldos, F., Haunold, E.: Physiol. Plant. **47,** 77—80 (1979).
15. Zsoldos, F., Karvaly, B.: in: Low Temperature Stress in Crop Plants. The Role of the Membrane, pp. 123—139 (Eds. J. M. Lyons, D. Graham, J. K. Raison) Academic Press, New York—London (1979).

SZENZITIVITÁS ÉS REZISZTENCIA: IONTRANSZPORT ÉS ATPáz AKTIVITÁS SÓTŰRŐ NÖVÉNYEKBEN*

ERDEI LÁSZLÓ

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet

1. Stressz, sérülés, rezisztencia és adaptáció

A növények adaptálódnak a környezeti feltételekhez, azaz fokozatosan olyan irányban változnak meg, hogy az illető faj populációjának fennmaradását meghatározó vagy limitáló környezeti faktor hatása, a *deformáció*, minél kisebb legyen. Az adaptáció mind a makroszkópikus, populációs, mind pedig a szerv, sejt és szubcelluláris, így membrán szinten is megnyilvánul. Ha az élő szervezet számára kedvezőtlen környezeti faktor gyorsan és szélsőséges formában hat, úgy adaptálódásra már kevés az esély. Az ilyen stresszhatások közvetlen vagy közvetett módon *sérüléshez*, a metabolikus folyamatok és sejtstruktúrák károsodásához vezetnek.

A növények környezeti hatásokra adott válaszreakcióit, az adaptációs mechanizmusokat már régóta és kiterjedten tanulmányozzák. A kutatás során összegyűlt hatalmas anyagot LEVITT építette egyetlen logikai rendszerré (16). A LEVITT által használt nomenklatúra és felosztás szerint bemutatjuk a magas sókoncentráció által okozott különböző típusú sérüléseket (1. ábra). Elsődleges stresszhatáskor közvetlen vagy közvetett módon a magas sókoncentráció okozza a sérülést, míg másodlagos stressz esetén a károsító faktor nem maga a só, hanem az extrém koncentráció következtében fellépő egyéb, pl. ozmotikus hatás vagy a tápanyagfelvételben mutatkozó zavar. A sérülésekhez hasonlóan a rezisztencia típusai és megkülönböztethetők a stressz elsődleges vagy másodlagos természete szerint (2. és 3. ábra). A rezisztenciamechanizmus elvileg kétféle lehet: *a)* A stressz *megelőzése;* a növény elkerüli, hogy a stressz-szel termodinamikai egyensúlyba jusson. Ez vagy fizikai értelemben vett elszigetelődéssel, vagy pedig egy steady-state kémiai (metabolikus) folyamattal érhető el. A sóstressz esetében például a növény alacsony intracelluláris sókoncentrációt tart fenn, amelyet az illető ionra való alacsony membránpermeabilitással, vagy pedig egy kifelé irányuló aktív pumpával is megvalósíthat.

b) A stressz *tolerancia;* a növény termodinamikai egyensúlyba kerül a stressz-szel anélkül, hogy sérülés következne be.

Evolúciós szempontból az első mechanizmus a fejlettebb, a második az ősibb. Ennek megfelelően az előző a magasabb rendű növényekre, az utóbbi a

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.



1. ábra. **A sóstressz által előidézett sérülések típusai**



2. ábra. **Az elsődlegesen ható stressz elleni rezisztencia mechanizmusai**



3. ábra. **A másodlagosan ható stressz elleni rezisztencia mechanizmusai**

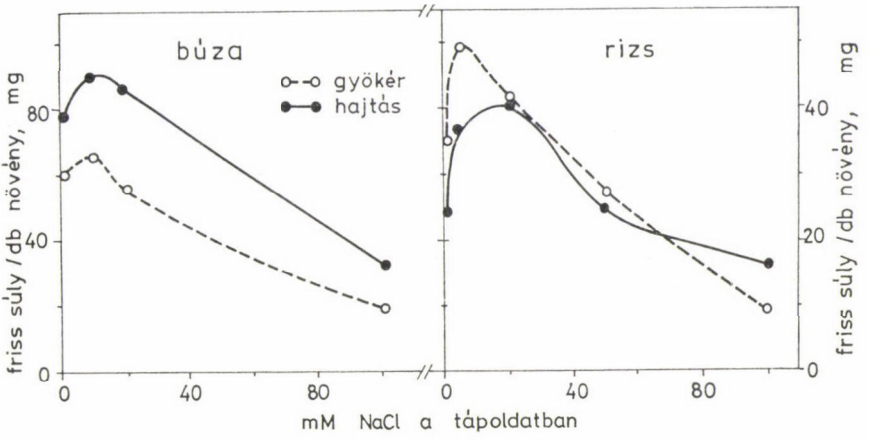
primitívebb csoportokra jellemző. Érdekes még azt is megemlíteni, hogy a fejlődéstörténet során kezdettől fellépő környezeti tényezővel (pl. alacsony hőmérséklet) szembeni rezisztencia mechanizmusa tolerancia, míg a később érvényesülő faktorral (pl. a szárazföldi magasabb rendű növények szárazságtűrése) szemben a megelőzés mechanizmusa fejlődött ki (a példa esetében a turgor fenntartása).

2. Sóstressz és membránfunkció

A magas sókoncentrációk növekedésre és a metabolizmusra való hatását igen széles körűen vizsgálták (6). E vizsgálatok tükrében úgy tűnik, hogy a sótűrőképesség vonatkozásában a sótűrő (halofiton) és sóérzékeny (glükofiton) növények között inkább kvantitatív, mint kvalitatív természetű különbség van. Így például mind a sótűrő, mind a sóérzékeny fajok citoplazmikus eredetű enzimjeit hasonló mértékben gátolja az *in vitro* adott NaCl (5, 8, 9).

A sóhatás a természetben leginkább NaCl, Na_2CO_3-hatás. Ebben az esetben mint a sóhatás (szalinitás) egyik esete, szodicitásról és nátrofil, illetve nátrofob növényekről beszélünk. A legtöbb növényfaj számára a szalinitás növekedésgátló faktor. A sótűrőek azonban nemcsak tolerálják a magasabb sókoncentrációkat, hanem esetenként a NaCl még fokozza is növekedésüket (5, 6, 19). Míg a sóra érzékeny növények már néhányszor 10 mM NaCl jelenlétében károsodnak, a sótűrő fajok néhányszor 100 mM koncentrációt is elviselnek. Kisebb különbségek a lényegében szenzitív fajok között is észlelhetők. Gabonafélék közül pl. a rizs a búzához viszonyítva magasabb NaCl koncentrációk mellett is jól növekszik (4. ábra).

Vizsgáljuk meg a szalinitás közvetlenül a membránra, elsősorban a membrán lipidösszetételére való hatását. A membrán felépítése és a struktúra fenn-



4. ábra. Búza és rizs növények növekedése különböző sókoncentrációjú tápoldatokban

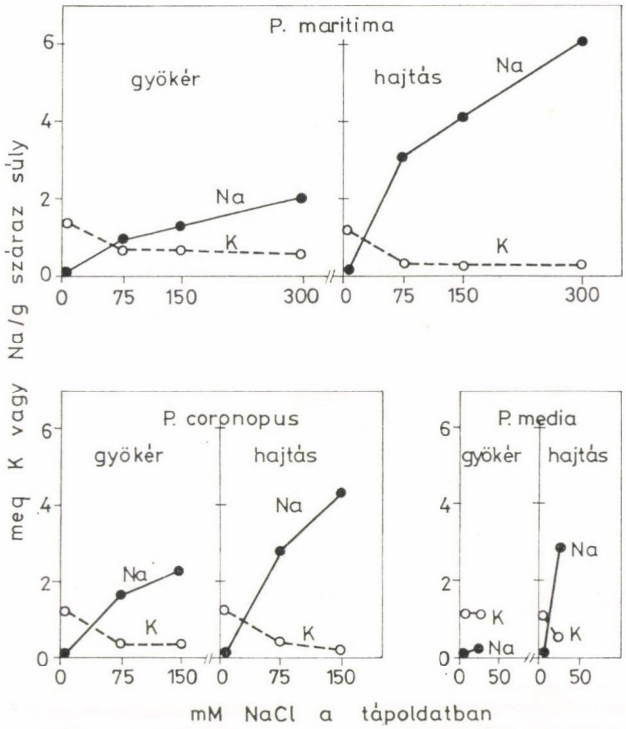
tartása szempontjából fontos esszenciális makrotápelemek közül a P, Ca, Mg és a K a legfontosabbak. A P a foszfolipidek alkotórésze, hiánya foszfolipid deficienciához, a membrán permeabilitásának abnormális megnövekedéséhez vezet. A kétértékű kationok a membránstruktúra, a K^+ a membránpotenciál fenntartásában játszanak szerepet. Különleges esetekben ezek az ionok is megjelenhetnek a környezetben stresszhatást előidéző nagyobb koncentrációban.

Sóérzékeny növényeknél NaCl hatására a membránalkotó foszfo- és galaktolipidek mennyisége csökken, sótűrőeknél ezzel szemben közepes (mintegy 100 mM) koncentráció mellett adaptív módon átmenetileg növekedhet, de magas Na koncentrációk hatására itt is a membrán károsodása figyelhető meg.

A lipidek a stresszfeltételek alatti transzportban általános membránfelépítő szerepük mellett speciális feladatot is elláthatnak. A sótűrő növények membránjaiban például viszonylag nagy mennyiségű szulfolipid mutatható ki, amely valószínűleg az ATPáz komplex komponense. Így a membrán szelektív permeabilitása a transzport-ATPáz működésén keresztül is lipid-függő lehet (13, 15). A membrán valamely ionra való szelektív permeabilitása azonban közvetlenül is összefügghet valamely lipidkomponens viszonylagos mennyiségével. Szőlőfajták klorid-érzékenysége a galaktolipidek mennyiségével állítható korrelációba: a több galaktolipidet tartalmazó fajták a klorid ionokat jobban akkumulálták, ami károsodáshoz vezetett (12). Gabonaféléknél és más esetekben is sikerült kapcsolatot találni a lipidösszetétel és a sótűrés között (3, 4, 17, 18).

Az iontranszport mechanizmusok jelentősen hozzájárulhatnak a különböző sótűrőképességű növények közötti kvantitatív különbségekhez, tekintve, hogy a só (ionok) megfelelő kompartmentizációja a sótűrés talán legfontosabb előfeltétele. A sótűrő növényeknek, hogy a sejt turgor állapotát a magas környezeti sókoncentráció mellett is fenn tudják tartani, hatékony ozmoregulációs mechanizmussal kell rendelkezniük. Ezt a feladatot az esetek többségében a vakuolumba irányuló iontranszport mechanizmus látja el.

A.kompartmentizáció nemcsak intracellulárisan, hanem a növény makroszkópikus részei között is megnyilvánul. Ebben az esetben a hosszú távú transzlokációs mechanizmus szelektivitása és kapacitása lehet a sebességlimitáló tényező. Példaként bemutatjuk három, különböző sótűrő képességű *Plantago* faj (a sótűrő *P. maritima*, a közepesen sótűrő *P. coronopus* és a sóérzékeny *P. media)* gyökerében és hajtásában a Na és K tartalom változását a tápoldat NaCl koncentrációjának emelkedésével (5. ábra). Látható, hogy a Na a hajtásban (levélben) akkumulálódik, és a gyökérben a sótűrő képességtől függetlenül körülbelül azonos, alacsonyabb szinten marad. Úgy tűnik, hogy a gyökér az érzékenyebb szerv; további kísérletek azt igazolták, hogy a három növényfaj közötti különbség a gyökérből a hajtásba irányuló transzlokációs rendszer kapacitásában van. Na-ozmotikus stressz esetén a *P. maritima* azonnal megkezdte a Na hajtásba való szállítását, míg a másik két faj ezt csak késéssel



5. ábra. A Na- és K-tartalom változása a tápoldat NaCl koncentrációjának emelkedésével különböző sótűrőképességű *Plantago* fajok hajtásában és gyökerében

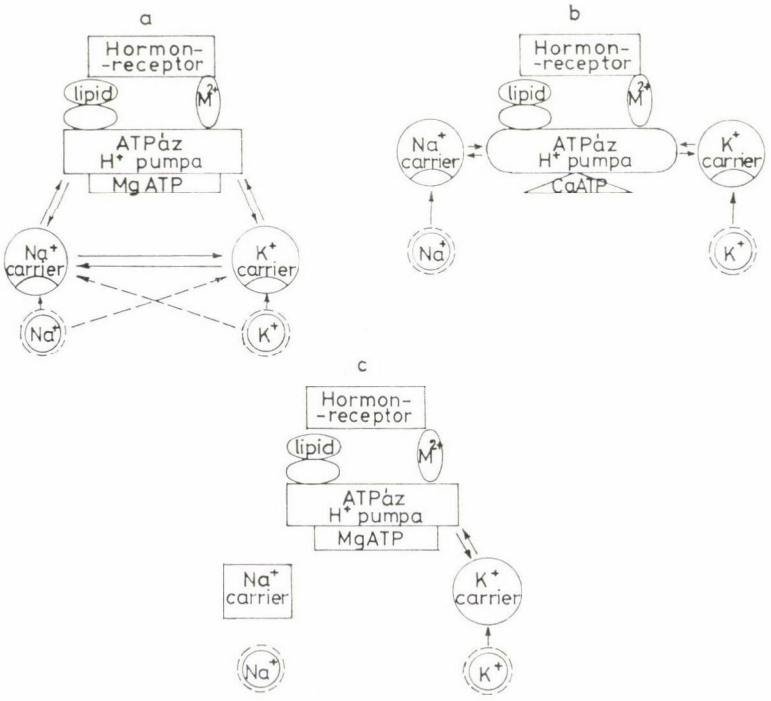
tette, aminek következtében a gyökér Na-tartalma abnormálisan megemelkedett (1).

Ismeretes, hogy a növényi alkáli kationtranszport egy hányada metabolikus energiától függ, és valószínűleg H^+-pumpa ATPáz működéséhez kapcsolódik. E transzportmechanizmus effektivitásától függ az ionok szelektív, megfelelő mértékű akkumulációja vagy kipumpálása. A plazmalemmához kapcsolódó ATPáz alkáli kationok jelenlétére adott válaszreakciója különbözik a sóérzékeny és sótűrő fajoknál. Korábbi és saját vizsgálataink szerint is a sótűrő növények gyökeréből preparált membránfrakció ATPáz aktivitása magas sókoncentráció (NaCl) hatására gátlódik, míg a sóérzékeny növényeké K-mal és Na-mal aktiválható (2, 11).

Az első esetben a növény a plazmamembrán ionpermeabilitását csökkentve nehezíti meg a Na belépését, a bekerülő ionokat pedig a hajtásba szállítja, ahol a vakuolumban akkumulálja. Ezzel egyidőben a növekedés révén a só hígulása is bekövetkezik. Az ilyen típusú sótűrő növény tehát mind megelőzéssel (alacsony membrán permeabilitás, hígítás, esetleg sómirigyen keresztüli kiválasztás), mind pedig toleranciával (akkumuláció a vakuolumban) válik sórezisztenssé.

A sóérzékeny növények ATPáz mechanizmusa valószínűleg kifelé irányuló ionpumpaként szolgál. Ismeretes, hogy pl. bab estében a levélen keresztül bejuttatott jelzett Na hamarosan a gyökéren keresztül kipumpálódik a környezetbe, a gyökéren keresztül felvett Na pedig nem transzlokálódik a gyökérnyaknál feljebb. Itt is megelőzéssel igyekszik a növény kivédeni a sóhatást, de a transzportmechanizmus kis kapacitása miatt ez csak korlátozott mértékben, kis ionkoncentrációk mellett lehetséges.

Ismeretes, hogy az ATPáz enzim monovalens kationokkal csak bizonyos kétértékű kationok jelenlétében stimulálható: az aktiváláshoz rendszerint Mg^{2+} szükséges, amelyet azonban Mn^{2+} helyettesíthet. A Ca^{2+} rendszerint szétkapcsolja a hatást (2, 10, 14). Így tehát a sótűrés kialakításában szerepet játszó mechanizmus bonyolult regulációs rendszerben működik, beleértve a hormonális reguláció lehetőségét is. Az ATPáz komplex katalitikus (ATP-bontó) egysége, valamint az ion karrier proteinek egy lehetséges regulatív jellegű kölcsönhatását mutatja be a 6. a és b ábra. A 6. c ábra azt a szabályozási lehetőséget jelzi, amikor a nagy külső ionkoncentráció következtében az illető ion (pl. Na^+) szállítója alloszterikusan gátlódik (7), míg a másik, pl. K^+ ion transzportja zavartalan marad. Ez történt a már említett *Plantago maritima* esetében is: a 300 mM NaCl jelenlétében nőtt növények ATPáza Na^+-mal nem, de K^+-mal sti-



6. ábra. A növényi transzport-ATPáz működési sémája. A nyilak a funkcionális egységek közötti kölcsönhatás lehetőségét jelzik. Magyarázat a szövegben

mulálható maradt (Mg^{2+} jelenlétében), ugyanakkor a Na^{+} influx is legátlódott a lényegében változatlan K^{+} influx mellett (2).

Összefoglalóképpen azt állapíthatjuk meg, hogy a növények sótűrése az evolúció során kifejlődött, genetikailag determinált, de nagyrészt adaptív jellegű képesség. Obligát sótűrő magasabb rendű szárazföldi növényfaj alig van (talán a tengerparti Salicornia sp.). A rezisztencia mindenképpen egy megfelelő ozmoregulációs mechanizmust tételez fel; ennek részei egyrészt a megfelelő transzportrendszerek megléte, másrészt az ozmotikus és magas sókoncentráció által okozott stressz-szel szembeni tolerancia képessége. A sóérzékeny növények kismértékben, a sótűrők fokozottan tesznek eleget e követelményeknek.

IRODALOM

1. Erdei, L., Kuiper, P. J. C.: Physiol. Plant. **47,** 95—99 (1979).
2. Erdei, L., Kuiper, P. J. C.: Physiol. Plant. 49, 71—77 (1980).
3. Erdei, L., Stuiver, B. C. E. E., Kuiper, P. J. C.: Physiol. Plant. 49, 315—319 (1980).
4. Ferguson, W. S.: Can. J. Plant Sci. **46,** 639—646 (1966).
5. Flowers, T. J.: J. Exp. Bot. 23, 310—321 (1972).
6. Flowers, T. J., Troke, P. F. and Yeo, A. R.: Annu. Rev. Plant Physiol. **28,** 89—121 (1977).
7. Glass, A. D. M.: Plant Physiol. **58,** 33—37 (1976).
8. Greenway, H. and Osmond, C. B.: Plant Physiol. **49,** 256—259 (1972).
9. Hall, J. L. and Flowers, T. J.: Planta **110,** 361—368 (1973).
10. Hansson, G. and Kylin, A.: Z. Pflanzenphysiol. **60,** 270—275 (1969).
11. Horowits, C. T. and Waisel, Y.: Experientia **26,** 941—942 (1970).
12. Kuiper, P. J. C.: Plant Physiol. **43,** 1367—1371 (1968).
13. Kuiper, P. J. C.: *In* Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids (T. Gaillard and E. Mercer, eds.) pp. 359—386, Academic Press, New York. (1975).
14. Kylin, A. and Gee, R.: Plant Physiol. **45,** 169—172 (1970).
15. Kylin, A., Kuiper, P. J. C. and Hansson, G.: Physiol. Plant. **26,** 271—278 (1972).
16. Levitt, J.: Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York (1972).
17. Moller, M. and Santarius, K.: Plant Physiol. **62,** 326—329 (1978).
18. Stuiver, C. E. E., Kuiper, P. J. C. and Marschner, H.: Physiol. Plant. **42,** 124—128 (1978).
19. Webb, K. L.: Plant and Soil **24,** 261—268 (1966).

KÖRNYEZETSZENNYEZÉS: NYOMELEM — TOXICITÁS*

CSEH EDIT és BUJTÁS KLÁRA

ELTE Növényélettani Tanszék és CHINOIN Mezőgazdasági Kutatási Főosztály, Budapest

Az ipari tevékenység, a közlekedés, az intenzív műtrágyázás és a vegyszeres növényvédelem nemkívánatos mennyiségben és arányban juttat nehézfémeket a talajra és a növényzetre egyaránt. Bizonyos nehézfémek meghatározott koncentrációjának esszencialitása (Fe, Mn, Zn, Mo, Cu), mások egyértelmű toxikussága (Cd, Pb) számos élettani, genetikai, ökológiai problémát vet fel. Bizonyos növények növekedni és fejlődni képesek emberre és állatokra veszélyt jelentő toxikus koncentrációjú nehézfémsók jelenlétében is. A különféle nehézfémek mobilitása a talajban és a növényben eltérő. Növénytől függően — sejt és szerv szinten — eltérő a nehézfémek felhalmozódása is.

Az esszencialitás és a toxikusság kérdését sokoldalúan kell megközelíteni: az esszenciális elem is lehet toxikus, ha a hatékony koncentrációja a növényben felülmúlja a szükséges mennyiséget. Jelentős terméscsökkenést okozhat a növényfajtól és fejlődési fázistól függő, genetikai szinten szabályozott elemarány szükséglet eltolódása is. Eltérő a táplálékláncban szereplő élőlények érzékenysége és elemarány igénye. Számos — emberi nézőpontból erősen toxikus — elemről állítják, hogy nagyon kis koncentrációban esszenciális, serkenti a növekedést, ill. termésfokozó hatású, pl. Se, As.

Esszencialitás és toxikusság szempontjából az elemek egész sorát megvizsgálták (Fe, B, Mn, Zn, Mo, Cu, Cd, Cr, Pb, Al, Co, Hg, Ni, V, Ag).

Közülük három elemről szólunk: az egyértelműen toxikus Cd-ról, amely vírusoktól az emberig valamennyi élőlényre károsító hatású, bár a toxikus külső koncentrációban rendkívül nagyok az eltérések; a Cu-ről, amely kis mennyiségben, de elengedhetetlenül szükséges az élők számára és a Fe-ról, amelynek felvételéről és transzlokációjáról tudjuk a legtöbbet. E három elem élettani hatásának ismertetése felveti mindazokat a problémákat, amelyek a nehézfémek kapcsán modern korunkban az intenzív mezőgazdasági művelés és az ipari tevékenység mellett felmerülnek.

Cd — a szokott szennyezőkön kívül — a foszfát műtrágyával is kikerülhet a talajba, ahol pH 5-ig eléggé mobilis (ANDERSSON 1976, 1977), lúgos talajokban immobilissá válik. A felvehető Cd mennyiségét befolyásolja a talaj

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

kationcserélő kapacitása (C. E. C.), amely az agyagásványok mennyiségétől és minőségétől, valamint a talaj szervesanyag tartalmától függ. Minél nagyobb a C.E.C., annál kisebb a felvehető Cd mennyisége. A Cd-felvételt más kétértékű kationok, így Ca, Mn, Zn, csökkentik, feltehetően versengenek a gyökérfelületen a kicserélődési helyekért (JARVIS et al. 1976). A Cd mind a gyökéren, mind a levélen keresztül felvevődik és transzlokálódik a növényben, tehát valamennyi növényi részben (levélben, termésben) megtalálható, sőt fel is halmozódhat (BABICH és STOTZKY 1978).

Gazdasági növényeink Cd^{2+} érzékenysége nagyon különböző. A növekedés közelítőleg fordítottan arányos a felvétellel. A vizsgált növények közül viszonylag érzéketlen a zab, szenzitív viszont a paradicsom (PETTERSSON 1976). Áramló kultúrában nevelt növények gyökerében a következő Cd tartalmat mérték: gabonafélék 59—89 μg, fűfélék 117—165 μg, takarmányrépa és vízitorma 200 μg/g szárazsúly. A gyökér/hajtás Cd aránya is egészen szélsőségesen eltérő lehet, bár a vizsgált növények többségében a felvett mennyiség 60—70%-a a gyökérben marad, kivétel a kelkáposzta (48%), saláta (43%) és a vízitorma (34%). A Cd transzport nagymértékben függ a tápoldat foszfát tartalmától (JARVIS et al. 1976).

Általános az a vélemény, hogy a Cd^{2+} felvétel nem anyagcserefüggő folyamat, mivel a holt gyökér több Cd-ot vesz fel, mint az élő (FRIED és BROESHART 1967, JARVIS et al. 1976, CSEH et al. 1979, JARVIS és JONES 1978.).

A növényi alapanyagcsere folyamatok közül vizsgálták a fotoszintézisre, a légzésre, a transpirációra gyakorolt hatását. Cd jelenlétében a nettó fotoszintézis és a transpiráció azonos mértékben csökken (LAMOREAUX és CHANEY 1978). Cd meggátolta a sztómák mozgását (BAZZAZ et al. 1974, CARLSON et al. 1975, CARLSON és BAZZAZ 1977). Gátolja a karboanhidráz működését, nő a mezofillum sejtek és a sztómák ellenállása a CO_2, valamint a sztómák ellenállása a vízmozgással szemben (LAMOREAUX és CHANEY 1978), a sötét légzés jelentősen fokozódik (LEE et al. 1976, LAMOREAUX és CHANEY 1978). A Cd gátolja a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működését (HAMPP et al. 1976, BAZZAZ és GOVINDJEE 1974, VAN DUIJVENDIJK-MATTEOLI és DESMET 1975), mégpedig a II. fotoszisztémánál a vízbontás és a 2-es reakciócentrum között, mivel a DPC (1,5-difenil-karbohidrazid) mesterséges elektrondonor jelenlétében a DCPIP (2,6-diklórfenol-indofenol) redukciója Cd jelenlétében alig csökken (BASZYNSKI et al. 1980). Cd hatására csökken a kloroplasztiszok granumos szerkezete is. Mind a fotofoszforilációt, mind a kloroplasztisz struktúráját Mn felesleggel helyre lehet állítani. Feltételezhető, hogy a vízbontásban szereplő Mn-proteinbe lép be a Cd.

Más nehézfémekhez hasonlóan (Ag = Hg>Pb>Cu>Cd) a Cd is gátolja a K^+ felvételét (árpa: OBERLÄNDER és ROTH 1978, zab: KECK 1978, búza, kukorica: CSEH et al. 1979) gyökereknél. Mivel a sztómamozgásban is elsődleges szerepe van a K^+-felvételnek, a Cd sztómamozgást gátló hatása visszavezet-

hető a K^+-felvétel gátlására. Más kísérleti eredményekkel összevetve — La^{3+} hatás (LEONARD et al. 1975), vanádium hatás (COCUCCI et al. 1980) — el lehet fogadni azt a feltételezést (KECK 1978, CSEH et al. 1979), hogy a Cd primér hatását a plazmalemma $K^+ \rightleftarrows H^+$ transzportáló ATPáz gátlásán keresztül fejti ki.

A Cu, bár egyértelműen esszenciális elem, csak nagyon szűk koncentrációsávban optimális, pl. *Lemna minor* $6 \cdot 10^{-8}$ M $CuSO_4$ mellett szépen fejlődik, $3 \cdot 10^{-7}$ M-t még eltűri, látható károsodás nincs, de $6 \cdot 10^{-7}$ M-ban a Cu-gátlás már 50%-os. A búzagyökér növekedését 10^{-6} M-ban még serkenti, $3 \cdot 10^{-6}$ M-ban közel 60%-ban gátolja (CSEH és BUJTÁS 1980). Káposzta $5 \cdot 10^{-5}$ M réz jelenlétében gyakorlatilag nem nő (HARA és SONODA 1979). Az uborka növekedését nagymértékben, az Ag-tel azonosan gátolja (PETTERSSON 1976).

A Cu felvétel mechanizmusa kérdésében a kapott eredményeket teljesen ellentmondóan értelmezik, sőt az elvégzett kísérletek is hiányos ismeretekre utalnak.

Az utóbbi években a Cu aktív felvételéről jelennek meg dolgozatok, a Nissen iskola értékelése szerint. HARRISON et al. (1978) árpa gyökerek réz felvételét multifázisosnak tekintik — 0,6 mM-787 mM külső koncentráció mellett, 30'-es $CaCl_2$-os mosás után. További vizsgálataikban (HARRISON et al. 1979) a Cu lecserélődést Ca, Cd, Co, Mg, Ni és $Pb/NO_3/_2$-tal vizsgálták ugyancsak ebben a magas koncentrációban.

MARQUENIE-VAN DER WERFF és ERNST (1979) Elodea vízi növény Cu^{2+} felvételét és a sejtrészekben való megoszlását vizsgálták pH 8,0-on 50 μM külső koncentráció mellett. Ugyanakkor megállapítják, hogy a sejtek életképessége ezen az értéken már mérhetően csökken (20 és 70%). Képtelen dolog a felhasznált magas koncentrációk és $Pb/NO_3/_2$-tal történő mosás után a Cu^{2+} felvételi mechanizmusára következtetni.

BRAMS és FISKELL (1971), GOREN és WANNER (1971), SMITH (1953) a rézfelvételt passzív folyamatnak tekintik. COOMBES et al. (1977, 1978) különös gondot fordítanak a Cu-formák felvételének vizsgálatára: a töltéskülönbségre (pozitív, neutrális, negatív) és a kötésstabilitás eltéréseire. A $[Cu^{II} \cdot EDTA]^{2-}$ alig vevődik fel, a $[Cu^{II}(OH_2)_6]^{2+}$ és a biszetiléndiamino $\cdot CuSO_4$— $[Cu^{II}(en_2)]^{2+}$-felvétele nem lineáris az idővel, ami feltehetően a 2^+ töltéssel rendelkező formák változó struktúrájával magyarázható. A különböző komplexekből felvett Cu eltérő mértékben mosható le a gyökérről $CaCl_2$ (0,05 mM) oldattal. Az anorganikus Cu $[Cu^{II}(OH_2)_6]^{2+}$ 50%-a 60 perc alatt lemosható, a $[Cu^{II}(en_2)]^{2+}$ alig, a neutrális bisglicináto $\cdot$ Cu nem cserélhető le. COOMBES et al. (1978) feltételezik, hogy a szervetlen Cu a szabad helyeken kötődik meg, míg a komplexek esetleg bejutottak a szimplasztba is.

Több mint 20 éves következetes munka eredménye a Fe felvételéről és transzlokációjáról kialakított mozaikkép. A vas mezo-elem, hiányában csökken a termés. A hiánytünet a fiatal leveleken jelentkezik: először az erek között

sárgul a levél, majd az ereket körülvevő sejtek klorofil tartalma is csökken, a levél egészen kivilágosodik, majd kiszárad, megbarnul és az egész friss hajtásrész elpusztul.

A Fe-hasznosítás eltérései alapján izolálta WEISS (1943) a magasabb rendű növények közül az első transzport single-gén mutánst. A vas felvételének annak oldatban tartása a feltétele, amit az alacsony pH és a komplexképzők tesznek lehetővé. A Fe-hiánynak nemcsak a felvétel, hanem a transzlokációs képesség hiánya is lehet az oka, ill. a vas átalakulása nem hasznosítható formába magában a növényben. A vastartalom és a vasellátottság éppen ezért nem mindig van korrelációban egymással: a klorózisra hajlamos növények gyökere több vasat tartalmaz (BROWN és CHANEY 1971), mint a Fe-t jól hasznosító növényeké. A növény csak kétértékű vasat képes felvenni. Bebizonyították, hogy a vas redukciója a külső oldatban történik meg (BROWN és CHANEY 1971, CHANEY et al. 1972). A vas-efficiens és a vas-inefficiens növények az ún. reduktív kapacitásukban különböznek. Keverék kultúrákban a napraforgó megszünteti a kukorica klorózisát (VENKAT RAJU et al. 1972, KASHIRAD és MARSCHER 1974). Ennek egyik oka, hogy az efficiens növények Fe-hiányra gyorsuló proton leadással reagálnak. Inefficiens növényeknél a Fe-hiány nem indukál H^+ exkréciót. A Fe-felvételt a talajoldat összetétele is befolyásolja, gátolja a magas Ca, bikarbonát és a PO_4 tartalom, de befolyásolja a nitrogén táplálás módja is. A nitrát táplálás OH^- leadással jár. A növények abban is eltérnek egymástól, hogy Fe-hiányra NO_3^- jelenlétében H^+ extrúzióval reagálnak, vagy OH^- ionokat adnak le a rhizoszférába és csak a nitrát eltűnése után adnak le H^+-t (VAN EGMOND és AKTAS 1977; AKTAS és VAN EGMOND 1979). Régóta feltételezték, hogy a reduktív kapacitás nemcsak a proton kiválasztását, hanem redukáló anyag leadását is jelenti. Japán kutatóknak sikerült izolálniok zab és rizs gyökérből (TAKAGI 1976) és azonosítaniok (TAKEMOTO et al. 1978) az árpagyökérből leadódó természetes kelátort, ami szerkezeti képlete alapján egy új aminosavnak bizonyult: mugineinsav.

E vegyülethez hasonló szerkezetű aminosavakat, amelyek lehetnek a Fe-kelátor előanyagai is, több növény leveléből is kimutattak.

A vas felvételével még nem oldódik meg a Fe-ellátás kérdése, mivel transzlokációjához ismét kelálódnia kell. A vas a legkülönbözőbb növényekben (szója, dohány, napraforgó, tök, paradicsom) vas-citrát formájában transzlokálódik (BROWN 1966, SCHMID és GERLOFF 1961, TIFFIN 1966 a, b). A könnyezési nedv Fe-tartalmával együtt nő a citrát tartalma is, de a Fe/citrát arány nem állandó. A citrát általában feleslegben van a xilém nedvben. Mind a Fe-hiány, mind pedig a foszfáthiány növeli a gyökér citrát tartalmát. A foszfát mennyiség növekedése a tápoldatban gátolja a szerves savak képződését a gyökérben (BROWN 1966, 1968, TIFFIN 1966 a, 1970).

A vasfelvétel és transzlokáció eredményei ráirányították a figyelmet más kétértékű kationok szállítási módjaira is. Az elemek egy része ionos formában

transzlokálódik, de a kétértékűek nagy részéről bebizonyosodott, hogy csak kötött formában tudnak transzlokálódni. Rendkívül érdekes, hogy az ún. hiperakkumulátor növények kitűnnek magas szerves sav tartalmukkal, különösen a citromsav az, ami pl. a Ni akkumulációval szignifikáns korrelációt mutat (LEE et al. 1978). Zn rezisztens növények magas almasav tartalmúak (MATHYS 1977). Szerves savakon kívül kelátorok lehetnek aminosavak és peptidek is. Mn ionok kismolekulasúlyú, aminosav tartalmú anyagokhoz kötődve transzlokálódnak kukorica xilémben (EBEID és KUTÁČEK 1979).

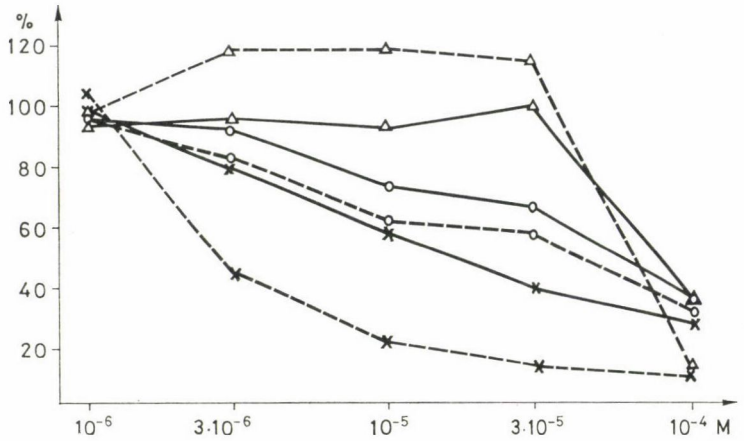
A környezetszennyezés és a nyomelemszükséglet antagonizmusa, amint a fenti eredményekből is látszik, ráirányította a figyelmet a természetes és a mesterséges komplexképzők tanulmányozására. Komplexképzőkkel szeretnénk bejuttatni a növénybe a szükséges anyagokat és komplexképzőkkel szeretnénk távoltartani más anyagokat. A komplexek stabilitása ion- és pH-függő. A talaj és a növény pH-ja nem azonos, mivel a növényi sejtek regulálják a pH-jukat, amely általában a savas tartományba esik. Kérdés, hogy a stabil komplex bejut-e a növénybe és transzlokálódhat-e a hajtásba? Az elem kötve marad-e a kémiai komplexhez, vagy a növény újra komplexálja a kérdéses elemet? Az irodalmi adatok ellentmondóak, feltehetően ez is növény-, komplexképző-, pH- és koncentráció-függő folyamat. A komplexképzők a hatásukat mint „oldószer", mint transzporter fejtik-e ki, vagy a felvételben a növényi transzportrendszer a szabályozó tényező? A legutolsó kérdés megválaszolására tudnunk kellene, hogy lehet-e a kétértékű kationok carrierjéről beszélni a szó szokott értelmében vagy sem?

Saját kísérleteink eredményei

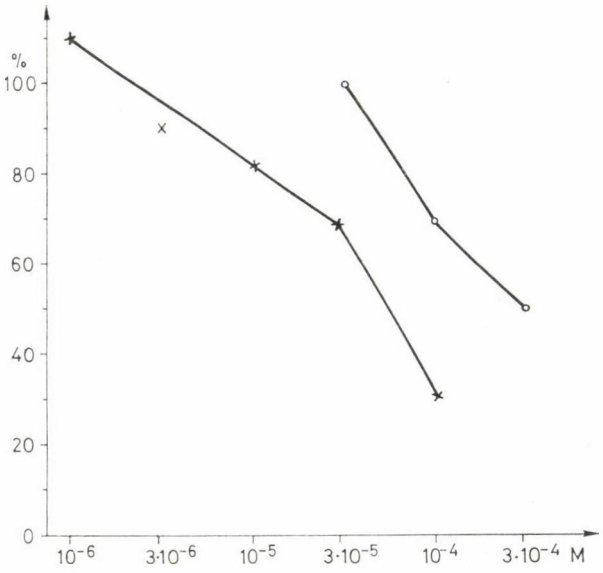
A nehézfémsók — a Cd^{2+} és a Cu^{2+} — hatásának vizsgálatához részben előző, Lemna-tenyésztési kísérleteink eredményei, részben elméleti megfontolások vezettek. Megállapítottuk, hogy a Cu^{2+} és a Cd^{2+} a vízkultúrában nevelt gabonafélék növekedését gátolja. Eltérő azonban mind a Cu^{2+}, illetve Cd^{2+} hatásának jellege, mind az egyes gabonafélék érzékenysége. A Cu^{2+} jobban gátolja a gyökér növekedését, a Cd^{2+} a gyökérre és hajtásra egyforma mértékben hat (1. ábra). Ez a különbség kifejezésre jut transzlokációjukban is. A hajtásba transzlokált Cu^{2+}, illetve Cd^{2+} abszolút mennyisége igen különböző. Ráadásul a két gabonafajban iononként változó mértékben eltérő a transzlokáció. Így a zab kevésbé károsodik és több Cd^{2+}-ot, de kevesebb Cu^{2+}-et halmoz fel hajtásában, mint a búza.

A tápoldathoz a nehézfémionokkal egyidejűleg adott CH-I. kísérleti komplexképző kivédte a búza növekedésének gátlását (1. ábra), és mindkét vizsgált gabonafajnál — különösen a magas koncentrációkon — jelentős mértékben csökkentette a Cu^{2+} transzlokációját a hajtásba.

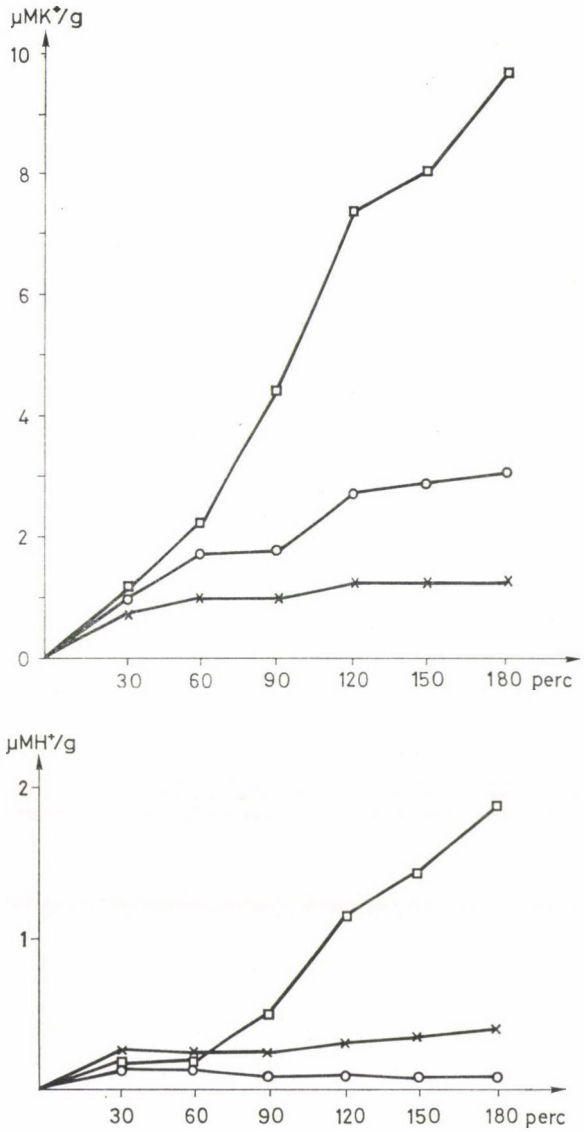
Amint a bevezetőben leírtuk, az irodalmi adatok alapján elfogadtuk azt a nézetet, hogy a Cd^{2+} priméren a plazmalemma felületén hat, gátolva a K^+-felvételt. Logikusan következett ebből az a feltételezés, hogy a Cu^{2+}, amely sokkal erősebben kapcsolódik a szerves anyagokhoz, komplex-stabilitása nagy, gátló hatását ugyancsak a plazmalemmán fejti ki.



1. ábra. Búza (GK Szeged) csíranövények növekedése Cu^{2+}- és Cd^{2+}-ionok, valamint Cu^{2+} + + CH-I (10^{-4} M) jelenlétében. A kapott eredményeket a kontroll friss súly %-ban fejeztük ki. A növények 10 napig 1/4-es Hoagland oldatban nőttek. – – – – gyökér, ——— hajtás. ×– – –×, ×——× = Cu^{2+}; △– – –△, △——△ = Cu^{2+} + CH-I; ○– – –○, ○——○ = Cd^{2+}



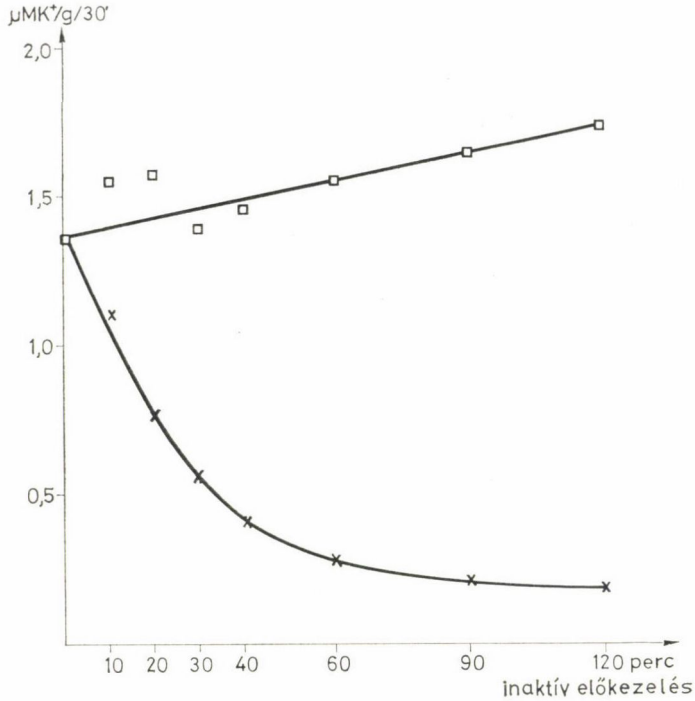
2. ábra. K^+-felvétel Cu^{2+} (×——×) és Cd^{2+} (○——○) gátlásának koncentráció függése. Az excizált búza (GK Szeged) gyökerek K^+ felvételét a kontroll %-ban fejeztük ki. A külső oldat KCl koncentrációja 10^{-4} M volt, az oldat 5 · 10−4 M $CaSO_4$-ot tartalmazott



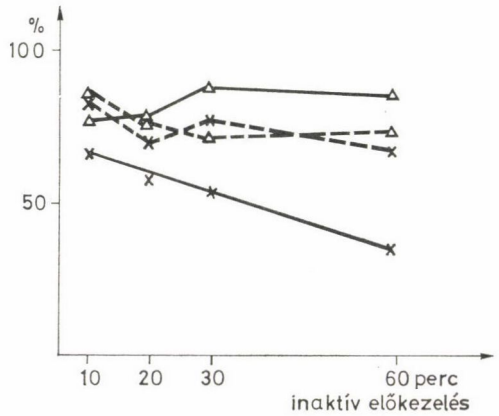
3. ábra. Excizált búza (GK Szeged) gyökerek K^+ felvételének (3. a) és H^+ leadásának (3. b) időfüggése g friss súlyra számolva. A külső oldat 10^{-4} M KCl-ot és $5 \cdot 10^{-4}$ M $CaSO_4$-ot tartalmazott □——□ kontroll, ○——○ Cd^{2+} $(3 \cdot 10^{-4}$ M) és ×——× Cu^{2+} $(10^{-4}$ M) ionok jelenlétében

A Cu^{2+} már 3×10^{-6} M-ban gátolja excizált búzagyökérben a K^+ ($^{86}Rb^+$) influxot. 3×10^{-5} M-ban az 50%-os gátlás rövid idő alatt elérhető, 10^{-4} M-ban totálisan gátol. Cd^{2+}-ra a K^+-felvételi rendszer sokkal érzéketlenebb (2. ábra).

A Cd^{2+} és a Cu^{2+} az aktív K^+-influxot gátolják. Elölt gyökereknél és 0 C°-on nincs gátlás, az elektrolit effluxot alig befolyásolják.

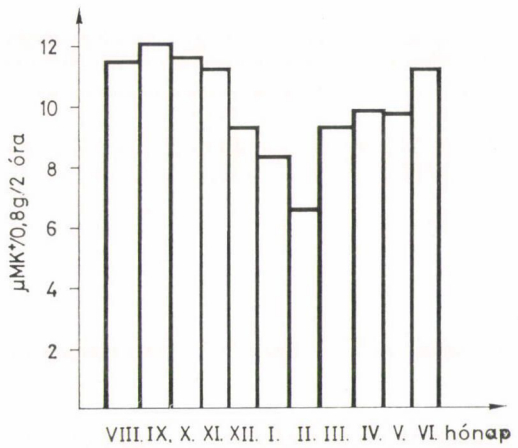


4. ábra. Különböző időtartalmú $CuSO_4$ előkezelés hatása a búza (GK Szeged) excizált gyökereinek K^+ felvételére g friss súlyra számolva. □——□ kontroll, ×——× 10^{-4} M $CuSO_4$-tal kezelt

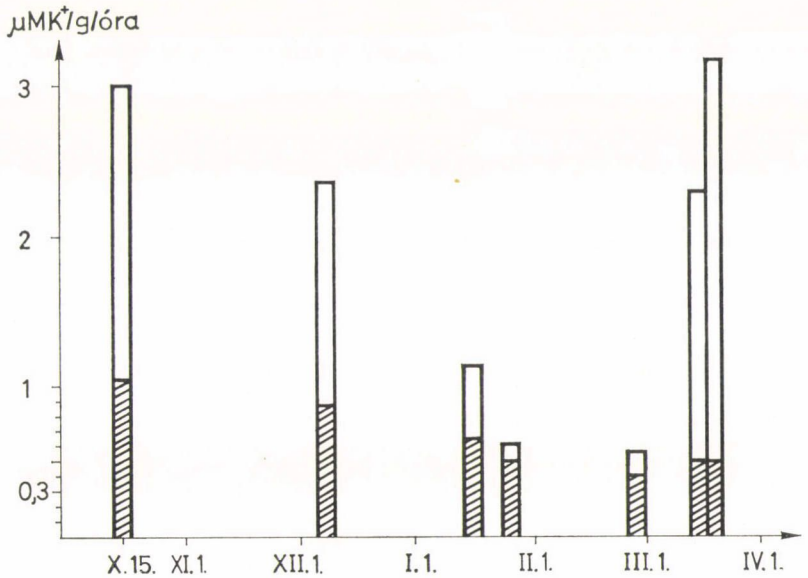


5. ábra. Komplexképzők hatása búza (GK Szeged) excizált gyökereinek K^+ felvételére. A Cu^{2+} gátlás feloldása komplexképzőkkel. A felvételi periódus 30'. Az eredményeket a kontroll %-ában fejeztük ki. ×——× $3 \cdot 10^{-5}$ M $CuSO_4$; △——△ 10^{-4} M CH-I; △– – –△ $3 \cdot 10^{-5}$ M $CuSO_4 + 10^{-4}$ M CH-I; ×– – –× $3 \cdot 10^{-5}$ M $CuSO_4 + 10^{-4}$ M Na_2EDTA

Megerősítik a plazmalemmán működő $K^+ \rightleftarrows H^+$ pumpáról az utóbbi időben kialakult nézetet a Cd^{2+} és a Cu^{2+}-hatás időgörbéi. A K^+-felvétel és a H^+-leadás kontroll görbéi teljesen azonos jellegűek, bár a sztöchiometriai arány nem volt 1:1. Ezekben a kísérletekben a Cd^{2+} és Cu^{2+} a felvételi oldatban volt jelen. Kb. 60 perc alatt mind a K^+-felvételt, mind a H^+-leadást meggátolták. A Cd^{2+} nem gátolja teljesen a K^+-felvételt. Feltűnő, hogy a H^+-leadást mégis a Cd^{2+} gátolja jobban (3. ábra). Sajnos azt a kézenfekvő feltételezést,



6. ábra. F 481 őszi búza excizált gyökereinek K^+ felvétele az év különböző hónapjaiban



7. *ábra.* GK Szeged őszi búza K^+ felvétele (egész oszlop) és a K^+ felvétel Cu^{2+} gátlása ($3 \cdot 10^{-5}$M) csíkozott oszlop) az év különböző hónapjaiban

hogy ez alatt az idő alatt a szimplasztba is bejut, nem támasztják alá a ^{115}Cd-mal végzett vizsgálataink, mivel 2 órás kísérleteinkben az élő gyökér némileg kevesebb Cd^{2+}-ot kötött meg, mint az elölt gyökér.

A Cu^{2+}-hatás további tanulmányozása során olyan időgörbéket vettünk fel, ahol az excizált gyökereket különböző ideig 10^{-4} M $CuSO_4$ jelenlétében rázattuk, majd a gyökerek öblítése után $^{86}Rb^+$-mal jelölve mértük a K^+-felvételt. A KCl koncentrációja az inaktív és az aktív oldatban, az öblítő és a mosó folyadékokban is 10^{-4} M volt, 5×10^{-4} M $CaSO_4$ mellett. A kontroll kezelésnél a 30 perces felvételben gyenge izolálási hatás mutatható ki (4. ábra). A Cu^{2+} előkezelés is jelentősen gátol. 60 perces előkezelés után a gátlás totálisnak tekinthető, mivel a felvétel a 0 C°-on mért érték szintjére csökken.

Komplexképzőkkel a Cu^{2+} gátlást meg lehet akadályozni. Ha egy kereskedelmi forgalomban még nem levő komplexképzőt (CH-I.), illetve Na_2EDTA-t adtunk a $CuSO_4$-tal együtt az inaktív előkezelő oldathoz, akkor a Cu^{2+} gátló hatása minimálisra csökkenthető, vagy megszűnik. A fennmaradó gátlás a komplexképzők számlájára írható (5. ábra).

Utoljára hagytuk a legérdekesebb kísérleti eredményt. Az 1978-ban tartott VIII. Membrán Transzport Konferencián poszterünkön bemutattuk, hogy az F481 őszi búza K^+-felvétele februárban minimumon megy át (6. ábra). A kísérleteinkben azóta használt GK Szeged fajta K^+-felvételében szintén megfigyelhető februári minimum érték, bár a felvétel abszolút értéke alacsonyabb (0,5—3 μM g^{-1} óra^{-1}), mint az F481 fajtáé (4—7,5 μM g^{-1} óra^{-1}). A görbe menete is hasonló: fokozatosan csökken a minimumig, majd hirtelen (7—10 nap alatt) ugrik fel a márciusi értékre. A Cu^{2+}-zel gátolt felvétel abszolút értéke viszont alig változik. Ebből következik, hogy a felvételi minimumok idején a Cu^{2+}-gátlás szinte megszűnik, a márciusi maximális felvételnél pedig a közvetített K^+-influx totálisan gátlódik (7. ábra).

Összefoglalás

Az utóbbi évtizedek intenzív iparosodása és a mezőgazdaság erőteljes kemizálása, a terméshozamok növelésének fontossága ismételten a nehézfémsók hatásának tanulmányozására fordította a figyelmet. A 10^{-6} M alatti külső koncentrációkban hasznos nehézfémsók felvételi mechanizmusa tisztázatlan, részben a rendkívül alacsony koncentrációkon való mérés metodikai nehézségei miatt, részben komplexképző tulajdonságaik bonyolult pH-függése, kölcsönhatásaik és az anyagcserére gyakorolt másodlagos hatásaik miatt. Ez utóbbi különösen a relatíve nagyobb koncentrációknál jelentkezik. Különös figyelmet érdemel az, hogy a *hatékony* és a növényben *jelenlevő* nehézfém mennyisége nem mindig van korrelációban egymással.

Kísérleteink során a gátló koncentrációban jelenlevő Cu^{2+} és Cd^{2+} hatását tanulmányoztuk.

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a nehézfémek primér hatásukat nem az anyagcsere folyamatokra (légzés, fotoszintézis), hanem a határfelületeken fejtik ki. Gátolják az aktív K^+ influxot és a H^+ leadást. Feltételezésünk szerint a $K^+ \rightleftharpoons H^+$ ATPáz-ra hatnak.

IRODALOM

ANDERSSON, A.: On the influence of manure and fertilizers on the distribution and amounts of plant-available Cd in soils. Swedish J. agric. Res. **6,** 27—36 (1976).

ANDERSSON, A.: The distribution of heavy metals in soils and soil material as influenced by the ionic radius. Swedish J. agric. Res. **7,** 79—83 (1977).

AKTAS, M. és VAN EGMOND, F.: Effect of nitrate nutrition on iron utilization by an Fe-efficient and an Fe-inefficient soybean cultivar. Plant and Soil **51,** 257—274 (1979).

BABICH, H. és STOTZKY, G.: Effects of cadmium on the biota. Adv. Applied Microbiol. **23,** 55—117 (1978).

BASZYŃSKI, T.—WAJDA, L.—KRÓL, M.—WOLIŃSKA, D.—KRUPA, Z. és TUKENDORF, A.: Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. Physiol. Plant. **48,** 365—370 (1980).

BAZZAZ, M. B. és GOVINDJEE: Effect of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. Environ. Letters **6,** 1—12 (1974).

BAZZAZ, F. A.—ROLFE, G. L. és CARLSON, R. W.: Effect of cadmium on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. Physiol. Plant. **32,** 373—376 (1974).

BRAMS, E. A. és FISKELL, G. A.: Copper accumulation in citrus roots and desorption with acid. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. **35,** 772—775 (1971).

BROWN, J. C.: Fe and Ca uptake as related to root-sap and stem exudate citrate in soybeans. Physiol. Plant. **19,** 968—976 (1966).

BROWN, J. C.: Iron chlorosis in soybeans as related to the genotype of rootstock: 5. Differential distribution of photosynthetic C14 as affected by phosphate and iron. Soil. Sci. **105,** 159—165 (1968).

BROWN, J. C. és CHANEY, R. L.: Effect of iron on the transport of citrate into the xylem of soybeans and tomatoes. Plant Physiol. **47,** 836—840 (1971).

CARLSON, R. W. és BAZZAZ, F. A.: Growth reduction in American sycamore (Platanus occidentalis L.) caused by Pb-Cd interaction. Environ. Pollut. **12,** 243—253 (1977).

CARLSON, R. W.—BAZZAZ, F. A. és ROLFE, G. L.: The effect of heavy metals on plants: Part II. Net photosynthesis and transpiration of whole corn and sunflower plants treated with Pb, Cd, Ni, and Tl. Environ. Res. **10,** 113—120 (1975).

CHANEY, R. L.—BROWN, J. C. és TIFFIN, L. O.: Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. Plant Physiol. **50,** 208—213 (1972).

COCUCCI, M.—BALLARIN-DENTI, A. és MARRÉ, M. T.: Effects of orthovanadate on H^+ secretion, K^+ uptake, electric potential difference and membrane ATPase activities of higher plant tissues. Plant Sci. Letters **17,** 391—400 (1980).

COOMBES, A. J.—LEPP, N. W. és PHIPPS, D. A.: Desorption of copper from excised roots of barley (Hordeum vulgare L. c. v. Zephyr), as related to chemical form of the applied copper. Z. Pflanzenphysiol. **87,** 279—283 (1978).

COOMBES, A. J.—PHIPPS, D. A. és LEPP, N. W.: Uptake pattern of free and complexed copper ions in excised roots of barley (Hordeum vulgare L. c. v. Zephyr). Z. Pflanzenphysiol. **82,** 435—439 (1977).

CSEH, E. és BUJTÁS, C.: Effect of heavy metals on growth and K^+ absorption of wheat. Proc. 20th Hung. Ann. Meet. Biochem. Siófok (1980).

CSEH, E.—BUJTÁS, C. és SZABADOS, M.: Preliminary notes about the effects of heavy metals on plant nutrition. Proc. First Inter. Symp. on Plant Nutrition, Varna Bulgaria, Vol. II. pp. 315—319 (1979).

EBEID, M. M. és KUTÁČEK, M.: Effect of EDTA on transport forms of manganese in maize xylem exudate. Biol. Plant. **21,** 178—182 (1979).

FRIED, M. és BROESHART, H.: The Soil-Plant System in Relation to Inorganic Nutrition. Academic Press, London (1967).

GOREN, A. és WANNER, H.: Die Absorption von Blei unter Kupfer durch Wurzeln von Hordeum vulgare. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **80,** 334—340 (1971).

HAMPP, R.—BEULICH, K. és ZIEGLER, H.: Effects of zinc and cadmium on photosynthetic CO_2-fixation and Hill activity of isolated spinach chloroplasts. Z. Pflanzenphysiol. **77,** 336—344 (1976).

HARA, T. és SONODA, Y.: Comparison of the toxicity of heavy metals to cabbage growth. Plant and Soil **51,** 127—133 (1979).

HARRISON, S. J.—LEPP, N. W. és PHIPPS, D. A.: Uptake of copper by excised roots. I. A modified experimental technique for measuring ion uptake by excised roots, and its application in determining uptake characteristics of "free" copper ions in excised Hordeum roots. Z. Pflanzenphysiol. **90,** 443—450 (1978).

HARRISON, S. J.—LEPP, N. W. és PHIPPS, D. A.: Uptake of copper by excised roots. II. Copper desorption from the free space. Z. Pflanzenphysiol. **94,** 27—34 (1979).

JARVIS, S. C.—JONES, L. H. P. és HOPPER, M. J.: Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. Plant and Soil **44,** 179—191 (1976).

JARVIS, S. C. és JONES, L. H. P.: Uptake and transport of cadmium by perennial ryegrass from flowing solution culture with a constant concentration of cadmium. Plant and Soil **49,** 333—342 (1978).

KASHIRAD, A. és MARSCHNER, H.: Iron nutrition of sunflower and corn plants in mono and mixed culture. Plant and Soil **41,** 91—101 (1974).

KECK, R. W.: Cadmium alteration of root physiology and potassium ion fluxes. Plant Physiol. **62,** 94—96 (1978).

LAMOREAUX, R. J. és CHANEY, W. R.: The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark respiration of excised silver maple leaves. Physiol. Plant. **43,** 321—326 (1978).

LEE, K. C.—CUNNINGHAM, B. A.—PAULSON, G. M.,—LIANG, G. H. és MOORE, R. B.: Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. Physiol. Plant. **36,** 4—6 (1976).

LEE, J.—REEVES, R. D.—BROOKS, R. R. és JAFFRÉ, T.: The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. Phytochemistry **17,** 1033—1035 (1978).

LEONARD, R. T.—NAGAHASHI, G. és THOMSON, W. W.: Effect of lanthanum on ion absorption in corn roots. Plant Physiol. **55,** 542—546 (1975).

MARQUENIE—VAN DER WERFF, M. és ERNST, W. H. O.: Kinetics of copper and zinc uptake by leaves and roots of an aquatic plant, Elodea nuttallii. Z. Pflanzenphysiol. **92,** 1—10 (1979).

MATHYS, W.: The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants. Physiol. Plant. **40,** 130—136 (1977).

OBERLÄNDER, H. E. és ROTH, K.: Die Wirkung der Schwermetalle Chrom, Nickel, Kupfer, Zink, Cadmium, Quecksilber und Blei auf die Aufnahme und Verlagerung von Kalium und Phosphat bei jungen Gerstenpflanzen. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. **141,** 107—116 (1978).

PETTERSSON, O.: Heavy-metal ion uptake by plants from nutrient solution with metal ion, plant species and growth period variations. Plant and Soil **45,** 445—459 (1976).

SCHMID, W. E. és GERLOFF, C. C.: A naturally occurring chelate of iron in xylem exudate. Plant Physiol. **36,** 226—231 (1961).

SMITH, P. F.: Heavy metal accumulation by citrus roots. Bot. Gaz. **114,** 426—436 (1953).

TAKAGI, S.: Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. I. Activity measurement and preliminary characterization. Soil Sci. Plant Nutr. **22,** 423—433 (1976).

TAKEMOTO, T.—NOMOTO, K.—FUSHIYA, S.—OUCHI, R.—KUSANO, G.—HIKINO, H.—TAKAGI, S.—MATSUURA, Y. és KAKUDO, M.: Structure of mugineic acid, a new amino acid possessing an iron-chelating activity from roots washings of water-cultured Hordeum vulgare L. Proc. Japan. Acad. Ser. B. **54,** 469—473 (1978).

TIFFIN, L. O.: Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron-citrate analysis. Plant Physiol. **41,** 510—514 (1966a).

TIFFIN, L. O.: Iron translocation II. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. Plant Physiol. **41,** 514—518 (1966b).

TIFFIN, L. O.: Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudate of soybean. Plant Physiol. **45,** 280—283 (1970).

VAN DUI JVENDIJK—MATTEOLI, M. A. és DESMET, G. M.: On the inhibitory action of cadmium on the donor side of photosystem II in isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta **408,** 164—169 (1975).

VAN EGMOND, F. és AKTAS, M.: Iron-nutritional aspects of the ionic balance of plants. Plant and Soil **48,** 685—703 (1977).

VENKAT RAJU, K.—MARSCHNER, H. és RÖMHELD, V.: Effect of iron nutritional status on ion uptake, substrate pH and production and release of organic acids and riboflavin by sunflower plants. Z. Pflanzenernäh. Bodenkd. **132,** 183—189 (1972).

WEISS, M. G.: Inheritance and physiology of efficiency in iron utilization in soybean. Genetics **28,** 263—268 (1943).

NEURON ÉS GLIA SEJTEK FEJLŐDŐ TENYÉSZETEIBEN TAPASZTALT VÁLTOZÁSOK A MEMBRÁNBAN ELHELYEZKEDŐ ADENILCIKLÁZ ENZIMNÉL ÉS BÉTA-RECEPTORNÁL*

MADERSPACH KATALIN

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete

A sejtfelszíni receptorok kutatása terén az utóbbi években sok eredmény született. Több hormonhatású anyag, trofikus faktor, neurotranszmitter receptorát fedezték fel és jellemezték (6, 9, 13, 25). Néhány receptort sikerült tiszta formában is előállítani (8, 20, 26). E sejtfelszíni receptorok funkciója, hogy kapcsolatot teremtsenek a sejt és környezete között. A környezet reguláló-moduláló hatása ezek közvetítésével valósulhat meg.

A membránreceptorok közül az adenilciklázhoz kapcsolódó receptort széles körben tanulmányozták. Különböző kismolekulájú- és polipeptid-hormonok, növekedési faktorok és neutrotranszmitterek esetében igazolódott, hogy hatásukat az adenilcikláz rendszeren keresztül fejtik ki (2, 4, 7, 24, 28).

Az idegrendszer fejlődésének vizsgálatakor *in vivo* és *in vitro* rendszerekben egyaránt kimutatták, hogy a neuronális differenciálódás a cAMP-adenilcikláz rendszeren keresztül is szabályozódik (17, 18, 19, 29). A legújabb adatok emellett egyre inkább megerősítik a sejtkapcsolatok szabályozó szerepét (1, 10, 11, 12, 22). Különös jelentőséget kaphat ez a központi idegrendszerben, ahol két alapvető sejttípus, az idegsejtek és a gliasejtek igen szoros kölcsönhatásban működnek (27). Néhány szerző (5, 12) feltételezi, hogy a sejtkölcsönhatások megvalósulásának egyik lehetséges útja az adenilcikláz rendszer.

Mindezen gondolatokat összekapcsolva munkánkban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy az idegsejt-gliasejt kapcsolatokban szerepet játszhat-e az adenilciklázhoz kapcsolt membrán receptor, és ezen keresztül szabályozódhat-e a neuronális differenciálódás folyamata.

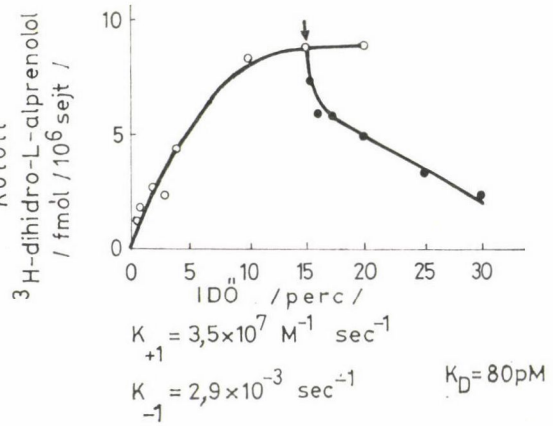
Korábbi munkánkban az adenilcikláz enzim béta-agonistákkal való aktiválhatóságának változását írtuk le az *in vitro* differenciálódás során idegglia szövettenyészetekben (15). Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy az adenilcikláz aktiválhatósága fejlődés eredményeként alakult ki. Az érzékeny állapotban már 10^{-11} M béta-agonista L-noradrenalin is hatásosnak bizonyult az adenilcikláz enzim aktiválásában. Ez arra a feltételezésre vezetett, hogy az adenilciklázhoz kapcsolt membrán receptor igen nagy affinitású kötőhely lehet a sejt felszínén.

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

A kötőhely jellemzése

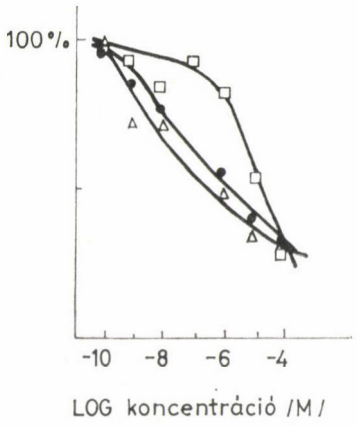
A kötőhely kinetikai és farmakológiai sajátságainak vizsgálatához intakt ideg-glia monolayer tenyészeteket használtunk, melyeket csirkeembrió előagy féltekékből indítottunk a már korábban ismertetett módon (16). Specifikus béta-receptor ligandként ^{3}H-L-dihidro-alprenololt* (^{3}H-DHA) alkalmaztunk (13). A nem specifikus kötés meghatározása nagy feleslegű jelzetlen L-alprenolol jelenlétében történt. A nem specifikus kötés kb. 20—30%-a volt az összkötésnek.

A specifikus kötést 10^{-11}—10^{-10} M ligand koncentráció tartományban vizsgálva telítődést találtunk $6-8\times10^{-11}$ M ^{3}H-DHA koncentrációnál. A kötés időfüggése szintén telítődést mutatott 10—15 perc inkubációs időknél. A kötés reverzibilitását mutatta, hogy a telítési időpontban adott nagy koncentrációjú, nem jelzett alprenolol gyors disszociációt okozott. Az asszociáció és disszociáció kinetikáját mutatja az 1. ábra. A kezdeti sebességekből számított disszociációs konstans K_D = 80 pM, amely alátámasztja, hogy a kötőhely valóban nagy affinitással rendelkezik. A kötés sztereospecifikus. A 2. ábrából látható, hogy D-propranololból kb. százszor nagyobb koncentráció szükséges ahhoz, hogy a kötött ^{3}H-DHA 50%-át helyettesítse a kötőhelyen, mint L-propranololból. A béta-antagonista L-propranolol jobban kötődik a receptorhoz, mint az L-alprenolol, a béta-agonista L-noradrenalin — amint azt a 3. ábra mutatja — azonban kevésbé vetélkedik a receptorhelyért. Ez megfelel a béta-receptoron az agyszövetnél tapasztalt élettani hatáserősségnek. Eredményeink alátámasztják, hogy kötőhelyünk valóban béta típusú receptorhely. Az alfa-receptor kölcsönhatás kizárására megmértük a kötést D,L-fenoxi-

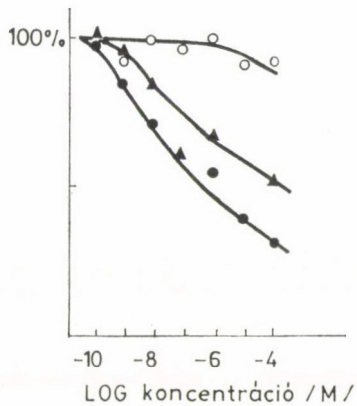


1. ábra. ^{3}H-DHA kötés időfüggése kevert idegsejt + gliasejt tenyészetekben, 8×10^{-11} M ligand koncentrációnál. A nyíllal jelzett pontban 8×10^{-6} M L-alprenololt adtunk

* Specifikus aktivitása = 69,7 Ci/mmol



2. ábra. A ^{3}H-DHA kötés sztereospecifitása. A kötőhelyért való vetélkedés mértékét az összkötés százalékában fejeztük ki. —●— = L-alprenolol, —△— = L-propranolol, —□— = D-propranolol



3. ábra. Vetélkedés a ^{3}H-DHA kötőhelyekért az összekötés százalékában kifejezve. —●— = L-alprenolol, —▲— = L-noradrenalin, —○— = D,L-fenoxibenzamin

benzamin növekvő koncentrációja mellett. A 3. ábrából látható, hogy az alfa-blokkoló vegyület az általunk alkalmazott koncentrációknál nem zavarja a béta-receptor kötődést.

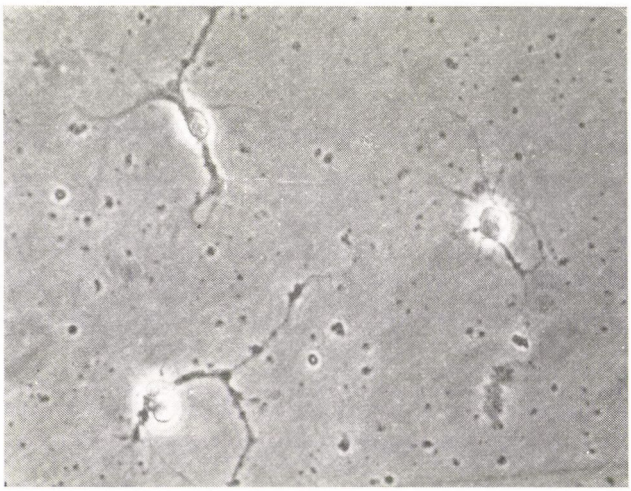
A kötőhely természetéről többet megtudhatunk, ha a kötődés ligand-koncentráció függését matematikai módszerekkel analizáljuk. Az általánosan alkalmazott Scatchard-féle ábrázolásban maximum jellegű görbéket nyertünk, amely arra enged következtetni, hogy a kötőhelyek nem függetlenek, hanem ún. pozitív kooperativitásban működnek. Ezt alátámasztják a Hill szerinti ábrázolás eredményei, ahol a nyert egyenes meredeksége eltér 1-től, $n_H > 4$. Feltételezzük, hogy vagy már meglevő, vagy a hormon hatására kialakuló receptormezők találhatók a sejtek felszínén, melyek együttműködve reagálnak.

Ha összehasonlítjuk eredményeinket agyszövetből vagy tumoros eredetű szövettenyészetekből tisztított membránfragmentumokon nyert eredményekkel (például: 3, 14) több lényeges különbséget láthatunk. Intakt sejteken a telítődési ligand koncentráció és a K_D értéke legalább két nagyságrenddel kisebb, ami a kötőhely lényegesen nagyobb affinitását mutatja. A pozitív kooperativitás nem jelentkezik a membrán frakciókon, a matematikai analízisek annak teljes hiányát mutatják. Feltételezzük, hogy intakt sejteken a kooperativitás fenntartása állandó reguláció eredménye, és így a tisztítási folyamat során elvész.

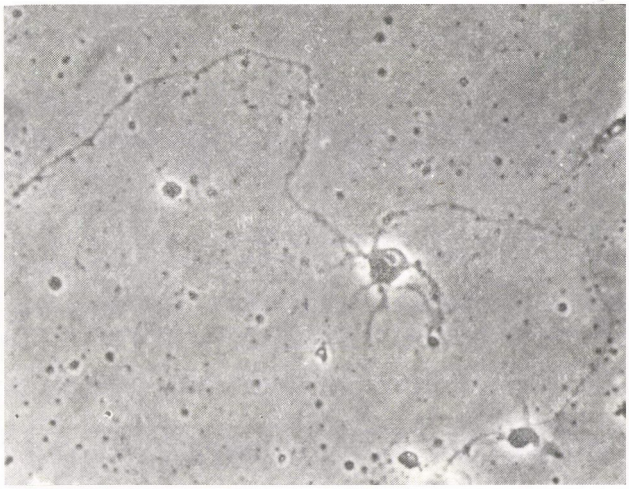
Béta-receptor koncentráció különböző összetételű tenyészetekben

Hogy a bevezetőben leírt feltételezésünket alátámasszuk, olyan tenyészetekben vizsgáltuk meg a ^{3}H-DHA kötődését, amelyekben glia-sejtek és idegsejtek az *in vitro* differenciálódás során egymástól elválasztva [tiszta neuron (21), ill. tiszta glia tenyészetek] vagy egymással szoros kölcsönhatásban voltak (kevert tenyészetek). Kísérletünk másik csoportjában a külső környezetet módosítottuk: idegsejteket tenyésztettünk béta-agonisták tartós jelenlétében vagy olyan tápoldatban, melyet glia-sejt tenyészetekről vettünk le (ún. glia kondicionált médium, GCM).

A morfológiai differenciálódást vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy 10^{-10}—10^{-11} M béta-agonista L-noradrenalin vagy L-izoproterenol 48 órás kezelés alatt jelentősen elősegítette az idegsejtek fejlődését. Ez megmutatkozott a fokozott nyúlványképződésben és arborizációban, később a sejttest megnöve-



4. ábra. Öt napos idegsejt tenyészet polilizin rétegen (21), 8 napos csirkeembrióból indítva. Kontroll, 400×



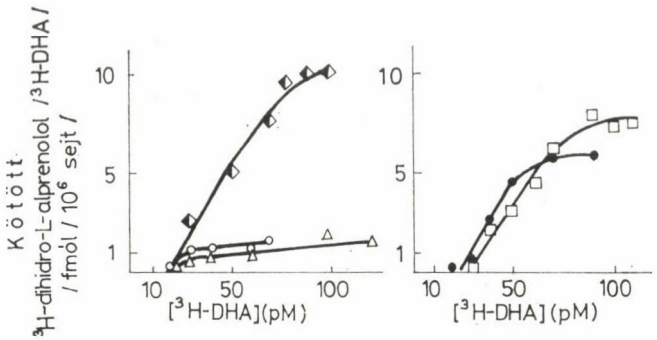
5. ábra. Öt napos idegsejt tenyészet, amely a 3. naptól (48 órán keresztül) 10^{-10} M L-noradrenalin jelenlétében fejlődött. A nyúlványok és a sejttest egyaránt fejlettebbek mint a kontrollban. 400×



6. ábra. Öt napos idegsejt tenyészet, amely a 3. naptól (48 órán keresztül) 10^{-10} M L-izoproterenol jelenlétében fejlődött. A nyúlványok és a sejttest egyaránt fejlettebbek mint a kontrollban. 400×

kedésében (4., 5. és 6. ábra). GCM 24 órás jelenléte szintén fokozta a nyúlványképződést.

A ^{3}H-DHA kötés koncentráció függését különböző tenyészetekben a 7. ábra mutatja. Idegsejt, illetve glia-sejt tenyészetekben igen alacsony a kötés. Lényegesen magasabb a kevert tenyészetekben, ahol az idegsejtek és a gliasejtek egymással szoros kontaktusban differenciálódtak. A receptorhelyek



7. ábra. ^{3}H-DHA kötés koncentráció függése különböző tenyészetekben. —△— = gliasejtek, —○— = idegsejtek (polilizinen), —◇— = idegsejtek (polilizinen) melyek β-agonisták (L-noradrenalin vagy L-izoproterenol) jelenlétében fejlődtek 48 órán keresztül, —●— = idegsejtek + gliasejtek kevert tenyészetben, —□— = idegsejtek + gliasejtek kevert tenyészetben (polilizinen)

nagyobb koncentrációja alátámasztja azt a feltevésünket, hogy az idegsejt-gliasejt kommunikáció az adenilciklázhoz kapcsolt béta-receptoron keresztül mediálódhat.

Béta-agonisták tartós jelenléte már igen kis koncentrációban is megnövelte az idegsejtek ^{3}H-DHA kötését, ez elérte, sőt meghaladta a kevert tenyészeteknél mért értéket. GCM-mal rövidebb kezelés is kifejezett emelkedést okozott a ^{3}H-DHA kötésben (még fel nem dolgozott adataink).

Az eredményeket az 1. táblázat foglalja össze, ahol a disszociációs állandók közelítő értékei, valamint a maximális kötő kapacitás (B_{max}) van feltüntetve, 10^6 sejtre vonatkoztatva. B_{max} számszerűen jellemzi a tenyészetben a béta-receptor koncentrációt. Ezek az adatok igazolják, hogy béta-agonisták az adenilcikláz rendszeren keresztül vagy egyéb módon is, befolyásolják az idegsejtek fejlődését tenyészetben. A béta-agonisták jelenlétében fejlődött, differenciálódottabb sejtekben a kevert ideg-glia tenyészetekéhez hasonló a béta-receptor koncentráció, ami ismét alátámasztja, hogy a glia-sejtek az

1. táblázat

A disszociációs konstans (K_D), *a maximális kötőkapacitás* (B_{max}), *valamint az egy sejtre jutó kötőhelyek számának (B) értéke különböző tenyészetekben*

Tenyészet	K_D (pM)	B_{max} (fmól/10^6 sejt)	B
Neuron (polilizin)	40	2,4	1440
Glia	53	2,1	1260
Neuron + glia	58	10,9	6540
Neuron + glia (polilizin)	58	12,9	7740
Neuron (polilizin) β-agonista előkezelt	59	16,5	9900

adenilcikláz rendszer közvetítésével kölcsönhatásba léphetnek az idegsejtekkel és ezen az úton befolyásolhatják, szabályozhatják differenciálódásukat.

A glia-sejtek és idegsejtek közötti információ átadásban más faktorok mellett béta-agonista természetű kémiai anyagok is részt vehetnek. Ezt a két utóbbi feltételezést a glia kondicionált médiummal kapott eredményeink erősen alátámasztják. Szintúgy azok a korábbi adatok, melyek szerint glia-sejtekben is mutattak ki transzmitter jellegű anyagokat, illetve azok anyagcseréjében szereplő enzimeket (27).

Következtetéseink

— Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy a béta-receptor—adenilcikláz rendszer egyik fontos közvetítője a külvilágból érkező hormonális hatásoknak, melyek az idegrendszer fejlődését befolyásolják.
— Az idegrendszer két fő sejttípusának, az idegsejteknek és glia-sejteknek együttműködése ezen az úton is megvalósulhat, és ennek szintén szabályozó szerepet tulajdoníthatunk az idegsejtek fejlődésében.
— Az ideg-glia kommunikáció mediátora — egyebek mellett — béta-receptor agonista természetű anyag (vagy anyagok) lehet(nek), melyek az intercelluláris térbe jutva fejtik ki hatásukat béta típusú, adenilciklázhoz kapcsolt membrán receptoron, esetleg más módon is.
— Eredményeink igazolják, hogy intakt monolayer tenyészetekben megközelíthetők és jól karakterizálhatók a membrán receptorok, és lehetséges azok funkciójának megismerése.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Tóth Gézának a triciált alprenolol előállításáért, Szabó Máriának, Németh Józsefnének és Nagy Sándornénak lelkiismeretes munkájukért.

IRODALOM

1. Adler, R.—Teitelman, G.—Suburo, A. M.: Develop. Biol. **50,** 48—57 (1976).
2. Bloom, F. E.: Federation Proc. **38,** 2203—2207 (1979).
3. Bylund, D. B.—Snyder, S. H.: Mol. Pharmacol. **12,** 568—580 (1976).
4. DeVellis, J.—Kukes, G.: Texas Rep. Biol. Med. **31,** 271—293 (1973).
5. Gilman, A. G.—Schrier, B. K.: Mol. Pharmacol. **8,** 410—416 (1972).
6. Greenberg, D. A.—Snyder, S. H.: Mol. Pharmacol. **14,** 38—49 (1978).
7. Greengard, P.: Federation Proc. **38,** 2208—2217 (1979).
8. Heidemann, Th.—Changeus, J. P.: Ann. Rev. Biochem. **47,** 317—357 (1978).
9. Heldin, C. H.—Westermark, B.—Wasteson, A.: Nature **282,** 419—420 (1979).
10. Heumann, R.—Öcalan, M.—Hamprecht, B.: Febs Letters **107,** 37—41 (1979).
11. Latzkovits, L.: „Dynamic properties of glia cells" Pergamon Press (1978).
12. Lawrence, Th. S.—Beers, W. H.—Gilula, N. B.: Nature **272,** 501—506 (1978).

13. LEFKOWITZ, R. J.—MUKHERJE, Ch.—COVERSTONE, M.—CARON, M. G.: Biochem. Biophys Res. Commun. **60,** 703—709 (1974).
14. LUCAS, M.—BOCKAERT, J.: Mol. Pharmacol. **13,** 314—329 (1977).
15. MADERSPACH, K.: Cell. Molec. Biol. **26,** 335—340 (1980).
16. MADERSPACH, K.—SENSENBRENNER, M.: Experientia **33,** 358—360 (1977).
17. PATTON, M. W.—NAHORSKI, S. R.—ROGERS, K. J.: J. Neurochem. **27,** 807—812 (1976).
18. PERKINS, J. P.—MOORE, M. M.: Mol. Pharmacol. **9,** 774—782 (1973).
19. PRASAD, K. N.: Biol. Rev. **50,** 129—265 (1975).
20. ROTMAN, A.: Brain Res. **146,** 141—144 (1978).
21. SENSENBRENNER, M.—MADERSPACH, K.—LATZKOVITS, L.—JAROS, G. G.: Dev. Neurosci. **1,** 90—101 (1978).
22. SENSENBRENNER, M.—MANDEL, P.: Exp. Cell Res. **87,** 159—167 (1974).
23. SCHMITT, H.—POCHET, R.: Febs Letters **76,** 302—305 (1977).
24. TAKASU, N.—CHARRIER, B.—MAUCHAMP, J.—LISSITZKY, S.: Eur. J. Biochem. **90,** 131—138 (1978).
25. TAYLOR, D. P.—PERT, C. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76,** 660—664 (1979).
26. VAUQUELIN, G.—GEYENET, P.—HANOUNE, J.—STROSBERG, A. D.: Life Sci. **23,** 1791—1796 (1978).
27. VARON, S.—SAIER, M.: Exp. Neurol. **48,** 135—162 (1975).
28. WATLING, K. J.—DOWLING, J. E.—IVERSEN, L. L.: Nature **281,** 578—580 (1979).
29. WIEGANT, V. M.—GISPEN, W. H.: „Molecular and functional neurobiology" Elsevier (1976).

A FOSZFOLIPÁZOK BIOLÓGIAI ÉS PATOLÓGIAI SZEREPE*

MÉSZÁROS ISTVÁN

Tapolca Városi Tanács Egyesített Egészségügyi Intézménye Belgyógyászati Osztály

A foszfolipázok a foszfolipidek észterkötéseit hidrolízis útján hasító specifikus enzimek. Jelentőségüket szubsztrátjaik — a foszfolipidek — biológiai szerepe határozza meg.

A foszfolipidek

A foszfolipidek kémiailag foszforsavdiészterek, amelyek felépítése a következő molekulákból történik:

1. első alkoholkomponens,
2. egy vagy két zsírsav,
3. foszforsav,
4. második alkoholkomponens.

Az első vagy fő alkoholkomponens a *glicerin* vagy a *szfingozin*. Előbbi háromértékű alkohol, az utóbbi aminodialkohol. A második alkoholkomponens a *kolin*, egy kvaterner ammóniumbázis, a *kolamin* vagy *etanolamin*, és ennek biológiai prekurzora a *szerin*, amely oxiaminósav. E három vegyület biogenetikailag rokon aminoalkohol. Második alkoholkomponens lehet továbbá a foszfolipid molekulában az *inozitol*, amely ciklusos hatértékű alkohol. Második alkoholkomponensként szerepelhet maga a *glicerin* is, amint az a foszfatidilglicerolban és a foszfatidil-3'-O-glicerolban történik. Foszfatidsavval észteresített glicerin képezi a második alkoholkomponenst a kardiolipinben is, s ezáltal annak molekulája három glicerinrészből épül fel.

Az első vagy fő alkoholkomponens alapján a foszfolipidek két osztályra oszthatók:

1. glicerin-foszfolipidekre,
2. szfingolipidekre.

A *glicerinfoszfolipidek*ben a kolin, etanolamin, szerin és a glicerin, a *szfingolipidek*ben a kolin vagy az etanolamin szerepel második alkoholkomponensként.

A glicerin foszfolipidekben a glicerin első két OH-csoportja hosszú szénláncú zsírsavval, a harmadik pedig foszforsavval van észteresítve, s az így

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13—16. között Sümegen elhangzott előadás.

keletkezett foszfatidsavhoz kapcsolódik — ugyancsak észterkötéssel — a második alkoholkomponensek valamelyike. A 2- vagy β-pozíciójú észterkötés hidrolízisével, szabad zsírsav lehasításával *lizofoszfolipidek* keletkeznek, amelyek mint erélyes detergensek, igen intenzív biológiai aktivitással, kifejezett membrán-destruktív hatással rendelkeznek. Ha a glicerin-foszfolipidekben az egyik zsírasav helyére enoléterként sztearin- vagy palmitinsavnak megfelelő aldehidek kapcsolódnak, *plazmalogének* keletkeznek. A lizofoszfolipidek és plazmalogének igen kis mennyiségben találhatók a sejtekben.

A kvantitatíve legjelentősebb foszfolipidek az emlős membránban:

— foszfatidil-kolin (lecitin)
— foszfatidil-etanolamin (kefalin)
— foszfatidil-szerin
— foszfatidil-inozitol
— szfingomielin,

a bakteriális és mitokondriális membránban:

— foszfatidil-etanolamin
— foszfatidil-glicerol
— difoszfatidil-glicerol (kardiolipin).

Az emlős citoplazmatikus membránok az említett foszfolipidek mellett — mint vízoldékony poláris lipidet — koleszterint is tartalmaznak. A koleszterin hidrogénkötések és hidrofil interakciók révén kapcsolódik a foszfolipidekhez, s befolyásolja utóbbiak foszfolipázok általi hidrolízisét (De Kruyff és mtsai 1972).

A foszfolipid molekulák egyedüli tulajdonsága, hogy mint nem vízoldékony poláris ún. amfipatikus lipidek, vizes közegben stabil *bilayer*-ré rendeződnek, s ennek révén a biológiai membránok alapvető strukturális elemeivé váltak (Gorter és Grendel 1925, Danielli és Dawson 1935, Robertson 1960, Singer és Nicolson 1972). Ez tette lehetővé a sejt s annak intracelluláris kompartment-rendszerének kialakulását, végső soron az élet keletkezését. Ezáltal a foszfolipidek mint biológiailag aktív vegyületek az élet *sine qua non*-jának tekinthetők.

A foszfolipidek számos további élettani szerepe is ismertté vált. Mint a lipoprotein makromolekulák alkotóelemei, a proteinekkel együtt lehetővé teszik a neutrális zsírok vízoldékonyságát s ettől elválaszthatatlan transzportját (Fredrickson és mtsai 1967). A kvantitatíve legjelentősebb foszfolipid szolgáltatja a zsírsavat a koleszterin észteresítéséhez a lecitin-koleszterin-acil-transzferáz (LCAT) katalizálása révén (Hanahan és mtsai 1960). Szerepük van továbbá az epe koleszterinjének oldatban tartásában (Small és Rapo 1970), a sejtek fúziójában (Poole és mtsai 1970, Lucy 1970), a neuronális excitációban (Coock és mtsai 1972), a leukociták lizoszomális enzimei aktivitásában (Hawiger és mtsai 1972), az RNA-szintézis szabályozásában az RNA-polimerázra gyakorolt hatásuk révén (Lezius és Müller-Lornsen 1972) s a biológiai kalcifikációban (Wuthier 1973).

A foszfolipidek általános jelentőségét azonban az adja, hogy fiziko-kémiai sajátságaik révén a biológiai membránok folytonos dinamikus állapotban lévő strukturális és funkcionális elemeit képezik. Ennek megfelelően univerzálisak, valamennyi — állati, növényi és bakteriális — sejtben megtalálhatók.

A foszfolipázok felosztása

A foszfolipázok mint a foszfolipideket hidrolizáló enzimek, egyéb tényezők (H-kötések, ion interakciók, koleszterin, proteinek stb.) mellett, döntő szerepet játszanak a foszfolipidek anyagcseréjében, annak szabályozásában s a membrán-mátrix fiziko-kémiai állapotára gyakorolt közvetlen hatásuk révén a biológiai membránok struktúra- és funkcióváltozásában, végül is a sejtek életfolyamatában. A foszfolipidek — szubsztrátjaikhoz hasonlóan — ubiquiterek, egyaránt megtalálhatók az állati, növényi és mikrobiális sejtekben.

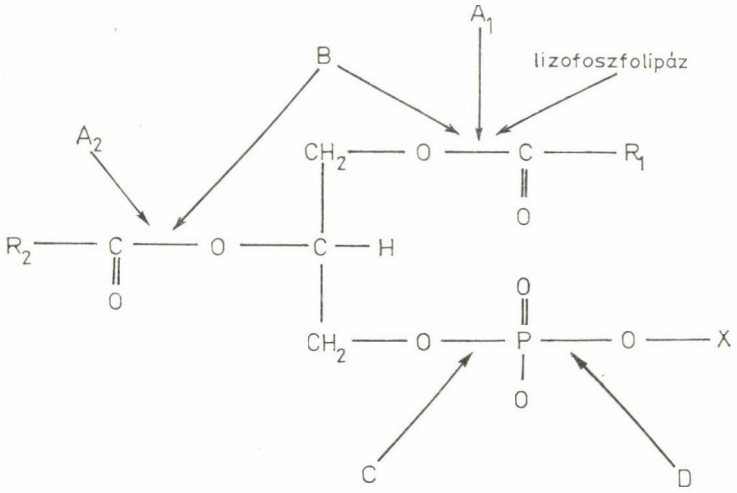
A különböző állati mérgek kémiai szerkezetüket és hatásukat tekintve egymástól igen eltérő, biokémiailag, biológiailag és farmakológiailag aktív anyagok bonyolult keverékének tekintendők. Csaknem valamennyi lényeges hatóanyaguk aminosavakból származik, s 1. a biogén aminok, 2. a polipeptidek és 3. a fehérjék közé sorolható. Számos közös, illetve hasonló komponenst tartalmaznak (HABERMANN 1968, 1972). Az enzimek között a foszfolipáz mindig, a hialuronidáz pedig csaknem mindig megtalálható. Az állati és bakteriális mérgekben előforduló hialuronidáz azok ún. „spreading factor"-ával azonos (CHAIN és DUTHIE 1940, HABERMANN 1968, 1972).

A foszfolipázokat szubsztrátjaikon kifejtett hidrolitikus aktivitásuk helye szerint A-B-C-D- betűkkel jelölik, illetve osztják fel. Eszerint a *foszfolipáz* A_1 a glicerin-foszfolipid 1- vagy α-acil kötését, a *foszfolipáz* A_2 annak 2- vagy β-acil kötését hidrolizálja. A *foszfolipáz C* foszfát csoporttal, a *foszfolipáz D* anélkül hasítja le a glicerin-foszfolipid vagy a szfingolipid molekuláról a vízoldékony bázikus második alkoholkomponenst *(1. ábra)*. E felosztás korántsem tökéletes, mivel az egyes foszfolipázok szubsztrátspecifitása, optimális aktivitási feltételei és hasítási termékei között jelentős különbségek vannak.

A *lizofoszfolipázok* ugyancsak az acilkötés hidrolizálásával bontják a lizofoszfolipideket, s számos emlős szövetben (MARPLES és THOMPSON 1966), valamint a legkülönbözőbb mikrobákban megtalálhatók.

A foszfolipázok jelölését a Nemzetközi Biokémiai Unió nómenklatúrája szerint az *1. táblázat* mutatja.

A hidrolízis helye szerint az acil-hidrolizáló foszfolipáz A_1, A_2 és B, valamint a lizofoszfolipázok karbonsavészterázoknak, a vízoldékony bázist hasító foszfolipán C és D foszfodiészterázoknak tekintendők.



1. ábra. A foszfolipázok és a lizofoszfolipáz általi hidrolízis helyei a foszfolipid molekulán (Romics és Szollár 1977)

1. táblázat

A foszfolipázok jelölése a Nemzetközi Biokémiai Unió szerint
(Enzim Nómenklatúra, 1973)

Foszfolipáz A	foszfatidát-acilhidroláz	
Foszfolipáz A_1	foszfatidát-1-acilhidroláz	E.C. 3.1.1.32
Foszfolipáz A_2	foszfatidát-2-acilhidroláz	E.C. 3.1.1.4
Lizofoszfolipáz	lizofoszfatid-acilhidroláz	E.C. 3.1.1.5
Foszfolipáz B	foszfatidát- és lizofoszfatidát-acilhidroláz	
Foszfolipáz C	foszfatidilkolin-kolinfoszfohidroláz	E.C. 3.1.4.3
Foszfolipáz D	foszfatidilkolin-foszfatidilhidroláz	E.C. 3.1.4.4

(Möllby 1978)

A szubsztrátspecifitás szűkítésével a C és D típusú foszfolipázok glicerofoszfolipáz C- és D-re, valamint szfingomielináz C- és D-re, a lizofoszfolipázok pedig lizofoszfolipáz A-, C- és D-re oszthatók.

A foszfolipázok viszonylag koncentráltan találhatók az állati mérgekben, a pancreas-nedvben, valamint a bakteriális toxinokban. Ebből adódik, hogy vizsgálatuknak egyrészt az állati, másrészt a bakteriális toxinok egyre intenzívebb kutatása révén a toxinológia adott lendületet. Delezenne és mtsai (1911, 1914) a század elején írták le a kobra méreg lecitint hasító s lizolecitint felszabadító hatását. Macfarlane és Knight (1941) közleményéből derült ki elsőként, hogy *Cl. welchii* α-toxinja szintén lecitináz hatással rendelkezik. A kobraméreg hatása foszfolipáz A_2, a *Cl. welchii* α-toxinjáé foszfolipáz C aktivitásnak felel meg.

A típusú foszfolipázok és lizofoszfolipázok

Valamennyi foszfolipáz közül a foszfolipáz A a legelterjedtebb és legismertebb. Csaknem minden sejtféleségben kimutatták, a bakteriálistól az emlős sejtekig. Megtalálhatók továbbá a pancreas és hasonló exokrin mirigyek szekrétumában, valamint az állati mérgekben. Feltételezik, hogy jelentős szerepük van a membrán-foszfolipidek anyagcseréjének szabályozásában. A sejtekhez való viszonyukban extracellulárisak vagy intracellulárisak.

Az állati mérgekben, valamint a pancreas nedvben kiválasztott — kedvezőbb izolálási lehetőséget nyújtó — *extracelluláris* A típusú foszfolipázok a legismertebbek. Vízoldékonyak, specificitásuk a 2-acil gyökkel szembeni, aktivitásuk Ca^{++} szükséges, molekulasúlyuk 14 000 körüli, hat—hét diszulfid hídjuk van (van den Bosch 1974). A legismertebb a sertéspancreasból származó foszfolipáz A_2. Zimogén formában 130, aktív formában 123 aminosavból áll, hat diszulfid hídja van, rendkívül stabil (de Haas 1970). Az *intracelluláris* foszfolipáz A kevésbé ismert, mivel többnyire membránhoz kötött s nehezen oldható és izolálható.

Számos emberi és állati szövetben, valamint testfolyadékban, így bélnyálkahártyában (Schmidt és mtsai 1957, Epstein és Shapiro 1959, Ottolenghi 1964), pancreasban (Rimon és Shapiro 1959, Magee és mtsai 1962, van Deenen és mtsai 1963), agyból (Gallai-Hatchard és mtsai 1962, Gatt és mtsai 1963), májból (Scherphof és van Deenen 1965, Bjørstad 1966), veséből, tüdőből, szívből és lépből (Robertson, 1966), granulocitákból (Elsbach és Rizak 1963), heparinos plazmából (Vogel és Zieve 1961) mutattak ki foszfolipáz A aktivitást.

A különböző baktériumok hosszú sorában is előfordul a foszfolipáz A, olykor lizofoszfolipázokkal együtt. Kimutatták aktivitását intracellulárisan az *E. coli* különböző törzseiben, a *Mycobacterium phlei*-ben, a *Vibrio parahaemolyticus*-ban, a *Bacillus subtilis*-ben, a *Staphylococcus aureus*-ban, a *Clostridium sordelli*-ben, a *Bacillus megathericum*-ban, továbbá a *Butyrivibrio sordelli*-ben (Möllby 1978). Az *E. coli*-ban detergens-rezisztens, valamint detergens-szenzitív foszfolipáz A-t és lizofoszfolipázt találtak (Doi és Nojima 1975). A *B. subtilis* membránhoz kötött foszfolipáz A_1 és vízoldékony lizofoszfolipáz szintézisére is képes (Kent és Lennarz 1972).

Egyes baktériumok exkrétuma is mutat foszfolipáz A aktivitást. Az extracelluláris foszfolipázok hemolitikus hatással rendelkezhetnek (Liu 1966). Pugh és Cawson (1977) vizsgálatai szerint a *Candida albicans* blasztosporamembránnal összefüggő foszfolipáz A-t és lizofoszfolipázt képes termelni. Citokémiai módszerekkel kimutatták, hogy a csirkeembrió korion-allantoisz epitélsejtjeit elárasztó *Candida albicans* növekedésben levő hifáin foszfolipáz A exkréció van. Ezek a megfigyelések a baktériális foszfolipáz A direkt toxikus vagy direkt virulencia fokozó hatását igyekeznek alátámasztani. Mindez fi-

gyelmet érdemel, ugyanis számos baktérium tartalmaz foszfolipáz A-t a burkában is, és a mechanizmus, amely révén a baktériumok a gazdasejtekbe hatolnak, ma még kevésbé ismert.

A foszfolipáz A biológiai károsító hatása három módon érvényesülhet: 1. a strukturális foszfolipidek enzimatikus bontása révén, 2. a keletkező lizofoszfolipidek citolitikus hatásán keresztül, 3. a felszabaduló és felszaporodó szabad zsírsavak biológiai hatása által.

A tisztított folfolipáz A csak akkor fejti ki enzimatikus hatását, ha a reakcióközegben megfelelő szubsztrát — lipoproteinek, tojássárgája, vvt.-hemolizátum — áll rendelkezésre. A szérum albumin és a szabad zsírsavak pedig aktivátorai az enzimnek (HABERMANN 1968, 1972). Az aktivált enzim számos farmakológiai hatása közül a következők a lényegesebbek:

Hemolízis: A foszfolipáz A indirekt hemolitikus tényező. Mosott vvt.-szuszpenzióban egyáltalán nem indít el hemolízist, csak azután, ha a rendszerhez alkalmas szubsztrátot adnak. A hatására keletkező lizolecitin az a tényező, amelynek direkt hemolitikus hatása van (HABERMANN 1955, 1958), (IBRAHIM és THOMPSON 1965, JOSHUA és ISHAY 1973).

A trombociták és a granulociták károsítása: A foszfolipáz A a vvt.-ekhez hasonlóan oldja a sóoldatban szuszpendált trombocitákat, s szerotonint szabadít fel belőlük, teljes vérben azonban a plazmaalbumin gátolja a trombociták oldását (HABERMANN és SPRINGER 1958, KIRSCHMANN és mtsai 1963). Ugyancsak a keletkezett lizolecitin révén oldja az enzim az izolált leukocita lizoszómákat (WEISSMANN és mtsai 1964).

A hízósejtek károsítása: A foszfolipáz A a vvt.-ekhez hasonlóan oldja a hízósejteket, s azokból hisztamint és heparint, valamint más biológiailag aktív anyagokat szabadít fel (BLOOM és HAEGERMARK 1967, FREDHOLM és HAEGERMARK 1967). A hízósejtek szétesése is csak akkor következik be, ha a lizolecitin keletkezéséhez alkalmas foszfolipidek rendelkezésre állnak a szövetekben vagy az inkubációs közegben (ROTHSCHILD 1965).

Enzimek gátlása: A foszfolipáz A több struktúrához kötött enzim és enzim-rendszer aktivitását képes csökkenteni. Gátolja — többek között — a szöveti tromboplasztint, az oxidatív foszforilálást (VÁZQUEZ-COLÓN és ELLIOTT 1966, AUGUSTYN és mtsai 1970), az ATPázt, a szukcinát-dehidrogenázt (NEUMANN és mtsai 1952, 1954, HABERMANN 1954). Klinikai megfigyelés alapján feltételezhető, hogy a foszfolipáz A által felszabadított és megszaporodott szabad zsírsavak a glukuroniltranszferázt gátolni képesek (MÉSZÁROS 1975, 1976).

B típusú foszfolipázok

A B típusú foszfolipázok az 1- és 2-acilgyök hidrolízise révén egyaránt képesek kihasítani a zsírsav molekulákat az intakt foszfolipidekből, valamint a keletkezett lizofoszfolipidekből.

A foszfolipáz B önálló enzim volta hosszú idő óta vitatott, mivel a B típusú aktivitás két különböző entitásra, foszfolipáz A-ra és lizofoszfolipázra bontható (KAWASAKI és SAITO 1973). CONTARDI és LATZER (1928) már fél évszázada leírta, hogy a darázs *(Vespa vulgaris)* mérgének foszfolipáz A mellett foszfolipáz B aktivitása is van. Ezt újabban HABERMANN (1968) megerősítette, de szerinte is kérdéses, hogy a lecitin két zsírsavmaradványának lehasítása két különböző szukcesszíve ható enzim (A és B) vagy egyetlen enzim (A + B) hatására következik-e be. DOERY és PEARSON (1963) kígyó- és méhméregben mutatta ki az enzimet.

Foszfolipáz B aktivitást találtak számos emlős szövetben (DAWXON 1956, MARPLES és THOMPSON 1960), valamint néhány baktériumban. Az *E. coli*-ból izolált detergens-rezisztens foszfolipáz A egyaránt rendelkezik A_1 és A_2, valamint lizofoszfolipáz aktivitással, s így önálló foszfolipáz B-nek tekinthető (NISHIJIMA és mtsai 1977). ONO és NOJIMA (1969), valamint NISHIJIMA és mtsai (1974) *Mycobacterium phlei*-ből olyan membránhoz kötött foszfolipáz A_1-et izoláltak, amely nem pozícióspecifikus lizofoszfolipáz aktivitással is rendelkezik s ezáltal foszfolipáz B aktivitása van, szubsztrátspecificitása igen széles, a kardiolipint is hidrolizálja. Foszfolipáz B aktivitást találtak a *Penicillum notatum*-ban is (SAITO és KATES 1974). FEBRER (1966) a foszfolipáz B-t olyan „Sicherheitsenzym"-nek tekinti, amelynek a feleslegben levő membrántoxikus lizolecitin eliminálásában döntő szerepe van. Az önálló enzim léte azonban ma sem bizonyított. Feltételezhető, hogy a foszfolipáz B aktivitás a foszfolipáz A_1 és A_2 (LEHNINGER 1975) vagy a foszfolipáz A_2 és lizofoszfolipáz (ROMICS és SZOLLÁR 1977) keverékéből származik.

C típusú foszfolipázok

A jól ismert C típusú foszfolipázok baktériumokból származó extracelluláris enzimek. Sajátosságaik megállapítása mégsem könnyű, ugyanis az őket produkáló baktériumtörzsek egyéb extracelluláris toxinokat is termelnek, s ezek egyrészt maguk is aktivitást fejtenek ki a sejtmembránra, másrészt a foszfolipáz C hatásaival interferálhatnak. Szubsztrátspecificitásuk igen különböző, többnyire széles spektrumú (MÖLLBY 1978).

MACFARLANE és KNIGHT (1941) írta le, hogy a gázgangréna kórokozója a *Cl. welchii* (vagy *Clostridium perfringens)* toxinja lecitinázt tartalmaz, amely a lecitint foszfokolinra és digliceridre bontja, s ez azonos a specifikus α-toxinnal, amely letális, hemolitikus és nekrotikus hatással rendelkezik. Az enzim hőstabil, aktiválásához Ca^{++} szükséges, jól gátolható fluoriddal, citráttal, foszfáttal s különösen *Cl. welchii* antitoxikus szérummal.

A *Cl. perfringens* ezen foszfolipáz C aktivitású α-toxinja volt az első ismert bakteriális foszfolipáz. Cink-metalloenzim (KURIOKA és MATSUDA 1976), a vörösvérsejtekre és más sejtekre a legaktívabban ható foszfolipáz, amely az

eukariotikus membránban található foszfolipidek legnagyobb hányadát bontani képes. Szubsztrátspecificitása széles, lecitinre, foszatidil-etanolaminra, foszfatidil-szerinre, szfingomielinre, valamint lizolecitinre és lizokefalinra terjed ki. Molekulasúlya gélfiltrációval meghatározva 30 000 körüli (MÖLLBY és WADSTRÖM 1973), más eljárásokkal mérve igen szórt értékeket kaptak.

A *Cl. perfringens* mellett a *Cl. novyi* (BARD és MCCLUNG 1948), a *Cl. novyi A* típusa (MACFARLANE 1950), a *Cl. haemolyticum* (MACFARLANE 1950), *Cl. bifermentans* (MILES és MILES 1950), és a *Cl. sordelli* (MACFARLANE 1948) képez extracelluláris toxinokat, amelyek egy része foszfolipáz C aktivitást mutat.

A *B. cereus* két, foszfatidil-kolint és foszfatidil-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C-je vált ismertebbé. Az előbbi cink-metalloenzim, molekulánként két Zn atomot tartalmaz, egyiket szorosabb, a másikat lazább kötésben (LITTLE és OTNAESS 1975). Aktiválásához Zn^{++} szükséges, de Ca^{++} nem befolyásolja működését (OTTOLENGHI 1965), az intakt humán vörösvérsejtekre nem fejt ki litikus hatást, s az élő sejtek foszfolipidjeit nem bontja. Gyors hemolízist okoz azonban, ha a rendszerhez szublitikus koncentrációban detergenst adnak (WOODWARD és ZWAAL 1972).

A foszfatidil-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C többnyire az állati sejtekben fordul elő, a baktériumokban csupán szórványosan található (ALLAN és MICHEL 1965, IKEZAWA és mtsai 1976). A *B. cereus* tenyészetének szűrletéből SLEIN és LOGAN (1965) mutatták ki, akik ún. „foszfatázémia-faktor" szerepet tulajdonítanak az enzimnek. Ez abban nyilvánul meg, hogy az enzim specifikusan, membránhoz kötött foszfatázt képes felszabadítani.

A humán patológiában nagy szerepet játszó *Staphylococcus aureus* szintén két foszfolipázt termel. Az egyik szfingomielin specifikus, ún. szfingomielináz C. A másik foszfatidol-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C.

A *Staphylococcus aureus* szfingomielináz C-je eredetileg mint lizolecitint is hasító enzim nyert leírást (DOERY és mtsai 1965). Igen erélyes hemolitikus tényező. A *Staphylococcus aureus* jelentős humán patológiai szerepe miatt széles körű tanulmányozást nyert. Molekulasúlya 20—38 000, működéséhez Mg^{++} szükséges, instabil, Mg-t tartalmazó bufferben tartható el liofílezve. Az enzimet eredetileg WALBUM (1921) fedezte fel s a *Staphylococcus aureus* β-hemolízinjeként írta le. Sajátossága a birka vörösvérsejtek ún. „hot—cold" hemolízise. Ez abban jut kifejezésre, hogy a β-hemolizinnel, azaz szfingomielináz C-vel kezelt birka vörösvérsejtek 37 °C-on nem, de 4 °C-ra lehűtve igen gyorsan hemolizálódnak.

A *Staphylococcus aureus* foszfatidil-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C-je szűk szubsztrátspecificitással rendelkezik. Biológiai szerepe nem ismert, az enzim specifikus szubsztrátját, a foszfatidil-inozitolt ugyanis a staphylococcusok nem tartalmazzák. LOW és FINEAN (1977) — a *B. cereus* azonos enziméhez hasonlóan — alkalikus foszfatáz felszabadító hatását figyelte meg vese- és más emlős sejtekben.

Az *Acinetobacter calcoaceticus* extracellularis hemolitikus hatású foszfolipáz C-t termel (LEHMANN 1971, 1972, 1973). Az ember és nyúl esetében direkt hemolitikus hatása van, míg a birkánál „hot—cold" reakciót vált ki. Gátolja a humán vörösvérsejt membrán ATP áz aktivitását (THELESTAM és MÖLLBY 1976).

Foszfolipáz C képzésére számos Pseudomonas törzs is képes. Közülük a legjelentősebb humán patológiai szerepe a *Pseudomonas aeruginosa*-nak van. Több toxinja között foszfolipáz C is található, de ezt még nem tisztították kellő mértékben, s patológiai hatásai sem ismertek eléggé. Feltételezik azonban, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* okozta pneumóniákban a pulmonális surfactant destrukciójában van szerepe. ESSELMANN és LIU (1961) a *Pseudomonas aeruginosa* egyik szuperproduktív mutánsa tenyészetének szupernatánsából szokatlanul nagymennyiségű foszfolipáz C-t izolált. Feltűnő volt, hogy az enzim dializálás révén aktivitását elvesztette, de a dializáló hártyán belüli és kívüli folyadék összeöntése után az enzimaktivitás teljes mértékben visszatért. Az enzim két komponensből, egy 30 000-en felüli és egy 1000-en aluli molekulasúlyúból állt.

A C típusú foszfolipázok termelésére a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok hosszú sora képes. Az emlős sejtekben azonban közülük csupán a szfingomielináz C, valamint a foszfatidil-inozitol specifikus foszfolipáz C fordul elő.

D típusú foszfolipázok

A foszfolipáz D-t korábban kizárólag tisztán növényi enzimnek tekintették. A hetvenes évek elején azonban néhány emlős és bakteriális eredetű foszfolipáz D-t izoláltak (MÖLLBY 1978). Számos növényben megtalálható, káposztalevélben fedezték fel. Biológiai szerepe az észterifikált bázisok transzfer reakcióinak katalizálása. Izolálásukat és analizálásukat rossz oldékonyságuk akadályozza. STANACEY és STUHNE-SEKALEC (1970) kimutatta, hogy a káposzta foszfolipáz in vitro két molekula foszfatidil-glicerolból difoszfatidil-glicerolt — azaz kardiolipint — szintetizál, miközben melléktermékként egy molekula glicerin szabadul fel.

Először *Haemophilus parainfluenzae*-ben és *E. coli*-ban írták le a kardiolipin specifikus foszfolipáz D előfordulását (ONO és WHITE 1970). Később *Proteus vulgaris*-ban, *Salmonella typhimurium*-ban és *Pseudomonas aeruginosa*-ban is kimutatták. Az enzimnek a bakteriális sejt energetikai állapotváltozásában van szerepe. A baktériumban, nyugalmi állapotából az aktív, energia fogyasztó állapotba történő adaptációja során a kardiolipin abnormálisan magas nyugalmi szintje jelentékenyen csökken, a foszfatidil-glicerin alacsony szintje pedig a normálisra emelkedik (ONO és WHITE 1971).

HIRSCHBERG és KENNEDY (1972) a kardiolipin szintézist *in vivo*, az *E. coli*-ban is bizonyította. Ennek lehetőségét számos baktérium esetében már

korábban is feltételeztek. Azt a következtetést vonták le, hogy a legtöbb baktériumban a foszfolipáz D katalizálja a kardiolipin szintézist. Kiderült azonban, hogy gyakran a bioszintézis a foszfolipáz D legcsekélyebb nyoma nélkül zajlik le, s azt egy foszfolipáz D-hez hasonló hidrolitikus enzim katalizálja.

A *Corynebacterium ovis (pseudotuberculosis)* extracelluláris toxinjának — bakteriális eredete ellenére — szfingomielinre és lizolecitinre specifikus aktivitása van (Souček és mtsai 1967, 1971). Az enzim letális és dermonekrotikus hatással rendelkezik, de nem hemolitikus, mint a *Cl. perfringens* α-toxinja vagy a *Staphylococcus aureus* β-toxinja, amelyek ugyancsak bontják a szfingomielint. Součkova és Souček (1972) vizsgálatai szerint annak ellenére, hogy a toxin viszonylag drasztikus elváltozásokat hoz létre a membrán-foszfolipidekben azáltal, hogy a membránban levő valamennyi szfingomielint ceramid-foszfáttá hidrolizálja, a *Corynebacterium ovis* toxinjával történő inkubálás után a vörösvérsejtek nem mutatnak fokozott fragilitást más hemolitikus ágensekkel szemben, sőt ellenkezőleg: a *Staphylococcus aureus* α- és β-toxinjával, a *Clostridim perfingens* α-toxinjával, valamint az amboceptor mediált komplementtel szemben rezisztensnek bizonyulnak. E jelenség magyarázata az, hogy a foszfolipáz D úgy befolyásolja a szubsztrátot, a vörösvérsejt membrán szfingomielinjét, hogy ezáltal a membrán nem károsodik, de megszünteti annak fogékonyságát a szfingomielináz C-vel, a β-hemolízinnel szemben. A gátlás kompetetív.

Ezzel azonban nem magyarázható, hogy miért nem fejti ki hatását az előkezelt membrán: 1. a *Cl. perfringens* α-toxinja, amely a szfingomielin mellett lecitint és más foszfolipideket is hidrolizál, 2. a *Staphylococcus aureus* α-toxinja, amely nem a membrán-foszfolipidekre, hanem a glükoprotein receptorokra hat, s 3. miért marad el a komplement-mediált hemolízis. Mindez azzal magyarázható, hogy a membrán-szfingomielin hidrolízise a membrán megnövekedett negatív felületi töltését eredményezi, mivel a lehasított kolin pozitív töltésű, s így a membrán és a litikus ágensek közötti interakciók jelentősen megváltoznak.

További kérdés, hogyan okoz *in vivo*, kísérleti állatokon, letális hatást a foszfolipáz D, amely nem vált ki hemolízist és a fibroblaszt kultúrákban sem növeli a sejt-membrán permeabilitását. A letális hatásnak két magyarázata van. Az egyik szerint a kísérleti állatok a tüdő, máj és lép trombocita aggregáció okozta trombózisában pusztulnak el (Součova és Souček 1972). A trombocita aggregációt a trombocita-membrán szfingomielinjének hidrolízise váltja ki. Ugyancsak a trombocita aggregációval magyarázható a toxin dermonektorikus hatása is. A másik magyarázat szerint a foszfolipáz D hisztamint és más vazoaktív anyagot szabadít fel az állat heparinocitáiból (Strandberg és mtsai 1974). E jelenség az anafilaxiás shock patomechanizmusára emlékeztet.

A C típusú foszfolipázok alkalmazása a membránok vizsgálatában

Mivel a foszfolipidek a biológiai membránok alapstruktúráját képezik, a foszfolipázok rájuk gyakorolt specifikus hatása messzemenőkig alkalmas a membránstruktúrák tanulmányozására. A leginkább vizsgált biológiai membrán az eritrocita-membrán. Ez érthető, hiszen emberben és állatban egyaránt a leghozzáférhetőbb sejtek az eritrociták. Az eritrocita-membrán hipotóniás — vagy egyéb — hemolízis révén centrifugálással könnyen előállítható, s nem kontaminálódik intracelluláris organellumokkal vagy membránfragmentumokkal. További egyszerű experimentális membrán-rendszerek nyerhetők a baktérium protoplasztok, szubcelluláris organellumok, a lizoszómák, a mitokondriumok és az endoplazmatikus vezikulák izolálásával.

A foszfolipán C-k legjobban kutatott citotoxikus hatása a hemolízis. Általában bakteriális eredetű, a *Cl. perfringens*-ből, a *B. cereus*-ból, a *Staphylococcus aureus*-ból és az *A. calcoaceticus*-ból származó foszfolipáz C enzimeket alkalmazzák a hemolízis vizsgálatára. Közvetlen összefüggés állapítható meg az enzimek hemolizálóképessége és szfingomielináz C aktivitása között.

A foszfolipázok által kiváltott hemolízis eredeti koncepciója nagyon egyszerű. Eszerint a foszfolipázok hidrolizálják a foszfolipideket, amelyek a membrán-mátrix fő permeabilitást szabályozó komponensei, s ezáltal durva membránkárosodás s a hemolízis jön létre. A kérdés azonban korántsem ilyen egyszerű. A Clostridiumok foszfolipáz C aktivitású hemolízinjeinek felfedezése után feltűnt, hogy a hasonló biokémiai sajátosságú foszfolipázok hemolizáló képessége jelentősen változik a különböző fajokból származó vörösvérsejtekkel szemben (OAKLEY és mtsai 1947, MILES és MILES 1950). A hemolízis vizsgálatai kapcsán a kérdések sora vetődött fel:

— Mi az oka annak, hogy az ún. „hot—cold" hemolízis számos foszfolipázt jellemzi, mégis a *Staphylococcus aureus* szfingomielináz C-je esetében a legintenzívebb?
— Miért nincs hemolizáló képessége a *B-cereus* foszfolipázainak, amikor a foszfolipidek éppen olyan széles skáláját hidrolizálják, mint a specifikus szfingomielinázok?
— Mi az oka a különböző fajú vörösvérsejtek különböző érzékenységének?
— A hemolízist a membrán-foszfolipidek hidrolízise váltja-e ki, vagy a sejtmembrán vele született strukturális defektje eredményezi?

E kérdések megválaszolásához az eritrocita-membrán struktúrájára vonatkozó további vizsgálatokra volt szükség, amelyeket lényegében csak az utóbbi évtizedekben vihettek keresztül, mivel csupán újabban állnak rendelkezésre kellő tisztaságú foszfolipáz C preparátumok.

A *Staphylococcus aureus* β-toxinja (szfingomielináz C) által kiváltott „hot—cold" hemolízist GLENNY és STEVENS (1935) írta le elsőként. A jelenséget a *Cl. perfringens*, az *A. calcoaceticus* és a *P. aureofaciens* foszfolipáz C-i esetében

ben is megfigyelték. A jelenség kapcsán a birka vörösvérsejtek csaknem valamennyi szfingomielinje leépült anélkül, hogy lízis következne be. Ilyenkor a szfingomielin-depletált membrán stabilitását a foszfolipidek és divalens ionok (főként Mg^{++}) közti interakciók biztosítják. A szfingomielin-depletált eritrociták azonban igen érzékennyé válnak a legkülönbözőbb ágensekkel szemben, így pl. más foszfolipázokra, a hőmérséklet csökkentésére, a kelát képző EDTA-ra (Shyth és mtsai 1975), valamint a *Staphylococcus aureus* α- és δ-toxinjaira (Möllby és mtsai 1976). E szinergetikus hemolitikus hatások érvényre jutására a természetes infekciók kapcsán is adódhat lehetőség.

A membrán-struktúra tisztított bakteriális foszfolipázokkal történő vizsgálatai révén meghatározták a humán eritrocita membrán-bilayerben a foszfolipidek megoszlását. A vizsgálatokhoz a *Staphylococcus aureus* vagy *B. cereus* foszfolipáz C-jének és sertéspancreas vagy *Naja-naja* foszfolipáz A_2-jének kombinációját használták, s a kombináció által létrejött szelektív hidrolízis révén megállapították a foszfolipidek aszimmetrikus disztribúcióját a membrán-bilayerben (Zwaal és mtsai 1973). Rorhman és Lenard (1977) más módszerekkel ugyanezen eredményre jutott.

További vizsgálatok kapcsán számos foszfolipid-aktív endogén enzimet találtak az eritrocita membránban. Foszfolipáz A-t, A_2-t és C-t, lizofoszfolipázt, lipázt és diacilglicerol-kinázt mutattak ki (Möllby 1978). Összefüggést észleltek a vörösvérsejtek metabolikus státusza és a foszfolipidjeinek bonthatósága között. Gazitt és mtsai (1976) a membrán-proteinek ATP általi foszfolilációját tanulmányozva szoros korrelációt találtak, egyrészt az ATP-depléció, másrészt a membrán-proteinek defoszforilációja, az intramembránális partikulumok aggregációja, a protein nélküli szabad lipid-bilayer viszonylagos növekedése és a foszfolipideknek a foszfolipázokkal szembeni akcesszibilitása között.

Ma is kevéssé ismert a foszfolipázok patogenézisben betöltött szerepe. Ezek az enzimek gyakran citolitikus hatással rendelkezvén hatást gyakorolhatnak a legtöbb sejtre, s az ún. „cél-sejtek" sejtmembránja foszfolipidjeinek csupán kisfokú károsítása is durva elváltozást eredményezhet a szervezet egészében. Az eddigi vizsgálatok alapján a hízósejtek, az idegsejtek, a trombociták és leukociták tekinthetők a vörösvérsejteken túlmenően ún. szenzitív „kulcssejtek"-nek. Fentiek alapján várható, hogy a foszfolipázok a jövőben minden bizonnyal nagyobb érdeklődést váltanak ki a membránnal és toxinológiával intenzívebben foglalkozó szakembereken túlmenően a patológusok és a klinikai szakmák művelői részéről is.

IRODALOM

1. Allan, D., Michell, R. H.: Biochem. J. **142,** 591 (1974).
2. Allan, D., Michell, R. H.: Biochem. Soc. Trans. **3,** 751 (1975).
3. Augustyn, J. M., Parsa, B., Elliott, W. B.: Biochim. biophys. Acta **197,** 185 (1970).
4. Babd, R. C., McClung, L. S.: J. Bacteriol. **56,** 665 (1948).
5. Bjøbnstad, P.: Biochim. biophys. Acta **116,** 500 (1966).

6. Bloom, G. D., Haegeocmark, Ö.: Acta physiol. scand. **71,** 257 (1967).
7. Chain, E., Duthie, E. S.: Brit. J. exp. Path. **21,** 324 (1940).
8. Contardi, A., Latzer, P.: Biochem. Z. **197,** 222 (1928).
9. Coock, A. M., Low, E., Ishijimi, M.: Nature **239,** 150 (1972).
10. Danielli, J. F., Davson, H.: J. Cell. Comp. Physiol. **5,** 495 (1935).
11. Dawson, R. M. C.: Biochem. J. **64,** 192 (1956).
12. Deenen, L. L. M. van, de Haas, G. H., Heemskerk, C. T. T.: Biochim. biophys. Acta **67,** 295 (1963).
13. Delezenne, C., Ledept, S.: C. R. Soc. Biol. (Paris) **71,** 121 (1911).
14. Delezenne, C., Fourneau, E.: Bull. Soc. Chim. Fr. **15,** 421 (1914).
15. Doery, H. M., Pearson, J. E.: Biochem. J. **92,** 599 (1963).
16. Doery, H. M., Magnusson, B. J., Gulasekharam, J., Pearson, J. E.: J. gen. Microbiol. **40,** 283 (1965).
17. Doi, O., Nojima, S.: J. Biol. Chem. **250,** 5208 (1975).
18. Elsbach, P., Rizak, M. A.: Amer. J. Physiol. **205,** 1154 (1963).
19. Epstein, B., Shapiro, B.: Biochem. J. **71,** 615 (1959).
20. Esselman, M. T., Liu, P. V.: J. bact. **81,** 939 (1961).
21. Ferber, E.: Diskussionsbeitrag. in: R. Heisteb, H. F. Hofmann (ed.) Die Entzündung. Urban und Schwarzenberg, München, pp. 209—211 (1966).
22. Fredholm, B., Haegermark, Ö.: Acta physiol. scand. **71,** 357 (1967).
23. Fredrickson, D. S., Levy, R. I., Lees, R. S.: New Engl. J. Med. **276, 34, 93, 148, 215, 273,** (1967).
24. Gallai-Hatchard, J., Mogee, W. L., Thompson, R. H. S., Webster, G. R.: J. Neurochem. **9,** 545 (1962).
25. Gatt, S., Baroenhlz, Y., Roitman, A.: Bioche. biophys. Res. Commun. **24,** 169 (1966).
26. Gazit, Y., Loyter, A., Reichler, Y., Oaad, I.: Biochim. biophys. Acta **419,** 479 (1976).
27. Glenny, A. T., Stevens, N. F.: J. Path. Bact. **40,** 201 (1935).
28. Gorter, E., Grendel, F.: J. Exp. Med. **41,** 439 (1925).
29. Haas, G. H. De, Slotboom, A. J., Bonsen, P. P. M. von Deenen, L. L. M., Maroux S., Puigserver, A., Desnuelle, P.: Biochim. biophys. Acta **221,** 31 (1970).
30. Habermann, E.: Naturwissenschaften **41,** 429 (1954).
31. Habermann, E.: Arch. Exper. Path. Pharmakol. **125,** 158 (1955).
32. Habermann, E.: Z. ges. exp. Med. **129,** 436 (1958).
33. Habermann, E., Springer, H.: Naturwissenschaften **45,** 133 (1958).
34. Habermann, E.: Ergebn. Physiol. biol. Chemie. exper. Pharmak. **60,** 221 (1968).
35. Habermann, E.: Science **177,** 314 (1972).
36. Hanahan, D. J., Watts, R. M., Pappajohn, D.: J. Lipid Res. **1,** 421 (1960).
37. Hawinger, J., Hawiger, A., Koenig, M. G.: Yale J. Biol. Med. **45,** 42 (1972).
38. Hirschberg, C. B., Kennedy, E. P.: Proc. natn. Acad. Sci. USA. **69,** 648 (1972).
39. Ibrahim, S. A., Thompson, R. S. H.: Biochim. biophys. Acta **99,** 331 (1965).
40. Ikezawa, H., Yamanegi, M., Taguchi, R., Miyoshita, T., Ohyabu, T.: Biochim. biophys. Acta **450,** 154 (1976).
41. Joshua, H., Ishay, J.: Acta Pharmacol. Toxicol. **33,** 42 (1973).
42. Kawasaki, N., Saito, K.: Biochim. biophys. Acta **296,** 426 (1973).
43. Kent, C., Lenarz, W. J.: Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. **69,** 2793 (1972).
44. Kirschmann, C., Aloof, S., de Vries, A.: Thrombos. Diathes. haemorrh. **9,** 512 (1963).
45. De Kruyff, B., Demel, R. A., von, Deenen, L. L. M.: Biochim. biophys. Acta **255,** 331 (1972).
46. Kurioka, S., Matsuda, M.: Anal. Biochem. **75,** 281 (1976).
47. Lehmann, V.: Acta path. microbiol. scand. **79,** 61 (1971).
48. Lehmann, V.: Acta path. microbiol. scand. **80,** 827 (1972).
49. Lehmann, V.: Acta path. microbiol. scand. **81,** 419 (1973).
50. Leninger, A. L.: Biochemistry. 2nd ed. Worth Publishers Inc. New York, pp. 290—291 (1975).
51. Lezius, A., Müller-Lornsen, B.: Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. **353,** 1872 (1972).
52. Little, C., Otnaess, A. B.: Biochem. biophys. Acta **391,** 326 (1975).
53. Liu, P. V.: J. infect. Dis. **116,** 112 (1966).
54. Low, M. G., Finean, J. B.: Biochem. J. **162,** 235 (1977).
55. Lucy, J. A.: Nature **227,** 815 (1970).
56. MacForlane, M. G., Knight, B. C. J. G.: Biochem. J. **35,** 884 (1941).
57. MacForlane, M. G.: Biochem. J. **42,** 590 (1948).
58. MacForlane, M. G.: Biochem. J. **47,** 267 (1950).

59. MAGEE, W. L., GALLAI-HATCHARD, J., SANDERS, H., THOMPSON, R. H. S.: Biochem. J. **83,** 17 (1962).
60. MARPLES, E. A., THOMPSON, R. H.: Biochem. J. **74,** 123 (1960).
61. MÉSZÁROS, I.: Orv. Hetil. **116,** 2703 (1975).
62. MÉSZÁROS, I.: A Hymenoptera-ártalmak toxikológiája. Kandidátusi értekezés. Sümeg (1976).
63. MILES, E. M., MILES, A. A.: J. gen. Microbiol. **4,** 22 (1950).
64. MÖLLBY, R., WADSTRÖM, T.: Biochym. biophys. Acta **321,** 569 (1973).
65. MÖLLBY, R., HOLME, T., NORD, C. E., SMYTH, C. J., WADSTRÖM, T.: J. gen. Microbiol. **96,** 137 (1976).
66. MÖLLBY, R.: Bacterial phospholipases. in: J. JELJASZEWICZ, T. Wadström (ed.) Bacterial toxins and Cell Membranes. Academic Press, London—New York—San Francisco pp. 367—424 (1978).
67. NEUMANN, W., HABERMANN, E., AMEND, G.: Naturwissenschaften **39,** 286 (1952).
68. NEUMANN, W., HABERMANN, E.: Z. physiol. Chem. **296,** 166 (1954).
69. NISHIJIMA, M., AKAMATSU, Y., NOJIMA, S.: J. biol. Chem. **249,** 5658 (1974).
70. NISHIJIMA, N., NAKAIKE, S., TAMORI, Y., NOJIMA, S.: Eur. J. Biochem. **73,** 115 (1977).
71. OAKLEY, C. L., WARRACK, G. H., CLARKE, P. H.: J. gen. Microbiol. **1,** 91 (1947).
72. ONO, Y., NOJIMA, S.: Biochim, biophys. Acta **176,** 111 (1969).
73. ONO, Y., WHITE, D. C.: J. Bact. **103,** 111 (1970).
74. ONO, Y., WHITE, D. C.: J. Bact. **108,** 1065 (1971).
75. OTTOLENGHI, A.: J. Lipid Res. **5,** 532 (1964).
76. OTTOLENGHI, A. C.: Biochim. biophys. Acta **106,** 510 (1965).
77. POOLE, A. R., HOWELL, J. I., LUCY, J. A.: Nature **227,** 810 (1970).
78. PUGH, D., CAWSON, R. A.: Sabouraudia **15,** 29 (1977).
79. RIMON, A., SHAPIRO, B.: Biochem. J. **71,** 620 (1959).
80. ROBERTSON, J. D.: The molecular biology of cell membranes. in.: D. NACHMANSOHN (ed) Molecular Biology. Academic Press, London—New York pp 87—151 (1960).
81. ROBERTSON, A. F.: Biochim. biophys. Acta **116,** 379 (1966).
82. ROMICS, L., SZOLLÁR, L.: Lipidek, lipoproteinek és hyperlipoproteinaemiák. Medicina Könyvkiadó, Budapest p 66 (1977).
83. ROSSI, C. R., SARTORELLI, L., TATO, L., BARETTA, L., SILIPRANDI, N.: Biochim. biophys. Acta **98,** 205 (1965).
84. RATHMAN, J. E., LENARD, J.: Science **195,** 743 (1977).
85. ROTHSCHILD, A. M.: Brit. J. Pharmacol. **25,** 59 (1965).
86. SAITO, K., KATES, M.: Biochim. biophys. Acta **369,** 245 (1974).
87. SCHERPHOF, G. L., VON DEENEN, L. L. M.: Biochim. biophys. Acta **98,** 204 (1965).
88. SCHMIDT, G., BESSMAN, M. J., THANNHAUSER, S. J.: Biochim. biophys. Acta **23,** 127 (1957).
89. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: Science **175,** 720 (1972).
90. SLEIN, M. W., LOGAN, G. F. Jr.: J. Bact. **90,** 69 (1965).
91. SMALL, D. M., RAPO, S.: New Engl. J. Med. **283,** 53 (1970).
92. SMIYTH, C. J., FREER, J. H., ARBUTHNOTT, J. P.: Biochim. biophys. Acta **382,** 479 (1975).
93. SOUČEK, A., MICHALEC, C., SOUČKOVA, A.: Biochim. biophys. Acta **144,** 180 (1967).
94. SOUČEK, A., MICHALEC, C., SOUČKOVA, A.: Biochim. biophys. Acta **227,** 116 (1971).
95. SOUČKOVA, A., SOUČEK, A.: Toxicon **10,** 501 (1972).
96. STANACEY, N. Z., STUHNE-SEKALEC, L.: Biochim. Biophys. Acta **210,** 350 (1970).
97. STRANDBERG, K., MÖLLBY, R., WADSTRÖM, T.: Toxicon **12,** 199 (1974).
98. THELESTAM, M., MÖLLBY, R.: Medical Biology **54,** 39 (1976).
99. VÁZQUEZ-COLÓN, L., ELLIOTT, W. B.: Toxicon **4,** 61 (1966).
100. VOGEL, W. C., ZIEVE, L.: J. Lipid Res. **5,** 177 (1964).
101. WALBUM, L. E.: C. r. Seanc. Soc. Biol. **85,** 1205 (1921).
102. WEISSMANN, G., BECKER, B., THOMAS, L.: J. Cell Biol. **22,** 115 (1964).
103. WOODWARD, C. B., ZWAAL, R. F. A.: Biochim. biophys. Acta **274,** 272 (1972).
104. WUTHIER, R. E.: Clin. Orthop. **90,** 191 (1973).
105. ZIEVE, L., VOGEL, W. C.: J. Lab. clin. Med. **57,** 586 (1961).
106. ZWAAL, R. F. A., ROELOFSEN, B., COLLEY, C. M.: Biochim. biophys. Acta **300,** 159 (1973).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója. Műszaki szerkesztő: Sándor István
A kézirat nyomdába érkezett: 1981. III. 3. — Terjedelem: 24,50 (A/5) ív

81.9393 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

50,— Ft ISSN 0025—0333

TARTALOM

MEGEMLÉKEZÉS 1

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ ELŐADÁSOK

Kaszab Zoltán: Az arid területek faunatörténete 5
Szabolcsi Gertrud: Enzimszerkezet, enzimek lokalizációja 19
Ádám György: Belső szervi működések nagyagyi ellenőrzése 35

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

Löffler Heinz: Adatok az osztrák tavak kialakulásához 49
Daubner Imrich: Dunai vízlépcsők létesítésének biológiai aszpektusai 57
Jakucs Pál, Kovács Margit, L. Mészáros Ilona, B Papp László, Cs. Szabó Mária és Tóth János Attila: Tendenciák a „Síkfőkút Project" erdő-ökoszisztéma elemmozgásaiban 67
Ábrahám Ambrus: Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok a mocsári teknős *(Emys orbicularis)* szívének elsődleges ingertermelő központján 87
Somogyi Béla, Matkó János és Papp Sándor: Fluoreszcencia-spektroszkópiás módszerek alkalmazása biológiai rendszerek vizsgálatában: Förster-típusú energiatranszfer 109
Bánfalvi Gáspár, Csuzi Sándor és Antoni Ferenc: A bakteriális rekombináció enzimei... 129
Kádas Lajos: A nitrát táplálkozásélettani jelentősége zöldségfélékben és termékeikben a methemoglobinémia veszélye szempontjából 143
Kövér György: A proximális tubulus működése 153
Györgyi Sándor: Modellmembránok a membránműködés vizsgálatában 173
Sugár István: Külső tényezők hatása a foszfolipid membránok szerkezetére 177
Báthori György, Holly Sándor, Grandics Péter és Náray Anikó: Szerkezet és funkció vizsgálatok lipid vezikulákon 187
Szabon János és Tölgyesi Ferenc: Lipid—víz diszperziók fázisátalakulásának vizsgálata termo-depolarizációs analízissel (TDA) 195
Szőgyi Mária, Cserháti Tibor és Szabon János: Membránműködést befolyásoló anyagok vizsgálata mesterséges membránon 201
Cserháti Tibor, Szőgyi Mária és Kanyár Béla: Kromatográfiás módszerek alkalmazása a membrán-biokémiában 209
Blaskó Katalin: Primycin hatása membránok alkáli kation transzportjára 219
Zsoldos Ferenc: Gyökér iontranszport változások környezeti stresszhatásokra 227
Erdei László: Szenzitivitás és rezisztencia: iontranszport és ATPáz aktivitás sótűrő növényekben 239
Cseh Edit és Bujtás Klára: Környezetszennyezés: nyomelem — toxicitás 247
Maderspach Katalin: Neuron és glia sejtek fejlődő tenyészeteiben tapasztalt változások a membránban elhelyezkedő adenilcikláz enzimnél és béta-receptornál 259
Mészáros István: A foszfolipázok biológiai és patológiai szerepe 267

Megjelent 1981. XI. 20.

Index: 26.496

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

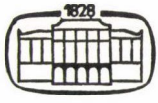
BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK

KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTI

TIGYI JÓZSEF

XXIV. KÖTET 3—4. SZÁM



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST
1981

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 változ ter jedelmű füzetekben jelennek meg. Négy füzet alkot egy kötetet. Évenként egy kötet jele nik 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 ne m vállal.

A Közlemények előfizetési ára kötetenként 100,— 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 BESZÁMOLÓJA

1981. április 22.

TIGYI JÓZSEF

Az Akadémia éves közgyűléseinek programjában szereplő nyilvános osztályüléseinken az Osztály beszámolójában egyrészt az Osztály munkájáról, másrészt feladatainkról szoktunk számot adni.

Mivel az elmúlt közgyűlés tisztújító közgyűlés volt, kérem, engedjék meg, hogy ebben a beszámolóban a szokásosnál kisebb részt szenteljek az elszámolásnak és aránylag többet terveinkről, feladatainkról szóljak, amelyek természetesen a korábbi évek, sőt évtizedek osztálytervein, tudománypolitikáján és ezek megvalósult eredményein alapulnak.

A közgyűlést követően első feladatunk tudományos bizottságaink újjászervezése volt. Az Elnökség idevonatkozó elvi ajánlása szerint a bizottsági rendszerben is tovább kell erősítenünk az interdiszciplinaritás gyakorlatát. Jelenthetem, hogy a meglevő hagyományos kilenc diszciplináris bizottságunk mellett két újat hoztunk létre; az egyik a Természetvédelmi Bizottság, amely közös szakmai bizottsága az Osztálynak és az Országos Környezet- és Természetvédelmi Hivatalnak; a másik a Testnevelési és Mozgásbiológiai Bizottság közös tudományos bizottság az Országos Testnevelési és Sporthivatallal, Biokémiai Bizottságunkat úgy szerveztük át, hogy az szervezetileg közös az Orvostudományok Osztályával és magában foglalja a klinikai-biokémia szakterületét is. Nem feledkeztünk meg a hagyományok ápolásáról sem, ezért szervezeti keretbe foglaltuk a biológiai tudománytörténettel foglalkozókat, létrehozva a Biológiai Tudománytörténeti Témabizottságot.

A szakmai bizottságok újjáválasztásával együtt megújítottuk az összes folyóirat-szerkesztőbizottságot, a nemzetközi uniók hazai nemzeti bizottságait és érvényesítettük szempontjainkat a TMB szakbizottságok megalakításánál is.

Szakmai bizottságaink többsége még a múlt év folyamán megkezdte működését és hozzálátott az 5 éves munkaprogram, valamint az egyéves munkaterv kidolgozásához. A titkároknak ezen munkához központi eligazítást adtunk. Szeretném hangsúlyozni, hogy bizottságaink munkáját a jövőben is alapvető jelentőségűnek tartom, az osztály testületi munkájának egyik leglényegesebb része itt kell, hogy follyon, véleményem szerint a bizottságaink a közvetlen műhelymunka valóban probléma-orientált testületi egységei kell legyenek.

A 12 bizottságunkban összegyűjtöttük az egyes diszciplínák, ill. interdiszciplinárisan megoldandó problémák legjobb, legaktívabb, mintegy 200 kutatóját, akik tudatában vannak annak a felelősségnek, melyet tudományszakunk, ill. a problémakör fejlesztésével kapcsolatosan vállalniok kell.

A Biológiai Osztály vezetése különös gondot kíván a jövőben is fordítani az összes bizottság munkájára, figyeléssel, tanácsadással és nem utolsósorban a munka rendszerességének ellenőrzésével.

Szeretném kérni, hogy a bizottságok tevékenységéről maguk a bizottsági vezetők adjanak számot, illetőleg a bizottság tagjai mondjanak véleményt, ötleteket a munka továbbfejlesztésére, javítására.

További munkánkból kiemelném a Szegedi Biológiai Központban tartott ülésünket. Az Osztály vezetése jó képet kapott az ott folyó munkáról a főigazgató és az igazgatók beszámolóiból, majd a tudományos programunk keretében a szélesebb érdeklődő szakmai közvélemény is megismerkedhetett ezekkel az eredményekkel. Az Osztályülés és az SzBK munkája iránt nagy érdeklődést tanúsított az Agrártudományok és az Orvosi Tudományok testülete is. A társadalmi érdeklődést bizonyította, hogy osztályülésünkre a megyei Pártbizottság is elküldte képviselőjét.

Mint a délelőtti tudományos ülés mutatta, az SzBK a hazai kísérletes biológia legjelentősebb és egyre jobb nemzetközi reputációjú bázisává fejlődött. Permanens feladatunk lesz a jövőben is, hogy munkájukat nagy figyelemmel, segítőkészséggel támogassuk és szellemi és metodikai kapacitásukat az egész magyar biológia számára egyre fokozódó méretekben hasznosítsuk. Az intézet kollektívájában és vezetőiben megvan az a felkészültség és jóindulatú együttműködési készség, mely az ott folyó jelentős alapkutatásokat célra orientáltan irányítja, s emellett a magyar biológia, orvostudomány és mezőgazdaság-tudomány gyakorlati problémáinak megoldásához is hatékony segítséget tud adni.

Egy másik osztályülésünk az EGYT Kőbányai Gyáregységében volt Bihari István igazgató elvtárs meghívására. Ülésünkön a többi gyógyszergyár képviselője és a Gyógyszerkutató Intézet igazgatója is részt vett. Együttes megállapításunk volt, hogy a gyógyszerkutatás és gyógyszergyártás problémaorientáltsága a kémiáról — jelentőségének csökkenése nélkül — a biológiára tevődött át, beleértve az experimentális orvostudományt. Ugyancsak kihangsúlyozódott a természetes hatóanyagok iránt megnyilvánuló fokozott érdeklődés, ami még jobban szélesíti a biológia lehetőségeinek spektrumát e területen.

Mint az 1980. évi beszámolóban is hangsúlyoztuk, a magyar biológiának egyik kiemelt feladata, hogy a jó eredményekkel rendelkező és népgazdasági szempontból nagyon fontos gyógyszeriparral való együttműködését rendszeres szervező munkával fokozatosan bővítse.

Talán már szócséplésnek tűnik örökös visszatérésünk a tudomány és a gyakorlat kapcsolatára, de hogy ez valóban élővé váljon, szüntelenül hangoz-

tatnunk kell, míg a termelők és a kutatók rájönnek, hogy közös érdek az, hogy keressék és megtalálják egymást.

Amikor hangsúlyozzuk a kutatás gyakorlat-orientáltságának szükségességét és elismerjük a társadalmi elvárás fontosságát, néhány példával arra is utalnunk kell, hogy alapkutatás nélkül nincs előrehaladás. A délelőtti előadások között szerepelt két nagyon is gyakorlati eredmény. Farkas Tibor lipid kutatásait 1971 előtt vízi szervezeteken végezte és azidőben még ő sem gondolta, hogy egy mezőgazdasági termelési problémához tud segítséget nyújtani. Az Enzimológiai Intézet alaptevékenysége a szerkezet és működés törvényszerűségeinek feltárása, Dévényi Tibor előadása ezen munkákra alapozott gazdaságosságot jelentősen fokozó eredményről adott számot.

Az Osztálynak módjában volt, hogy hozzászóljon és véleményt nyilvánítson arról az intézkedési tervről, amelyet a Kormány szándékozik tenni a Balaton környezetvédelmére a VI. ötéves terv folyamán. Véleményünk szerint ennek döntő részét a vízminőség-védelemnek kell képeznie. Az ezirányú javaslataink csakis a korábbi évek alapkutatási eredményeire támaszkodhattak. Mindezeket kutatás-támogatási és tudománypolitikai irányító szerveink felé kívánom hangsúlyozni, hogy legyen bizalmuk a látszólag vagy valóságosan „elvont" kutatások iránt. Sokan emlékszünk arra az időszakra, amikor a genetikának nem biztosították a nemzetközi mezőnnyel való megfelelő lépéstartást, ma ennek következményét a növénynemesítés, állattenyésztés, növényvédelem „kéri számon" tőlünk és némileg joggal, mert például a gyógyszeriparunk korábbi hírnevét és virágzását a hazai kémiai kutatási háttér biztosította. Tisztában vagyunk azzal, hogy a kutatástámogatás népgazdaságunknak nem csekély terhet jelent, de az alapkutatás elmaradása éppúgy visszahat a népgazdaságra, mint negatív és pozitív értelemben az elmaradott vagy korszerű technológiával termelő üzemek.

A fent vázolt probléma nemcsak hazai jelenség, francia tudósok nemrég jelentettek meg egy fehér könyvet, miután a francia tudományos kutatás — mintegy tizenkét évi böjt után — 1981-től jelentősebb hitelt kap. A fehérkönyv felvázolja a francia kutatás történelmi fejlődését: a 60-as évek expanzióját, a 70-es évek stagnálását. Ez az elaborátum megjegyzi, hogy az alkalmazott kutatás nem irányíthatja kizárólagosan az alapkutatást. Az alapkutatás természetesen nem szakadhat el a lehetséges alkalmazási területektől. Szükség van az alapkutatás és az alkalmazott kutatás közötti „közvetítő, közbülső" kutatásra is és ezt tudatosan kell szervezni. A könyv bizonyítani kívánja, hogy a technikai és tudományos erőfeszítéstől függ az ország jövője, helye a világban, de egyúttal az állampolgárok jóléte is. Megállapítja, hogy tudományos kutatás nélkül az életszínvonal elkerülhetetlenül és gyorsan romlik. E megállapításokhoz nem szükséges további kommentár.

Az elmúlt rövid periódus alatt osztályunknak egyik igen fontos feladata volt a kutatóintézeteink igazgatói, ill. igazgatóhelyettesei kinevezésének véle-

ményezése. Osztályunk felelősségе teljes tudatában — a Természettudományi II. Biológiai Főosztállyal szoros együttműködésben — oldotta meg ezt a munkát. Megelégedéssel jelenthetem, hogy kutatóintézeteink élére mindenhova szakmailag kiváló, szervezésben jártas és határozott kutatókat tudtunk javasolni, akik megfelelő vezetési tapasztalattal rendelkeznek. Kutatóintézeteink most funkcióban levő igazgatóinak átlagos életkora 56 év. Bár az életkor önmagában nem döntő paraméter, mégis arra utal, hogy intézeteink felelős vezetőire nem a konzervativizmus, hanem a haladás, az új problémák és feladatok megoldásáért lelkesedni és küzdeni akarás a jellemző.

Az új intézeti igazgatók személyének kiválasztásánál az intézeteknek az igazgató által javasolt kutatási terve is megvitatásra került. E kutatási tervek mindegyike reális volt és túlnyomó többségük olyan témák kidolgozására irányul, melyek a tudományszak fontos fejlődési irányát reprezentálják és jól illeszkednek a népgazdaság legfontosabb problémáinak megoldásához.

Meg kell említenem, hogy a Tihanyi Biológiai Intézet profilproblémája — a főtitkár kérése alapján is — többször foglalkoztatta az Osztályt. Nagyon alapos, szakmai, tudományszervezési és népgazdasági szempontok figyelembevételével lefolytatott vita alapján az az álláspont alakult ki, hogy a Tihanyi Biológiai Intézetben a Balaton limnológiai és általános hidrobiológiai kutatását jelentősen fejleszteni kell, de ugyanakkor az ott folyó eredményes neurobiológiai kutatásnak is helye és létjogosultsága van. Kívánatos, hogy a neurobiológiai kutatások is részben a Balaton vízminőségromlás problémája felé orientálódjanak. Meg vagyok győződve, hogy a tihanyi kollektíva Salánki János igazgató vezetésével meg tudja oldani az Intézet új profiljával kapcsolatban megnövekedett alapkutatási feladatait.

Bár a főtitkár elvtárs még nem döntött ebben a kérdésben, de legyen szabad bejelentenem, hogy — a fenti problémák jobb megoldását is segítendő — javasoltuk a tihanyi Intézet nevének megváltoztatását is az „MTA Limnológiai Kutató Intézete"-re.

Az Osztálynak egyik folyamatos feladata, hogy a TMB-vel együttműködve kutatóink tudományos minősítésének fejlesztésén is munkálkodjék. Mint említettem, a TMB bizottságainak személyi összetételének kialakításában érvényesítettük szempontjainkat, így a TMB-ben most Salánki János és Kovács Margit képviselik a biológiát; a kísérletes biológiai szakbizottság elnöke Keleti Tamás, titkára Niedetzky Antal, az általános biológiai szakbizottságé Vida Gábor és Oláh János lett. Az elmúlt periódusban jelentős számú tudományok doktora fokozat iránti kérelmet bírált el az osztály, szám szerint 16-ot. A legalább két véleményező írásos bírálata alapján lefolytatott eljárás után titkos szavazással 2 kivétellel pozitív javaslatot tehettünk a TMB-nek, ami azt jelenti, hogy a folyamodók alapos felkészültség és tudományos teljesítmény birtokában, kellő önkritikai értékelés után adják be kérelmüket.

A decemberi osztályülésen megtárgyaltuk és elfogadtuk a következő 5 éves terv alatt kimunkálandó legfontosabb témaköröket, Programunkba az alábbi 11 témát vettük fel:

1. A hazai ökológiai kutatások helyzete és feladata.
2. Folyó és állóvizekre épülő és tervezett műszaki létesítményekkel kapcsolatos biológiai-környezeti problémák.
3. Genetika és állattenyésztés.
4. Az immunológiai kutatások helyzete, különös tekintettel a határterületekre.
5. Bioengineering.
6. Az ingerület problematikája.
7. A szövettenyésztés helyzete.
8. A protisztológia helyzete.
9. Az embriológia helyzete.
10. Az energia biológiai úton való termelése.
11. A biológia egyes területeinek fejlődési prognózisa a 2000. évig.

Az osztály jelenlegi megítélése alapján ezek a legfontosabb megtárgyalandó kérdések, de természetesen — ha időközben még fontosabbak merülnének fel — rugalmasan megváltoztatjuk a most ismertetett tervet.

A magyar biológia legfelsőbb testületi szerve a Biológiai Tudományok Osztálya, mely — mint említettem — speciális kérdésekben bizottsági rendszerére támaszkodva látja el funkcióját. Hadsereg nélküli vezérkar lenne azonban az osztály, ha nem támaszkodik a 3 hazai biológiai társaságba tömörült szakemberek legszélesebb rétegeire. E három társaság jelenleg a MTESZ szervezeti keretében működik, de személyi és szervezeti kapcsolatok révén egyre harmonikusabb kollaborációban Osztályunkkal. A Magyar Biofizikai Társaság 1980 decemberében tartotta tisztújító közgyűlését és mintegy 400 hazai kutatót tömörít szervezeti egységbe. A Magyar Biológiai Társaság júniusban tartotta közgyűlését, s mintegy 1800 biológus kutatót és középiskolai tanárt foglal magában. Igen örvendetes, hogy a Magyar Biokémiai Társaságban is sikerült felszámolni a sokévi megosztottságot és a közeljövőben megalakul az egységes Magyar Biokémiai Társaság, mely mintegy 400 tudományos munkást egyesít soraiban.

Amint látjuk, hazánkban a biológiai tudományos problémák kutatására — figyelembe véve az átfedéseket is — mintegy 2500 kiképzett szakemberre számíthatunk az előttünk álló feladatok megoldásában. Nyilvánvaló, hogy állandó feladatunk kell legyen ezen jelentős szellemi kapacitás „hadra-foghatóságával" való törődés, mely — bár számos szervezetek közötti organizációs probléma megoldását feltételezi, mégiscsak döntő mértékben ezen múlik hazánk biológiai tudományának és oktatásának fejleszthetősége.

Ennek szellemében a februári osztályülésünkön a Magyar Biológiai Társaságot felkértük, hogy számoljon be tevékenységéről. Örömmel regisztráltuk,

hogy a Magyar Biológiai Társaság vezetősége helyesen látja feladatait és hatékony szervezeti intézkedéseket tett és tesz nagy létszámú tagságának értelmes feladatok megoldására való mozgósításában.

Az osztály a többi biológiai társaság tevékenységének megtárgyalását is napirendjére tűzte.

Tisztelt Osztályülés!

Meg kell mondanunk, hogy az új évtizedben az új közgazdasági háttér, az új, VI. ötéves terv a prolongált időre, öt évre megválasztott újjáalakult testületek sok szempontból egészen új feladatok és perspektíva előtt állnak, ezért néhány tényre és jelzésre hadd hívjam fel a szíves figyelmüket.

A tudománypolitikai vezetés kicsit más szemszögből, de újra a tudományos testületekre irányította tekintetét.

Az Országos Tervhivatal elkészített több tudományfejlődési prognózist, amelyet a gazdaságtervezők irányító tevékenységében kíván felhasználni. Ennek zsűrizésére az Akadémia testületeit kérték fel; a Biológiai Tudományok Osztályára két feladat véleményezése hárult. De nemcsak a véleményező tevékenység, hanem az előkészítő munkában is számos szakemberünk vett részt. Véleményt kért a Kormányzat a VI. ötéves terv koncepciójához is. A Tudománypolitikai Bizottság véleményeztette az Akadémiával a kutatóintézeti hálózat átszervezésével kapcsolatos intézkedési tervét és az itt kialakult állásfoglalásokat jelentős mértékben figyelembe vette. E problémakörben Osztályunk külön osztályülés keretében fejtette ki véleményét. Az ÉVM és az OVH a Kormány elé történő terjesztés előtt az Akadémiával tárgyalta meg a Balaton környezetvédelmi problémáinak megoldására vonatkozó intézkedési tervét. Ebben a munkában Osztályunk jelentős mértékben vett részt. Ugyancsak az elmúlt évben az MTA főtitkára elrendelte az Akadémiai intézetek úgynevezett folyamatos beszámoltatását és a végzett munka megmérésére ugyancsak a testületeket kérte fel. Ezt a feladatot a Természettudományi II. (biológiai) Főosztállyal szoros együttműködésben láttuk el. E helyen is köszönetet mondok mindazoknak, akik értékes véleményükkel osztály-állásfoglalásunk kialakításában segítettek.

Megkeresték az Osztályt jövőbeni kutatási irányzatok, témák prioritásának kérdésében is. Mindezekkel csak arra szeretnék rávilágítani, hogy a kutatáspolitika a mai gazdasági helyzetben alapkutatási vonalon a legperspektivikusabb irányzatokra, gyakorlati vonalon pedig az elért eredmények, új módszerek hasznosítására helyez hangsúlyt és ebben a törekvésében felismerte, ezért számít arra a hazai és nemzetközi tapasztalatra és viszonylag objektív állásfoglalási készségre, amellyel a testületek tagjai rendelkeznek.

A biológia jelentőségének és eredményeinek széles társadalmi megismertetésével elégedettek lehetünk. A könyvkiadás, sajtó, rádió, televízió széles

teret biztosít a biológiai tudományos kérdéseinek. Pl. A „Közgazdasági fórum", a „Heti Világgazdaság" c. lap ismertette a génsebészet perspektíváit; a környezetbiológia helyet kap az Élet és Irodalomban, sőt még a Lúdas Matyi hasábjain is. Tömegével jelennek meg biológiai tárgyú ismeretterjesztő könyvek. Mindez örvendetes, de sajnos a nagy figyelemfelkeltésben, a divatban nagy a „zaj" is, és érdemes művek, cikkek, megnyilatkozások között sok a selejt, önreklám és meg kell kockáztatnunk a vádat, hogy sok a tudománytalanság, pénzhajhászás is. Nagyon kérjük, akinek nem inge, ne vegye magára. Valamikor tapasztalt, neves újságírók sem röstellték megkérdezni a tudományos osztályt, hogy hol van valami a tudományban, amiről érdemes írni. A maiak elég tájékozottnak vélik magukat, hogy kiválasszák riportalanyaikat és témájukat; meg kell mondani, hogy sokszor és ahogy lenni szokott, a kényesebb területekről. Könyvkiadóinktól is szívesen vennénk, ha egyrészt tematikai véleményt kérnének, másrészt saját reputációjuk érdekében a szakmai lektorok kijelölésében igénybe vennék segítőkészségünket. Nemcsak tudományos szinten tartozunk felelősséggel a nyomtatásban megjelentekért, az ismeretterjesztésben ez a felelősség talán még fokozottabb. A kutató hibájára, tévedésére társa azonnal rájön és megcáfolja. A tömegkommunikációban erre ritkán van mód, itt a tiszta vetésből a gyomot utólag kiirtani nagyon nehéz.

Természetesen nem hallgathatjuk el az osztály vezetésének és az osztály tagjainak, valamint a bizottsági elnököknek és titkároknak ezzel kapcsolatos feladatait és felelősségét sem.

Külön szeretnék szólni a Balaton környezetvédelmi kérdésével foglalkozó publicisztikai tevékenységről. Amennyire örvendetes, hogy e fontos népgazdasági, sőt politikai kérdés a közvélemény előtt rendszeresen ismertetésre kerüljön, annyira káros, ha a szerzők, tájékozatlanságból, tudatlanságból vagy — tisztelet a kivételnek — szenzációhajhászásból elfogultak, tévesen vagy csak kiragadott részigazságok közlésével, sőt felnagyításával tájékoztatják a járatlan és sokszor jóhiszemű nagyközönséget.

Kétségtelen, hogy az agrárprodukció népgazdasági szempontból elengedhetetlen növekedése sokszor kerül konfliktusba a környezetvédelemmel, ezen konfliktus feloldása azonban nem a széles tömegek körében keltett — elnézést a kifejezésért — demagóg sajtóvitával, hanem rendszeres, tudományos helyzetelemzéssel, tudományos erőinknek a probléma megoldására való mozgósításával és az illetékes hatóságokkal való szoros együttműködéssel oldható meg. Szentágothai elnök- és Láng főtitkárhelyettes elvtárssal együtt ezen gondolatmenetből kiindulva hívtunk össze március 24-én egy megbeszélést, a hazai ökológia és a mezőgazdaság-fejlesztés legkiválóbb szakembereinek részvételével. Ezen a megbeszélésen elhatároztuk az agrártermelés és a környezetvédelem ellentmondásainak szisztematikus és tudományos alapon való felszámolásának elkezdését, természetesen a meglévő bizottságok, testületek és hatóságokkal való igen szoros együttműködésben.

Itt a nyilvános osztályülés fórumán is szeretném kérni az illetékes szakembereket, hogy a fenti szempontokra ügyeljenek és a szakmailag hozzá nem értő újságírókkal és riporterekkel csakis teljes tudományos felelősségük tudatában és vállalásával működjenek együtt.

Legyen szabad a sok közül egy negatív — sajnos nem zsurnalisztikai — példát felhozni.

A Magyar Biológiai Társaság ifjúsági csoportja május 8—10-ig egy „ökoszisztéma tavaszi iskolát" rendez Tihanyban. Nem hiszem, hogy az ifjúságunk komoly tudományos munkára való nevelését segíti elő az az előadás, melynek „A Balaton nyomorúsága" a címe.

Nem demagógiával, hanem több kutatómunkával és jó szervezeti intézkedéssel tudjuk biztosítani egyik legnagyobb nemzeti kincsünk, a Balaton környezetének megóvását.

Tisztelt Osztályülés!

A következőkben szeretnék rátérni legfontosabb *feladataink* felvázolására. A feladatokkal együtt szeretném azt is bemutatni, hogy melyek azok a reális alapok, melyekre e feladatok megvalósítását felépíthetjük.

Röviden fogalmazva a magyar biológiának, így a Biológiai Tudományok Osztályának is kettős főfeladata van:

1. Biztosítanunk kell a hazai orvosi és mezőgazdasági kutatás biológiai tudományos hátterét.

2. Ki kell dolgoznunk, ill. adaptálnunk kell azokat a tudományos módszereket, melyekkel hazánk természetes és művi környezetének megóvását hosszú távon biztosítani lehet.

Mindezen főfeladatok megoldására az alábbi kutatási keretek állnak rendelkezésünkre.

a) OTTKT (Országos Távlati Tudományos Kutatási Terv)
v) OKKFT (Országos Középtávú Kutatási és Fejlesztési Terv)
c) Az MTA KKP (MTA Középtávú Kutatási Program)
d) Az MTA KKA (Központi Kutatási Alapja)
e) Kutatóintézetek, kutatócsoportok, intézmények, tanszékek költségvetése.

Ad a) *Az Országos Távlati Tudományos Kutatási Terv* keretében 3 kutatási irány ad feladatot a biológiai kutatásnak,

1. Az életfolyamatok szabályozásának mechanizmusa (bioreguláció)
2. A biológiailag aktív vegyületek kutatása.
3. Természet- és környezetvédelmi kutatások (bioszféra).

Mint az elmúlt évi beszámolóban részleteztem, a *bioreguláció* főirány kutatásáért országosan is az MTA felelős. Koordináló intézet a Szegedi Biológiai

Központ. A folyamatos témaellenőrzések és az 5 éves tervbeszámolók is azt mutatták, hogy számos értékes és jelentős alapkutatási munka folyik e keretben, továbbá nagyon örvendetes, hogy egyre több olyan gyakorlat felé orientált probléma megoldása került sorra, melyek az immunológia, gyógyszeripar és a mezőgazdasági termelés szempontjából nagy jelentőségűek. Sajnálatos, hogy az Eü. tárca keretében folytatott bioregulációs kutatásokat nem koordináltuk kellőképpen az Akadémia keretében folyókkal. Ezen koordinálás elvégzése a közeljövő fontos feladata kell legyen.

A biológiailag aktív vegyületek kutatása gyógyszeriparunk és mezőgazdaságunk, de bizonyos mértékig környezetvédelmünk fejlődésének is kulcskérdése. Igen örvendetes, hogy az OKKFT keretében is további két program szerveződött ezen igen fontos — és nagy gyakorlati jelentőségű kutatási feladat előmozdítására. E kérdésre a továbbiakban vissza fogunk térni.

A *bioszféra kutatás* folyamatos és egyre növekvő feladatunk. E kutatási komplexumnak számos fontos kérdése, hogy a meglevő munkahelyeinket adequatan képzett szakemberekkel tudjuk feltölteni. Igen fontos ezen a téren a Debreceni KLTE biológiai szakának — elsősorban Jakucs Pál akadémikusnak kezdeményezése, aki a szakbiológus-képzést jó színvonalú ökológusképzés irányába fejlesztette.

A bioszféra problémakör keretében az általános és az egész országban érvényes alapkérdések mellett, 3 kiemelt feladatot kell konkrétan szem előtt tartanunk:

1. A Balaton-térség környezetvédelme, melyben az MTA tudományos koordináló szerepét a tihanyi kutatóintézetnek kell betöltenie.

2. A budapesti agglomeráció környezetvédelmi problematikája, mely túlnyomórészt szárazföldi ökológiai kérdéseket tartalmaz, s melyet a Vácrátóti Botanikai Intézet kell hogy fő profiljának tekintsen, és

3. A dunai és tiszai víztározók ökológiai és hidrológiai vonatkozású problémáit.

Míg a Duna-kutatás kérdése elég megnyugtatóan megoldott az alsógödi kutatóállomásnak a Vácrátóti Intézettel való egyesítése révén, addig a JATE keretében működő Tisza-kutató csoport státusa, az MTA-val való kapcsolata sürgős rendezést igényel.

Fel szeretném hívni a figyelmet arra, hogy a Tisza vízgyűjtőrendszerében elvégzett beavatkozások igen jelentős ökológiai változást okoztak; nagyon gyorsan intenzív kutató munkával kell tisztázni ezen változások okát és várható következményeit.

Ad b) *Az Országos Középtávú Kutatási és Fejlesztési Terv* — a népgazdaság számára belátható időn belül hasznosítható eredményekkel kecsegtető — kutatásokat támogat 15 kiemelt program formájában.

A biológiai tudományok fontosságát és az Akadémia vezetésének előrelátását bizonyítja, hogy a 15 programon belül 7 vagy túlnyomórészt biológiai

problémakört ölel fel, vagy olyan, amelyben a biológiának jelentős szerepe van, vagy lehet.

E programok az alábbiak:

A 7. Originális gyógyszerkutatás fejlesztése.
A 8. Növényvédőszerek kutatása és fejlesztése.
A 9. A gabonatermelés fejlesztése.
A 10. A tömegtakarmányokra és melléktermékekre alapozott hús- és tejtermelés.
A 11. Az atomerőművek biztonságos üzemeltetését szolgáló kutatás-fejlesztési feladatok.
A 12. A Balaton regionális környezetvédelme.
A 14. A fehérjetermelés ipari technológiájának kutatása és fejlesztése.

Ha figyelembe vesszük, hogy a VI. ötéves terv folyamán az OKKFT programok finanszírozására mintegy 1/3-dal többet kíván fordítani kormányzatunk, mint az egész OTTKT kutatásra, igen elégedettek lehetünk, de egyben igen rugalmasan adaptálnunk kell kutatóhelyeinket és kutatóinkat arra, hogy fent felsorolt programokhoz minél többen és minél intenzívebben kapcsolódjanak. Arra is fel szeretném hívni a figyelmet, hogy a fent felsorolt programokért általában az illetékes minisztériumok a felelősek. Prominens fontosságú kérdés tehát, hogy ezen főhatóságokkal való együttműködést az eddigieknél közvetlenebb, rugalmasabb és hatékonyabb formában szervezzük meg.

Ad c) Az *MTA Középtávú Kutatási Programja* tulajdonképpen az Akadémia Tárcaszintű kutatásainak kerete.

Szintén figyelemreméltó és örvendetes, hogy az elfogadott 8 program közül 3 teljesen, ill. 1 részben biológiai vonatkozású.

Túlnyomórészt biológiai vonatkozású az alábbi 3;

az 1. A kémiai szerkezet és a biológiai hatás közti kapcsolat kutatása,
a 2. Biotechnológiai kutatások (különös tekintettel a géntechnológiára),
az 5. A talajok termékenységének gazdaságos művelését szolgáló tudományok.

Részben biológiai vonatkozású:

a 4. Új energiaforrások kutatása.

A bioenergia hasznosítására irányuló kutatások.

Mint látható e területen is bőven akad biológiai kutatási probléma. Most az a fontos feladat áll előttünk, hogy — alkalmazkodva a népgazdaság jelenlegi mérsékelt lehetőségeihez — megtaláljuk e programokban is a hatékony részvételünk módját. Az osztály vezetősége — ezt a törekvést elősegítendő — február hónap folyamán létrehozott egy „Genetic Engineering kutatási hálózatot", melynek keretében szervezetten próbálja a tudományterület szakembereit a hatékony együttműködésre összefogni.

Ad d) Az *MTA Központi Kutatási Alapja* (KKA) 1974 óta a MTA főtitkára az intézetek külső megbízásos munkái térítési díjainak egy részéből

Központi Kutatási Alapot hozott létre, melyet pályázat alapján juttathat olyan kutatómunkákra, melyek

„— új tudományos irányzatok és módszerek kialakítására vagy meghonosítására irányulnak;
— nagyjelentőségű tudományos-elméleti vagy gyakorlati kezdeményezések — köztük egyéni kezdeményezések — megvalósítását segítik elő;
— kiemelt kutatási feladatokhoz kapcsolódnak, de előre nem tervezhető, aktuálisan felmerülő szükségleteket kielégítő, „hézagpótló" kutatások;
— különböző — politikai, gazdasági — döntések tudományos megalapozását szolgálják."

A napokban járt le az e keretre javasolt témák beadásának határideje. Az osztály 6 ilyen témát javasolt a főtitkárnak. Kívánatos, hogy az érdekelt kutatók a pályázati felhívás megjelenése után feltétlenül adják be pályázatukat a nekik megfelelő témákra.

Ad e) Az intézetek és kutatóhelyek összes kutatásra fordítható kereteinek kevesebb mint 50%-át teszi ki az előbb említett első 3 lehetőség, azaz a kutatásra fordítható teljes összeg 50%-át teszi ki az ún. intézeti kutatásokra fordítható rész. Kétségtelen, hogy a költségvetési összegek reálértéke, különösen a tőkés műszerek inflációs árnövekedése miatt jelentősen csökkent, mégsem elhanyagolható munkalehetőséget jelent ez a pénzforrás. Az intézeti keret kiválóan alkalmas a kezdeményezésre, előzetes kutatásra, olyan témák előkészítésére, melyekkel majd jövőben pályázhatunk bőségesebb támogatás elnyerésére.

Tisztelt Osztályülés!

Mint ismertettem, az MTA vezetése — a szűkös anyagi lehetőségek ellenére is — több olyan csatornát teremtett, melyen keresztül az értelmes, fontos kutatómunka végzésére megvan a lehetősége a magyar biológusoknak. Az új körülmények között azonban hozzá kell szoknunk ahhoz, hogy a kutatás támogatása nem a felső szervek által intézett automatikus folyamat, a kutatóhelyek vezetőinek, de az egyes kutatóknak is tájékozottnak kell lenniök az új pénzforrásokról és azok elnyerési lehetőségeiről. Az Osztály a Természettudományi Főosztállyal szorosan együttműködve arra törekszik, hogy a biológusok ezirányú törekvéseit segítse.

A feladatok és lehetőségek ismertetése után legyen szabad néhány gondolatot a társfőhatóságokkal való együttműködés kérdéseiről elmondani.

Az eddig elmondottakból is kitűnik, hogy az új körülmények között fokozott jelentősége van a társfőhatóságokkal való együttműködésnek és egymás kölcsönös informálásának.

A Biológiai Osztály az alábbi főhatóságokkal tart, ill. törekszik tartani a szoros munkakapcsolatot: EüM, MÜM, MÉM, IM, OVH, OTKT és OTSH. Mint említettem, az OTKT-val és az OTSH-val közös bizottságot hoztunk létre, így az együttműködés elég közvetlen és jól biztosított. Javítanunk és növelnünk kell a kapcsolatok intenzitását a felsorolt 4 minisztériummal és 1 államtitkársággal. Nem kívánom azt mondani, hogy ezekkel eddig nem volt kapcsolatunk, mert számos ad hoc kérdés megoldásában működtünk együtt eredményesen. Úgy érezzük, hogy a Biológiai Osztály vezetésének a közeljövőben egyik legfontosabb feladata, hogy e kapcsolatot rendszeresebbé és élőbbé tegye.

Az említett külső főhatóságok mellett élénk és rendszeres kapcsolatot alakítottunk ki akadémiánk minden illetékes osztályával, különösen az Agrártudományok és a Matematikai—Fizikai Tudományok Osztályával alakult ki rendszeres munkakapcsolat, mely elsősorban közös rendezvények formájában nyilvánult meg. Az Orvostudományok Osztályával közösen ajánlottunk több tudományos programot az elnökségnek. Az ilyenfajta együttműködést a jövőben is fenntartani és erősíteni kívánjuk, hiszen az interdiszciplináris problémák megoldásának ez a természetes módozata.

Tisztelt Osztályülés!

Beszámolónkban csak a legfontosabb eredményeinket, problémáinkat és feladatainkat érintettem. Tudatosan hagytam el számos olyan fontos kérdést, mint pl. könyv-, folyóiratkiadás, nemzetközi kapcsolataink, biológia oktatás stb. Midezeket azért nem taglaltam részletesen, mert bár fontos lépéseket tettünk ezen és további sok kérdésben is, a végleges eredményről azonban mégsem tudok beszámolni, továbbá szeretném remélni, hogy a tisztelt kollegák hozzászólásaikkal ki fogják egészíteni az Osztály beszámolóját.

Röviden összefoglalva egyéves tevékenységünket: A Biológiai Osztály alkalmazkodva az új gazdasági körülményekhez és fokozott követelményekhez, rendszeres szervező munkával megpróbálta mozgósítani a magyar biológusokat egy újszerű, rugalmasabb, fokozottabban a gyakorlat felé forduló tudománypolitika megvalósítására. Tudatában vagyunk annak, hogy sikereink kezdetiek, de az irány helyes, az osztály és a bizottságok tagjai közül sokan nagy lendülettel kezdtek munkához és mozgósítottak sok további középkorú és fiatal biológust is. Az Osztály nevében ez alkalommal is szeretném megköszönni fáradozásukat és kérem további önzetlen és lelkes támogatásukat. Az Önök széles körű támogatása a magyar biológia fejlődésének legfontosabb záloga.

HOZZÁSZÓLÁSOK:

KIRÁLY ZOLTÁN

Tisztelt Kibővített Osztályülés! Az osztályelnök Tigyi akadémikus utalt arra, hogy a biológiai tudományoknak Magyarországon két központi feladata van, nevezetesen biztosítani a mezőgazdasági termelés és a gyógyító gyakorlati orvosi eljárások biológiai hátterét, másrészt megteremteni az okszerű környezetvédelem biológiai alapjait. Ami az elsőt illeti, rám rendkívüli hatást gyakorolt a délelőtti osztályülés, amikor a Szegedi Biológiai Kutató Intézet, az SZBK számolt be alapkutatásairól, amelyek majdnem kivétel nélkül kapcsolatban voltak a gyakorlattal, többnyire a mezőgazdasági termeléssel, de természetesen az orvoslással is. Az állattenyésztés, mint hallottuk, a takarmányhasznosításokkal kapcsolatban rendkívül sokat remélhet a biológiai kutatásoktól, azoktól a kutatásoktól, amelyekről éppen Dévényi dr. számolt be délelőtt. A növénynemesítés megint csak sokat remélhet a protoplasztfúziós eljárásoktól vagy azoktól az aminosav-, illetőleg fehérjekémiai vizsgálatoktól, amelyeket szintén Dévényi dr. vázolt délelőtt. A tavaszi fagyok elleni rezisztencia, mint tudjuk, sajnos éppen napjainkban aktuális. Ez a kérdés biológiai szempontból tisztázatlan. Rendkívüli érdeklődéssel fordulunk mi, a Növényvédelmi Kutató Intézet tagjai ezek felé az alapkutatások felé. Növényvédelmi szempontból is sokat várunk a fagyrezisztenciával, különösen a tavaszi fagyokkal kapcsolatos igazán érdekes és értékes alapkutatásoktól. Nem akarok itt bővebben kitérni a növényi betegségrezisztencia még mindig megoldatlan problémáira, amelyeknek fiziológiai-biokémiai alapjai nincsenek feltárva.

Nagy örömünkre szolgált az, hogy itt a délelőtti osztályülésen beigazolódott, hogy a Szegedi Biológiai Központ alapkutatási témái valóban szoros kapcsolatban vannak a gyakorlat igényeivel. Straub akadémikus mondta zárószavában délelőtt, hogy a jól szervezett és jól irányított, helyesen felfogott alapkutatás elengedhetetlen feltétele a gyakorlati tevékenységnek, pl. a mezőgazdasági gyakorlati tevékenységnek, de természetesen a gyógyító eljárásoknak is, az orvostudománynak is.

Másik szempont, amire én itt szeretnék kitérni, a környezetvédelem ominózus kérdése. Nagyon helyesen állapította meg az osztályelnök Tigyi akadémikus, hogy ha tárgyilagosan nézzük a helyzetet, valóban ellentét van a kemizálás és a környezetvédelem kívánalmai között. A kemizálás nélkülözhetetlen és elkerülhetetlen, ezt a tényt mindenképpen számításba kell venni. Szeretnék utalni itt Váncsa Jenő miniszternek, nemrégen az Akadémia dísztermében elmondott beszédére; ebben kitért arra, hogy 10 évvel ezelőtt 1 hektáron fele annyit termeltünk, mint manapság. Tíz év óta megduplázódott a mezőgazdasági produkció, és ez óriási dolog.

Ezt a kemizálás nélkül lehetetlenség lett volna elérni. Ebből következik az, hogy a kemizálásról lemondani nem lehet. A kemizálás viszont kétségtelenül ellentétben van a környezetvédelmi követelményekkel. Ezzel kapcsolatban olyan társadalmi nyomás nehezedik a kormányzatra meg a tudomány irányítóira, a tudománypolitikusokra, hogy ezt az ellentmondást valamilyen módon föl kellene oldani. Persze nagyon könnyű mindezt megállapítani, de azt nehéz megmondani, hogy hogyan lehet feloldani az ellentmondást. Itt eszembe jut Toynbee híres angol történésznek „challenge-response" elmélete, aminek az a lényege, hogy egy bizonyos civilizáció, egy bizonyos társadalom csak akkor tudott a történelem folyamán túlélni, ha egy nagyon fontos „challenge"-re megfelelő „respons"-zal felelt. Én azt hiszem, hogy a biológiai és az agrártudományok is hasonló helyzetben vannak a környezetvédelmet illetően. Hogy itt kihívással állunk szemben, azt az előbb említett konfliktus, ellentmondás jelzi. Hogy milyen felelettel fogunk válaszolni erre a kihívásra, ettől függ majd a biológiai és részben az agrártudományok fejlődése és sikere. A mi saját területünkön a növényvédelemben mindenesetre lehet valamit tenni, ahol pl. a növényi rezisztencia kihasználásával, szelektív védekezési módszerekkel csökkenteni lehet a környezetszennyezést. Utalnék arra is, hogy a peszticidek biodegradációja lényegében ismeretlen manapság, nemcsak Magyarországon, hanem még világviszonylatban is. A mi Intézetünkben, a Növényvédelmi Kutató Intézetben egy elsőrangú analitikai osztály működik, amely a jövőben valószínűleg szervezeti változások következtében éppen erre a kérdésre fogja aktivitását koncentrálni. A kutatási program arra keres feleletet, hogy a természetbe kikerülő peszticidek biodegradációja milyen módon, hogyan zajlik le, milyen módon lehetne esetleg irányítani a biodegradációt, hogyan lehet belenyúlni ezekbe a folyamatokba. Én nagyon köszönöm az osztályelnöki beszámolót, de különösen köszönöm a délelőtti összefoglalót, amelyet a Szegedi Biológiai Kutató Intézet terjesztett elénk, és optimista módon nézek az agrártudomány és a biológiai tudományok kapcsolatára.

Szeretném felhívni a figyelmet arra, hogy nem elegendő az, ha a biológia felelős tudományirányítói gyakorlati orientáltságúak. A gyakorlat fogadókészsége is alapvetően fontos. Erre tudománypolitikánk legfőbb vezetője hívta fel a figyelmet itt az Akadémián egy beszédben, amely megjelent a Magyar Tudományban is. Ebben nagyon érdekesen rámutatott arra, hogy az állami gazdaságok mennyire lanyhák a tudomány eredményeinek alkalmazásában. Felhozta példának azt, hogy az állami gazdaságok nagyszámú jogászt alkalmaznak, ezzel szemben viszont megdöbbentően kevés biológus dolgozik az állami gazdaságban. Pedig a mezőgazdasági nagyüzemeknek biológiailag jól képzett szakemberekre van elsősorban szükségük. Ezeknek a nagyüzemeknek, az állami gazdaságoknak is nyitni kell a biológiai tudományok, így természetesen az agrártudományok felé.

BIHARI ISTVÁN

Tisztelt Osztályülés! Hozzászólásom lényegét nem érinti, de kénytelen vagyok korrigálni Tigyi akadémikusnak azt a tájékoztatását, hogy a Biológiai Osztály kihelyezett ülése a Kőbányai Gyógyszergyárban került megrendezésre. A kihelyezett ülés ugyanis az Egyesült Gyógyszergyárban volt és mint annak igazgatója, én adtam tájékoztatást a gyógyszerkutatás néhány aktuális kérdéséről. Hozzászólásom lényegére térve megállapíthatom, hogy az elmúlt hónapokban már a különböző nem tudományos jellegű folyóiratok, sőt a napilapok egyik kedvenc témája lett a gyógyszerkutatás, és számos cikkben önmagukat szakértőnek tekintő újságírók tájékoztatják a nagyközönséget arról, hogy egy új gyógyszer kifejlesztése nemzetközi átlagban 8—10 évet — néha többet is — vesz igénybe és hogy a gyógyszerkutatás súlypontja egyre nagyobb mértékben a biológiai kutatások irányába tolódik el. Arról is tudomást szerezhetünk ezekből a cikkekből, hogy a magyar gyógyszerkutatásban szemléletváltásra van szükség, amennyiben az alapjába véve kémiacentrikus szemléletet a korszerű követelményeknek megfelelően, biológiacentrikus szemléletnek kell felváltania. Az egyik hetilapunkban a Heti Világgazdaságban figyelemmel kísérhettük Hidvégy Egon barátunknak a gyógyszerkutatás egyik eminens vezetőjével folytatott vitáját. Bár előre bocsátom, hogy sok mindenben egyetértek Hidvégy Egonnal, de elgondolkoztató az, hogy az ő következtetéseit végigvive eljuthatunk addig a kérdésig, hogy a gyógyszeripar mai vezetői egyáltalán képesek-e megérteni a gyógyszerkutatás mai „nyelvét". Szeretném leszögezni, hogy a gyógyszeripari vezetők képesek felfogni az irányváltás szükségességét és nemigen találunk közöttük olyanokat, akik ne hangoztatnák a biológia döntő szerepét a korszerű gyógyszerkutatás folyamatában. Ugyanakkor el kell ismerni, hogy a biológiának ez a növekvő szerepe a gyógyszerkutatásban még átütő módon nem érvényesül és igazak azok a megállapítások, hogy a hazai gyógyszerkutatás és a gyógyszergyárak irányításában személyileg sem tükröződik a biológia szerepének növekvő súlya. Ennek okai nyilvánvalóak: hiszen nehéz elvárni azoktól az emberektől, akik más szellemben nevelkedtek fel, akik egész életükben kémikusok voltak, hogy most egyszerre biológiai szemléletük legyen. Ezért, miközben elismerjük a biológia térhódítását a gyógyszerkutatásban, szakmai ismeretekkel elsősorban a kémia és nem a biológia területén rendelkezünk. Másrészt viszont nem nagyon kínálnak számunkra olyan kész embereket a tudomány berkeiből, akiket be lehetne ültetni a gyógyszerkutatás vezető pozícióiba, akik rögtön meghatározó szerephez jutnának, és így személyükön keresztül érvényesülne a gyógyszerkutatásban bekövetkezett változás.

Nagyon sokszor volt már szó erről, és úgy érzem, hogy itt is megrekedtünk az eszmecserék szintjén. Lassan az örökzöld témák kategóriájába került az ún. biológus probléma, és egyrészt a gyógyszeripar szemrehányást kap, mert

nem igényli a biológusokat, másrészt viszont a végzett biológusok egy része nehezen tud állást találni magának. Hallottuk a beszámolóban idézni tudománypolitikánk egyik vezető egyéniségének a szavait, aki joggal tette szóvá, hogy a mezőgazdaság sokkal nagyobb számban igényel jogászokat, mint biológusokat. Elgondolkoztató, hogy ez miért van így. Feltehetően többek között azért, mert túl komplikált jogrendszerünk következtében a mezőgazdaságnak és az iparnak nagyszámú jogászra van szüksége az *akut problémák* megoldása érdekében és mert közismerten újra pereskedő nemzet lettünk. Ugyanakkor fel kell vetni a kérdést, hogy képeznek-e ma az egyetemeken olyan biológusokat, akikre a mezőgazdaságnak és a gyógyszeriparnak a *jövő megalapozása* érdekében szükségük van. Úgy érzem, felelősséggel kijelenthetem, hogy ma az egyetemeken nem képeznek ilyen biológusokat, mert nem tekinthetők pl. ilyen feladatokra kiképzett embereknek azok a fiatal diplomások, akik a Műegyetemen biológus-vegyészmérnöki szakképzést kapnak. Ezek általában igen jól alkalmazhatók a fermentációs iparban, de nagyon kevéssé a gyógyszerkutatás biológia területein. Nyilvánvaló, hogy elsősorban a természettudományi karok feladata lenne az ilyen irányú biológusképzés, többek között a gyógyszeripar számára.

A beszélgetéseken túl azonban ebben a dologban konkrét lépés nemigen történt. El kell ismernünk ebben a gyógyszeripar felelősségét is, amely a biológusokra vonatkozó igényét túlságosan általános formában fogalmazza meg és a természettudományi karokon végzett biológusokkal nem sokat tud kezdeni, mert ezek az egyébként megfelelő színvonalú képzés mellett nem kapnak olyan gyakorlati célú oktatást, amely gyógyszeripari alkalmazásukat kézenfekvővé tenné. Úgy érzem — és ezzel megismétlem többször és több helyen hangoztatott véleményemet —, hogy a gyógyszeriparnak a jövőben igen nagy számú biológusra lesz szüksége, de a biológusok iránti igényt már az oktatásban meg kell alapozni és ez a megalapozás a Magyar Tudományos Akadémiának, a Művelődési Minisztériumnak és a gyógyszeriparnak közös feladata. Legutóbb a Biológiai Osztály ülésén dr. Gánti Tibor elvtársnak, a Biológiai Társaság főtitkárának beszámolója alapján vitattuk meg ezt a kérdést és megállapítottuk, hogy a természettudományi karokon folyó biológus oktatás keretében szükséges egy olyan szakosodás lehetőségét biztosítani, amely a gyógyszeripar igényeit veszi figyelembe és természetesen úgy, hogy az oktatás tematikájának kidolgozásában és az oktatás folyamatában is részt vegyenek a gyógyszeripar erre alkalmas szakemberei. Meggyőződésem, hogy ilyen feltételek megteremtésével a gyógyszeripar biológus igénye nagyobb lesz annál, mint amennyi biológus kiképzésére egyáltalán lehetőség van, Hozzá kell tegyem, hogy sok évtizedes beidegződések alapján a gyógyszeripar ma is nagy számban igényel gyógyszerészeket, miközben a gyógyszeripar mai technikai színvonalát és a kutatásban létrejött súlypont áttolódást figyelembe véve a gyógyszerészek szerepét nagy mértékben a vegyészmérnökök, vegyészek és

biológusok veszik át az egész világon. Bár a hagyományokat ezeken a területeken is nehéz áttörni, az áttörés egyik alapvető eszköze a gyárak és az oktatási intézmények között létrejövő kapcsolat. Közismert pl., hogy a gyógyszeripar és a Budapesti Műszaki Egyetem közötti kapcsolat több évtizedes hagyományokra épül, és ebben a kapcsolatban meghatározó szerepe volt annak, hogy a gyógyszeripar szakemberei, vezetői az egyetemi oktatásban is részt vesznek és ennek alapján már az egyetemi oktatás során személyes kapcsolat alakulhat ki az egyetemi hallgatók és az ipari szakemberek között. Így lehetőség nyílik arra, hogy a vegyészmérnök hallgatók egy része, akik esetleges érdeklődést tanúsítanak a szakma iránt, már II—III. éves korukban valamelyik gyógyszergyárhoz kötődnek. Megítélésem szerint tehát a biológusprobléma megoldásának folyamatát is az egyetemi oktatás keretében kell elindítani, és így lehetőség lesz arra, hogy nagy számban kerüljenek a gyógyszeriparba olyan biológusok, akik valamikor a gyógyszerkutatás vezető posztjait is képesek lesznek betölteni, másrészt az ipar részéről az egyetemi intézetekkel kialakult kapcsolatokban be tudják tölteni a receptor szerepét, vagyis a biológusok iránti igények és azok kielégítésének folyamatát természetes módon biztosítani.

Szeretnék még röviden szólni a beszámoló egyik témájához a környezetvédelemhez. Erről is megállapíthatjuk, hogy szintén a már említett folyóiratok és napilapok kedvenc témája lett és éppen az elmúlt hetekben volt alkalmunk az Élet és Irodalom hasábjain a Mezei kontra Mezey meglehetősen egyoldalú vitát végigélvezni. Az író a Balogh akadémikus és Nagy Bálint közötti vitában is megpróbál igazságot tenni, s miután kellőképpen kioktatja mind a kettőt, Mezey Barna a Chinoin vezérigazgatója ellen irányítja különösen élesre hegyezett tollát. Sajnos ezek a tájékoztatások általában meglehetősen egyoldalúak. Ezért szeretném elmondani, hogy az ipar — közte a gyógyszeripar — környezetvédelmi intézkedéseit sokszor éppen azok a hatóságok és szervek húzzák keresztül, amelyeknek a környezetvédelem az egyik fontos feladatuk. Jellemző példa erre a gyógyszeripari hulladék tárolás, illetve hulladék égetés kérdése, amellyel az Élet és Irodalom mellett az elmúlt hónapokban más újságok, valamint a rádió és a TV is több ízben foglalkoztak. A vádaskodások özönéből azonban nemigen lehetett kihallani a gyógyszergyárak hangját, amellyel bizonyítani igyekeztek, hogy az ötödik ötéves tervidőszakban a Környezetvédelmi Hivatal 80 millió forintos támogatásával és 240 millió forint saját hozzájárulással egy korszerű, teljesen zárt rendszerű hulladékégető létesítését tervezték. A realizálást azonban lehetetlenné tette, hogy a tanácsi szervek mereven elhárították a létesítéshez szükséges terület rendelkezésre bocsátását, annak ellenére, hogy részletes műszaki dokumentációval, valamint külföldi referencia utak biztosításával bizonyítottuk, hogy a tervezett berendezés levegő szennyező hatása kisebb, mint bármelyik lakótelep hőenergiaellátását biztosító gáztüzelésű kazáné. S miközben éveken keresztül folyt a vita, a

Chinoin fertőzte tovább — ha ugyan ő fertőzte — a váci kutakat, a 3-as műút közelében pedig változatlanul lobogtak a nyíltszíni hulladékégetés lángjai. Mindez azért, mert egyszerűen megakadályozták és lehetetlenné tették, hogy a gyógyszeripar meglehetősen szűkös fejlesztési alapjából 240 millió forintot nem termelési célra, hanem kifejezetten környezetvédelmi célokra el tudjon költeni.

Senki nem vonja kétségbe a környezetvédelem fontosságát, de ha az ilyen problémákat a jövőben meg akarjuk oldani, vigyáznunk kell arra, hogy a rosszul értelmezett környezetféltés ne akadályozhassa meg a környezetvédelmi intézkedéseket.

DAMJANOVICH SÁNDOR

Tisztelt Elnökség, Tisztelt Nyilvános Osztályülés! Legyen szabad ismételten, és gondolom, nem utoljára a délelőtti ülésre visszatérnem. A Szegedi Biológiai Kutató Központ délelőtti beszámolója világos példáját adta annak, hogy a szellemi koncentráció, a megfelelő felkészültség és kutatási hajlam, amellett nem utolsósorban a nemzetközi kapcsolatok és a hazai együttműködés, milyen kitűnő eredményeket szülhet relatíve rövid idő alatt.

Tíz év nagyon rövid idő, mégis méltán állíthatjuk, hogy ez a beszámoló minden szempontból magas nemzetközi szintet tükröz. Ugyanakkor rámutat arra is, hogy elsősorban azokat (és talán *csak* azokat) a kutatóhelyeket kell (vagy lenne szabad) támogatni, amelyek esetében a fenti kritériumok már legalább részben megvannak. Ha nincs megfelelő szellemi koncentráció, ha nincs meg az interdiszciplináris együttműködés, nincsenek jó hazai és nemzetközi kapcsolatok, a kutatás eleve reménytelen, mivel a biológia fejlődése rendkívüli módon felgyorsult.

A megfelelő kutatóhelyeket intenzíven kell fejleszteni, míg azokat a helyeket, ahol a kedvező feltételek hiányoznak, nem gazdaságos, sőt lehetetlen támogatni, miután kis ország vagyunk, és nem tudunk minden területen támogatást nyújtani.

Osztályelnökünk, Tigyi akadémikus beszámolója utalt rá, hogy a főtitkári alap keretén belül, pályázatok révén osztják el (az Akadémia Biológiai Osztályának véleménye alapján) azt a nem elhanyagolható, de volumenében mégis csak nem túl nagy összeget, amely rendelkezésre áll. Úgy gondolom, hogy ha ennek az elosztásakor a fenti kritériumokat továbbra is figyelembe veszik, akkor eredményesebben tudunk majd dolgozni. Természetesen az SZBK nagyságrendjét nem tudja produkálni talán egyetlen más magyar biológiai kutató központ sem, de ezt nem is lehet követelnünk.

Hozzászólásomban szeretném felhívni a figyelmet arra, hogy a Debreceni Orvostudományi Egyetem Elméleti Tömbjében ha az SZBK-hoz képest kisebb volumenben is, de négy intézet működik együtt úgy, hogy nem ismerünk diszciplínák közötti határokat. Miután a beszámolóban felszólítást kaptunk

arra, hogy ha valahol látunk új fejlődési irányokat, új profilokat kialakulni, arra is utaljunk, elmondhatom, hogy ez az együttműködés, ami itt kialakult, bizonyos mértékig új profilt képvisel, mert a sejtbiofizikai módszereken alapuló modern kutatáshoz, amely a genetikában, differenciálódásban, a sejtek populációs biológiájában rengeteg újat adhat, a feltételek nagy részét sikerült megteremteni.

A speciális, nagyteljesítményű berendezések egyedi ára esetenként meghaladja a 100 000 dollárt is, ami a mi viszonylatainkban, azt hiszem, hogy nagyon magas összeg. A másik tényező, amiért a DOTE Elméleti Tömbjében kialakult interdiszciplináris kutatás különleges perspektívát kaphat, az, hogy Debrecenben egy másik ugyancsak interdiszciplináris kutató egység van kialakulóban; rövidesen munkába fog állni az ATOMKI ciklotronja.

A ciklotron program az ország limitált erőforrásai miatt csak egy helyen valósítható meg, tehát ezt a helyet kell felhasználni arra, hogy mind az alap-, mind az alkalmazott biológiai kutatás területén nyújtott nagy lehetőségeket kiaknázzuk. Miután a ciklotron produktumainak a nagy része, időtényezők miatt helyhezkötött, ez még egy indok amellett, hogy biológiai kutató központot kell Debrecenben kialakítani.

A DOTE Elméleti Tömbjében már ma rendelkezésre állnak módszerek, amelyekkel pl. egy sejtet a másodperc milliomod része alatt lehet megvizsgálni, azaz másodpercenként több ezer sejtet lehet multiparaméteres analízisnek alávetni. Ennek jelentősége az állattenyésztésben, az orvostudományban, de mindenek előtt az alap biológiai kutatásban beláthatatlan.

Kötelességemnek éreztem ezeket az adatokat megemlíteni és felhívni a figyelmet arra, hogy ha a szegedihez hasonló jó eredményeket akarunk és várunk a közeljövőben, a közeljövő lehet öt, akár tíz év is, akkor arra kell törekedni, hogy a már kialakult és feltételeiben legalább részben adott helyeket próbáljuk támogatni mind erkölcsi, mind anyagi téren.

ELŐDI PÁL

Elnök Úr, Tisztelt Osztályülés! Úgy látszik, a délelőtti ülés olyan mély benyomást gyakorolt a hallgatóságra, hogy az eddigi hozzászólások többsége erre reflektál. Magam is a délelőtti ülés megnyitásakor elhangzott két megjegyzésből szeretnék kiindulni.

Tigyi akadémikus megnyitójában örvendetes ténynek tekintette a Szegedi Biológiai Központ létrehozását. Ez volt az Akadémia utolsó olyan nagy beruházása, amit még a gazdasági „kapuzárás" előtt teljes egészében, az eredeti terveknek megfelelően tető alá sikerült hozni. A gazdasági helyzet alakulása alapján nem kell jóstehetség annak megállapítására, hogy kisebb-nagyobb mértékű kapuzárás nem csupán a nagy beruházások területén, hanem egyebütt is várható. Egy bizonyos, a következő években — amennyire a

különféle információk alapján megítélhető — anyagi lehetőségeink semmiképpen sem fognak bővülni. Örömteli helyzetnek könyvelhetjük el, ha megközelítik azt a szintet, ahol a korábbiakban voltak. Az egyik kérdés, amiről beszélni szeretnék tehát, a rendelkezésre álló anyagiak optimális felhasználásának lehetőségei.

A másik kérdés, ugyancsak Tigyi akadémikus bevezető szavaira alludálva, az arányok kérdése. Azt mondotta ugyanis, hogy a szegedi intézet dolgozói a hazai biológiai kutatások 60—70%-át képviselik. Hadd tegyek egy becslést, még annak tudatában is, hogy becslésem bizonyára pontatlan. Ha Tigyi akadémikust elfogultnak tekintem, az alsó értéket, a 60%-ot fogadom el. Mondjuk azt, hogy a SzBK-ban dolgozik a hazai biológusok 20%-a (szerintem ez jócskán túlbecsült érték). Ez annyit jelent, hogy a szegedi 20% termeli a biológiai kutatások 60%-át, míg a fennmaradó 80%-nyi „egyéb" biológus mindössze 40%-ot. Az első csoport „hatásfoka" eszerint háromszoros (60 : 20 = 3), míg a másodiké mindössze félszeres (40:80 = 0,5).

Így a két csoport hatékonysága között hatszoros különbség van. De még akkor is, ha ez a különbség valójában kevesebb, az sem túl hízelgő a többségre. A tréfától eltekintve, adódik ebből a számolásból némi komolyan elgondolkoztató következtetés is, a kutatómunka *hatásfokának* problémája, ami lényegében szorosan kapcsolódik az előbbi kérdéssel, a kutatómunka rendelkezésére álló, várhatóan szűkülő gazdasági alapokkal.

A két kérdés, meggyőződésem szerint, az Akadémia tevékenységének egyik alapvető problémája, mert szorosan összefügg a tudományszervezéssel, így tudományos jövőnk szempontjából mindenképpen megfontolandó kérdéskomplexusról van szó. Nyilvánvalóan csak elismeréssel gondolhatunk arra, hogy kormányzatunk milyen jelentékeny összeget fordít kutatásra, jóllehet mindnyájan a szűkös keretekre panaszkodunk. Dehát csak abból tudunk kiadni, amit bevettünk, és bevételünk igazán nem mondható túlságosan gazdagnak. Még soha sem hallottam kollégáimat arról panaszkodni, hogy intézetüknek túl sok a pénze. Lényegében, a felhasználható összeget a költségvetés határozza meg, és ezen mi aligha tudunk változtatni.

Van azonban néhány körülmény, amelyek a valóságos szegénységünket még inkább elmélyíti. Ha Marcus Portius Cato ma köztünk élne, bizonyára nem elsősorban Kartago elpusztítását emlegetné unos-untalan, hanem nehézkes beszerzési lehetőségeinket. Érdemes lenne egyszer megvizsgálni, hogy a jelenlegi helyzetben mennyi pénz vész kárba azért, mert a laboratóriumok vegyszerben, eszközökben kénytelenek magukat túlbiztosítani és a szükségesnél esetenként jóval nagyobb mennyiségeket rendelni, a munka folyamatosságának biztosítása érdekében. Ez a helyzet, érzésem szerint, legalább 15—20%-kal csökkenti a rendelkezésre álló anyagiak felhasználásának hatékonyságát.

Van azonban belső szervezetlenség is, ahol a hibaforrás nem rajtunk kívül, hanem bennünk van. Több mint 10 éve vagyok a Biokémiai Bizottság

elnöke, de az elmúlt évtől eltekintve csak arra volt módom, hogy hivatalosan a hazai biokémiai kutatásnak csupán kis részletébe tekinthessek be. Idén — véletlen folytán — volt lehetőségem arra először, hogy 60—70 témát áttekintsek, lássam az elmúlt periódusról szóló beszámolókat és elolvassam a következő öt évre készített terveket. Ha igen jóindulatúan becsülök, az áttekintett munkáknak legalább 30%-a olyan, amelyet nyugodt lelkiismerettel lehet *nem megfelelőnek* minősíteni. Ezeket vagy azért nem érdemes kutatni, mert a kérdés feltevés nem jó, vagy hiányoznak megfelelő anyagi és személyi feltételek, vagy azért nem, mert az országban másutt jobban csinálják. Következésképpen, a tudományirányító szerveknek az lenne a feladata, hogy az indokolatlan munkákat megszüntessék. Bedugaszolják azokat a csatornákat, amelyeken az ilyen munkákra fordított pénz elfolyik és többet juttasson olyan kutatóhelyekre, ahol a pénz felhasználása több eredménnyel kecsegtet.

Az elmúlt évtizedekben harcot folytattunk a kapitalizmus ellen, de egy kicsit elfeledkeztünk arról, hogy a feudalizmus is volt hazánkban, és maradványai még ma is fellelhetők. Furcsa módon a tudományban ezek olykor elég markáns vonásokkal jelentkeznek. Egyik ilyen vonást — magamban, egyéni használatra — úgy szoktam emlegetni, hogy minden kiskakasnak legyen meg a saját szemétdombja (akár szellemi, akár a felszerelésre vonatkozó dombról van szó). Kollégáink egyike-másika túlzottan óvja „saját" műszerét, csak őt megillető privilégiumnak tartja módszereit, monopóliumnak a kutatási témáját. Vannak ilyenek szép számmal, de talán ez nem általános jelenség. Éppen a munkánk eredményességének fokozása követelné meg a nagyobb nyíltságot, a kölcsönös szakmai támogatást, a műszerek jobb kihasználásának a lehetővé tételét.

Nem kedvelem, de nem is tudom teljes szívvel elítélni azokat a kollégákat, akik ennyire őrzik dombocskájukat. Ugyanis megtalálható a tudományirányítással foglalkozó egyes főhatóságok körében is — elnézést kérek, hogy nem jut eszembe jobb kifejezés — a "Saját szemétdomb komplexus". Ez különösen jól megfigyelhető a biokémiai kutatással kapcsolatban, mert jó néhány főhatósághoz tartozó intézetben folyik biokémiai jellegű munka. Az ésszerű az lenne, ha ezeket teljes szélességükben át lehetne tekinteni, szakmai szempontok alapján meg lehetne vitatni, esetleg tanácsot adni ott, ahol szükséges. Ezzel egyidejűleg a felesleges párhuzamosságok egy részét is meg lehetne szüntetni. A főhatóság azonban inkább átfesti a táblát, a kérdéses témát valamilyen fedőszóval teszi az illetéktelenek számára felismerhetetlenné.

Hadd hivatkozzam saját példámra. Mióta a szakmában vagyok, lényegében enzimek szerkezetével és működésével foglalkozom. Mindaddig azt hittem, hogy ezt csinálom, míg egy borús reggelen egy hivatalos írás arról értesített, hogy én tulajdonképpen nedvkeringéssel foglalkozom. Főhatóságom keretein belül ugyanis volt nedvkeringés-dombocska, ami — úgy vélem —

valami fajta feudális maradványnak köszönhető: saját témám, én keretem, magam területe. Pedig ilyen vonatkozásban ebben az országban semmi sincs, ami valóban *saját* lenne, akár az intézetekben, akár a főhatóságok keretein belül.

Egy másik, munkánk hatékonyságával rendkívül szorosan összefüggő kérdés az, amire felszólalásában Bihari István, az EGYT igazgatója hívta fel a figyelmet, a *képzés* problémája. Az ember a legnagyobb érték, amivel gazdálkodnunk kell, így nem közömbös, hogy fiatal embereket mire és hogyan képezünk ki, hányat teszünk alkalmassá valamilyen pályán való működésre és milyen színvonalon lesznek majd alkalmasak valamilyen pályán tevékenységüket kifejteni. E területen van sok jó példa, de nem kevés az elrettentő sem. Néhány éve elkezdtünk műszaki tanárokat képezni és kiderült, hogy szinte senkinek sem kellenek. De van fordított példa is, vannak szakterületek, amikre igen határozott társadalmi igény van, de megfelelő képzés nincs. Az egyetemi képzés reformja valamikor 1948—49-ben kezdődött, és kisebb-nagyobb lélegzetvételi szakaszokkal még ma is tart. Jogos igény, hogy a képzést állandóan reformálni kell, az azonban nem mindegy, hogyan. Oktatásunk egy része sok tekintetben nem felel meg a társadalom igényeinek, követelményeinek, kiképzünk embereket, akik szaktudásukkal alig-alig tudnak beilleszkedni, viszont nem kevés azon magas képzettséget igénylő munkahelyek száma, amit nem megfelelő képzettségű munkaerő tölt be.

A Biokémiai Bizottság most készít elő egy anyagot, aminek hozzávetőleges címe az, hogy a klinikai biokémia helyzete és problémái. Az anyagot az Orvosi és Biológiai Osztályok közösen állították össze. Az egyik fő probléma ezen a területen — ezt a klinikus kollégák vetették fel —, hogy az országon belül a klinikai laboratóriumok szakmai színvonala igen alacsony. Ennek több oka van. Az egyik minden bizonnyal az, hogy tanulmányai során az orvostanhallgató valójában nem kap megfelelő laboratóriumi alapképzést. Az orvostudomány jelenlegi fejlettségi állapotában — ez világszerte így van — rendkívül jelentékeny, akár a diagnózis megállapítása, akár a terápia eredményességének konktrollja szempontjából az a munka, amit a laboratóriumi orvos végez. Köztudott emellett, hogy a laboratóriumi orvosok presztízse (értsd: jövedelme?) nem tartozik a kiemelkedők közé. Általában nagyon laza kapcsolatot tart fenn a gyógyító osztályokkal. Indulásakor rendszeresen kurzuson, kiképzési programban nem vesz részt. Nem csoda, ha ezen a területen eléggé erősen érvényesül a kontraszelekció. Ez azonban a kérdésnek csak egyik oldala, a másik a következő. Tegyük fel, hogy a laboratórium kiválóan dolgozik, igen modern módszerekkel, alapos szaktudással jó információkat szolgáltat az osztályoknak. Az osztályokon azonban, tisztelet a kevés kivételnek, nem tudják, hogy mit kezdjenek a laboratóriumi adatokkal, sőt sokszor azt sem tudják, hogy milyen vizsgálatokat kérjenek. Nem értik, hogy mit jelentenek a laboratóriumi eredmények. Így ezeket mellékelik a kórlap többi dokumen-

tumaihoz, és minden rendben van. Ez azonban csak egy példa, hasonlókat számos más területről, iparból, mezőgazdaságból és egyéb helyekről is hozhatnánk.

Hozzászólásomban tulajdonképpen egy problémát feszegettem, a *hatásfok* kérdését, ami napjainkban nem csupán a tudomány területén, de mindennapi életünk számos egyéb összefüggésében is központi probléma, s talán nem túlzás, ha azt mondom, hogy a jövőt figyelembe véve, létkérdés. Néhány példával szerettem volna rámutatni arra, hogy nem kevés olyan terület van, ahol különösebb anyagi ráfordítás nélkül, pusztán a meglevő lehetőségek jobb, szervezettebb, megfontoltabb felhasználásával olykor jelentősen tudnánk a helyzetet javítani. A céltudatosabb szakemberképzés, az anyagi feltételek szervezettebb biztosítása, a tudományszervezés célkitűzéseinek fokozottabb érvényesítése, a meglevő lehetőségeink jobb kihasználása elsősorban figyelmet, szervezést, határozottságot, tervszerűséget kíván meg. Ezek nem kerülnek pénzbe, viszont sokat lendíthetnek a kutatómunka eredményességén és az eredmények helyes népgazdasági alkalmazásában.

TERPÓ ANDRÁS

Tisztelt Elnökség, Tisztelt Osztályülés! 1. Először ahhoz a felmerült problémához szeretnék hozzászólni, amelyik a biológusoknak az agrárterületen történő alkalmazásával foglalkozik. Főleg azért, mert mi is agrárintézmény vagyunk, és nem is kis számú hasonló intézmény tartozik a MÉM-hez. Ez összesen mintegy 7 *növénytani* és *növényélettani* tanszéket jelent. Azonkívül a biológiai képzés bázisainak is tekinthetjük a MÉM-hez tartozó egyetemek nemesítési, genetikai, növényvédelmi, ill. növénykórtani, állattani szervezeti egységeket, valamint a MÉM-hez tartozó kutatóintézeteket. A szakmai biológiai műveltség elsajátításával kapcsolatban azt szeretném megjegyezni, hogy az itt működő növénytani, növényélettani tanszékeknek majdnem mindenütt tudományegyetemet végzett biológus vezetői, professzorai vannak. Több hasonló végzettségű fiatal is dolgozik ezekben az intézményekben. Lehetséges, hogy hatékonyabban lehetne művelni a biológiai kutatásokat és a biológiai képzést is, még magasabb szintű szervezéssel és irányítással. Már csak azért is, mert nem kis létszámról, gondolom nem csekély anyagiakról van szó.

Ebből kiindulva eljutunk ahhoz a kérdéshez is, hogy vajon kellenek-e tudományegyetemet végzett biológusok az agrárterületekre, vagy pedig elegendők azok, akiket az agrárfőiskolákon képeznek. Természetesen az agrárfőiskolákon, ill. egyetemeken biológusokat nem képeznek, de a következő megjegyzésem volna: ahogy vannak kémikusok és vegyészmérnökök, úgy talán létezhetnek biológusok és analóg biomérnökök is. (Nevezzük őket talán biotechnikusoknak?). Úgy gondolom, hogy az agrárterületen dolgozó szakemberek

jelentős része mégis csak biomérnöknek fogható fel. Ezért kissé szélsőségesnek gondolom azt a megfogalmazást, hogy az agrár területeken nem kívánnak biológust alkalmazni, vagy hogy nagyon csekély ott a számuk.

Természetesen egy tudományegyetemet végzett (szakosodás nélküli) növénybiológust egy állami gazdaságban közvetlenül munkába állítani aligha lehet. A MÉM kutatási és oktatási intézményeiben, már tág tere van az említett típusú szakemberek alkalmazásának.

2. A határterületi együttműködést tovább lehet, és én szerintem tovább is kell bővíteni. Erre egyébként a magyarországi gyakorlatban is számos nagyon jó példát találunk.

3. Itt szeretnék olyan kérdés vitájához kapcsolódni, ami ezt az együttműködésen alapuló kutatást még jobban megalapozhatná. A botanika tudományterülete már régóta és nagyon sok eredményt szállított az agrártudományok, ill. közvetlenül a növénytermesztés számára is. Csak egy nagyon egyszerű problémát szeretnék ez alkalommal felvetni; pl. a növények *terjedésének* kutatását. A növények migrációja ma sem állt le. Újabb és újabb fajok jelennek meg szinte minden művelt területen; sőt a természetes vegetációba is behatolnak (pl. Solidago fajok). Hozzánk a szomszéd országokból és más földrészről jutnak el. Egy részük nem is veszélytelen a mezőgazdaság, kertészet (zöldterületek is), erdészet számára. Nagyon komoly összegeket emészt fel a kemizálásnak is az a része, amelyet az éppen így behatoló növények irtására fordítunk. Sajnos, az elmúlt évtizedekben, alig hasznosították a botanikusoknak, a behatoló növények jelzésével, pontos faji és termőhelyi leírásával foglalkozó cikkeit — *előrejelzéseit*. Az utóbbi években az ezen a téren mutatkozó gyors előrehaladás (a növényvédelmi szolgálat jó megszervezése) szintén a biológusok és a biomérnökök együttműködésének jó példája.

Szinte nincs olyan esztendő, amikor egy-egy új növényfaj ne lepne meg bennünket. Sokan ismerik a botanikusok közül is, hogy a fenyércirok *(Sorghum halepense)* milyen agresszív növény. Sajnos az ország déli területein mind a kukorica, mind a búzatáblákban is jelentékeny károkat okoz.

Nem olyan rég sikerült tisztáznunk néhány éves kutató munka árán egy új vadzab fajnak a megjelenését. Ezt a fajt (*Avena sterilis* ssp. *ludoviciana)* őszi vagy téli vadzabnak nevezhetnénk magyarul: a mediterránból érkezett. Az említett faj terjedésének, biológiájának kutatása és az eredmények hasznosítása szemléltetően bizonyítja, hogy tág tere van ma is az együttműködésnek. Érdemes *érzékenyebbnek* lennünk más tudományterületek eredményeire.

4. A beszámoló rendkívül gazdag és tartalmas volt. A következőkben a külföldi tapasztalatok átvételének módjához szeretnék hozzászólni.

Különféle tapasztalatokat vagy szemléleti módokat vehetünk át külföldről. Pl. mostanában eléggé elterjedt egy korábbi nyugatról származó felfogás, miszerint a vegyszeres gyomirtás hatására ellenálló fajok jönnek létre;

ellenálló populáció keletkezik. A fiziológusok, ökológusok, de különösen a nemesítők tudják, hogy egyes fajpopulációk milyen változékonyak. Itt érdemes hangsúlyozni azt is, hogy a fajok legalább annyira változékonyak ökológiai, fiziológiai vagy biokémiai adottságaikban, mint a túlhangsúlyozott *morfológiai jellegeikben.* Túlzottan félrevezető, amikor a meglevő, eddig általunk figyelmen kívül hagyott, öko-, bio- vagy egyéb típusokat új ellenálló rasszoknak, netán, fajoknak nevezzük. Ez a felfogás rendkívül torz képet nyújt a faji szerveződési szintről (különösen a gyomnövényeknél), amikor az egyik oldalon megengedi a változékonyságot, másik oldalon pedig csak a kemizálás hatására lehetséges (azonnal keletkezett) változékonyság.

Megjósolhatom, hogy ezek az ellenálló populációk számos új gyomnövénynél „*ki fognak alakulni*", be fognak sorba vonulni a növénykultúrákba. Ennek a toleranciának vagy éppen az érzékenységnek, ugyanúgy meg kell lennie a legtöbb növényfajban (amelyek természetesen nem szűk ökológiai amplitúdóval rendelkeznek).

5. Végül a környezetvédelem kérdéséhez szeretnék hozzászólni. Valóban nagyon helyesnek tartom a beszámolóban felvetetteket, hogy kellő józansággal kell megítélnünk a helyzetet, az intézkedéseket, a lehetőségeket. A felmerült vitákban is kellő józanságot kell mindenképpen, minden vitázó fél részéről tanúsítani. Csak akkor tudunk használni a tudományos kutatásnak és különösen a gyakran és érzékenyen reagáló társadalmi megnyilvánulásoknak. A környezetvédelmet sértő cselekmények során az ipari, mezőgazdasági termelés részéről gyakorolt károsító hatáson kívül, mind jobban előtérbe kerül a *biológiai* szennyeződés értékelése is.

Ez a felvetésem kapcsolódik az általam előbb elmondottakhoz is. Ott ugyanis arról volt szó, hogy egyre több agresszív növény támadja a növényi kultúrákat. A behurcolt, behatolt (adventív) lágy szárú és fás gyomok a védett területek számára is legalább annyira veszélyesek, mint a növénytermesztésben. Védett területeinkre is egyre-másra behatolnak ezek az agresszív növények és nem kellemes helyzetbe kerülünk akkor, amikor a nemzeti parkokban vagy egyéb védett területeinkben (mint a Harsány-hegyen) az Ailanthus irtását kell elvégezni. Ez a probléma, úgy látszik, általánossá válik és nagyon érdekesen jelentkezik a városokban is. Veszélyességét növeli az a tény is, hogy az említett növénycsoport több tagja mérgező növény, sok közülük pl. allergiát vált ki.

6. A beszámolóban szerepelt a Vácrátóti B. Intézetnek a feladata, a budapesti agglomeráció botanikai kutatásában. Ezzel kapcsolatban a növények felhasználásával (zöldterületek, növénycsoportok stb.) végzett aktív környezetvédelmi munkára szeretném ráirányítani a figyelmet. Aktív környezetvédelem alá sorolom a növénytelepítési eljárásokat, amelyet egyrészt a szennyezés csökkentése, másrészt a települések esztétikai értékének növelése érdekében végeznek. Ide sorolom azt a tevékenységet is, amelyet a kihelyezett nö-

vényanyagnak a megmentése (védettség is!) vagy a zöldterületeknek megtartásáért is végeznek. Nem kis harcot jelent és számtalanszor társadalmi vitává is alakul egy-egy zöldterületnek a szűkítése vagy szanálása (a Déli pályaudvar átépítése és a Vérmező szűkítése stb.). Általában a városaink belső területén visszaszorul a zöldfelület.

A különböző kőedényekben kihelyezett növények inkább csak esztétikai értéket jelentenek, de azt is csak akkor, ha gondozzák őket.

A városok környezetvédelmi problémáinak fejlesztésekor, amelyeket zöldterület létesítésével végzünk, mindig figyelemmel kell kísérnünk a növények alapvető igényeit. Ezek közül legfontosabbnak tartom a *vízellátás* problémáját. A teljes vízlevezetés (csatornázás) az aszfalt és betonburkolatok vízmentessé teszik a fák gyökérszféráját. Ezért rendszerint *víz hiányában* száradnak, pusztulnak el ezek a fás növények. Ez lehet az egyik legnagyobb tűrési problémája a városi növényzetnek.

Ma már Európa-szerte eléggé tisztázták, hogy mely fajok alkalmasak a városi zöldterületek létesítésére. Inkább csak az jelent nehézséget, hogy ezeket a növényeket, kellő mennyiségben és minőségben elő is kellene állítani.

7. Hozzászólásom utolsó gondolatköre — vajon érdemes-e vigyáznunk városaink, falvaink, üdülőterületeink *tájjellegére*. Befejezésül szerettem volna környezetvédelmi szempontból ezt felvetni, mert még a felvetése is teljesen mellőzött Magyarországon. Előzetesen egy példával szeretnék előhozakodni. Sokan jártak már Önök közül Olaszországban. Olaszország zöld területeinek tájjellegét a *ciprusok*, *cédrusok*, pálmák, keleti ostorfa, ernyő fenyő stb. adják meg. Az említett növényeket telepítették a feltárt romok, a szép műemlékek köré, utak mentén és parkokba. Ismeretes, hogy sem a cédrusok, sem a ciprus nem honos Olaszországban, az is igaz, hogy a mediterrán tájnövényei. Az említett mediterrán jellegének összhatása nem kis mértékben járul hozzá az említett területek esztétikai értékeinek növeléséhez is. Nemcsak a helyi lakosság számára teszi elfogadhatóbbá a környezetet, hanem a rendkívül jelentős *idegenforgalom* szempontjából is. Ami rendkívül komoly anyagi bevételi forrás egy ország számára.

A mi országunkban is érdemes úgy értelmezni a környezetvédelmi munka fejlesztését, hogy ne kozmopolita egyveleggé váljanak a parkjaink, üdülőterületeink, különösen olyan területek, mint akár a Duna-kanyar vagy akár a Balaton mente, hanem tegyük olyanná, amilyen a természetes tájnak legjobban megfelel. Nem csekély azoknak szubmediterrán, balkáni fás növényeknek a száma, amelyek száz vagy több száz év óta meghonosodtak (pl. orgona, vadgesztenye, törökmogyoró, judásfa). Néhány hazai (ezüsthárs, cserszömörce, csertölgy, molyhos tölgy, virágos kőris, húsos som, szelídgesztenye, stb.) és több újabban honosított, főleg fás szárú növény nagyobb arányú elszaporításával, mi is jelentősen növelhetnénk zöldterületeink, üdülőtájaink esztétikai vegetáció-genetikai értékét és vonzó erejét. Mindez viszonylag

gyorsan megvalósítható lenne a botanika és a gyakorlati szakemberek vélemény egyeztetésével, szorosabb, tervszerűbb összefogásával. Köszönöm a szíves figyelmüket.

RAKONCZAY ZOLTÁN

Tisztelt Osztályülés! Teljesen egyetértek az elnöki beszámoló azon részével, amelyik az Országos Környezet- és Természetvédelmi Hivatal, valamint az osztály munkáját harmonikusnak ítélte meg. Közöttünk kb. 10 éve semmiféle nézeteltérés, vita nincs még annyi se, amennyi elképzelhető lehetne, vagy „elvárható" lenne. Szinte gyanús az egyetértésnek ez a foka. Talán az osztályon meg a hivatalon belül több nézeteltérés van, mint közöttünk. Ennek szervezetileg a végterméke az a bizottság, amelyet a közelmúltban közösen életre hívtunk: ez az Akadémia Biológiai Tudományok Osztálya mellett működő Természetvédelmi Bizottság. Abban már korábban megegyeztünk, hogy azokat a dolgokat nem kutatjuk, amelyek a józan ész kategóriába tartoznak, azt csináljuk, vagy megpróbáljuk csinálni. Viszont vannak olyan dolgok, amelyeket szeretnénk a Bizottsággal vagy másokkal megcsináltatni. Kettőt mondok ebből. Aki a témában járatos, tudja, hogyha valamilyen növény vagy állat, a kipusztulás szélére ért, akkor védelem alá helyeztük, vagy helyezzük folyamatosan, de azt, hogy milyen egyedszámúnak kell lennie egy populációnak, hogy még megmaradjon az a faj, azt még nem mondta meg nekünk senki. Tehát védjük az állatokat, védjük a növényeket, de a kívülről jött támadásokat sokszor nem tudjuk elhárítani, mert néha talán azt is védjük, amit még nem kellene, mert nincs a pusztulás szélén. Még egyszer mondom, nem azt akarom, hogy várjuk meg, amíg csak két pár van belőle, de lehet, hogy 2000 pár még elegendő ahhoz, hogy ne kelljen nagyon védeni. Mert csak akkor tudunk komolyan védekezni, ha azokban a növényekben, állatokban engedünk, ahol még engedhetünk. Sokan mondják, hogy ha mindent védünk, akkor tulajdonképpen semmit sem védünk. Ez igaz is. Egy másik példa: abban is egyetértünk mindenkivel, hogy a természetszerű erdő tetszik nekünk legjobban, ez a természetvédelem a mozgásterülete. Egy mesterséges erdő, amiben a fák sorban állnak és nincs benne pókháló, hangya, lágyszárú növényzet: az statisztikailag erdő, ökológiailag azonban nem. Ezzel teljesen egyetért velem mindenki, de azt, hogy hol kezdődik a természetes erdő, és hol a mesterséges, mennyi természetszerű erdő van még Magyarországon, és mennyit kell abból fenntartani, hogy a génrezerváció feladatainak eleget tegyünk, nem tudjuk még megállapítani. Keresztesi akadémikus szerint most Magyarországon 30%-a az erdőknek a természetszerű és ez rohamosan fogy. Tehát ezeken a területeken kérünk az osztálytól, a tudománytól segítséget.

A harmadik gondolat, amit szeretnék itt elmondani az, amit az osztályelnök a sajtóval kapcsolatban említett a beszámolójában. Az a vita, ami most 1—2 témakörben, elsősorban a kemizálás, a környezetvédelem, a

természetvédelem témakörében a sajtóban lezajlik, itt-ott már aggasztó kezd lenni. Azok a jelzők amelyeket én hallottam (demagóg meg silány), itt-ott már dicséret számban is elmennek. Szakemberek, akik bizonyos témakörben elismert szakemberek, annyira tájékozatlanok más témakörben, hogy az általuk leírt vagy mondott dolgok egyszerűen megdöbbentik az embert. Én itt nem a újságírókat marasztalnám el. Itt nem az újságírók dobták el a súlykot, mert a cikkek egy részét szakemberek írták, vagy riportalanyként mondták ezeket. Nem akarom dicsérni az újságírókat, mert nekik is megvan a maguk hibája, de a leggorombább cikkek nem az újságírók tollából jelennek meg, hanem maguk a szakemberek nyilatkozták vagy írták ezeket. Ezért szűkebb körben kellene lefolytatni a vitákat, és utána kimenni a nagyközönség elé. Köszönöm szépen.

BALOGH JÁNOS

Tisztelt Elnök Úr! Tisztelt Osztályülés! Az osztályelnöki beszámoló minden fontos kérdést felölelt és messze előre pillantva tekintette át soronlevő feladatainkat Az egyes tudományterületeket arányosan mutatta be, így valószínűleg kielégítette az arányokra érzékeny kutatótársaink igényeit is. Elismerés illeti meg a hozzászólók nagy részét is, mert sok eredeti és érdekes szempontot érintettek a vita során Ilyenformán a vita jónak és lezártnak mondható. Mégis van egy pont, amely hozzászólásra késztet: ez a sajtó vitába vonása.

Ismeretes, hogy a magyar sajtó — napilapok, hetilapok egyaránt — az utóbbi időben gyakran foglalkozott környezetvédelmi kérdésekkel; nemegyszer bíráló hangon is Az osztályülésen elhangzott bíráló felszólalások ezeknek az írásoknak csupán a negatív vonásait igyekeztek felsorakoztatni. Beszéltek a cikkek hibáiról; gyakran sajtóhiba-nagyságrendűekről is — de ugyanakkor hallgattak arról, hogy ezek a cikkek jószándékúak, előremutatóak, és egy sereg tény nyílt feltárásával segítségére vannak mind a tudománynak, mind a népgazdaságnak.

Nem hiszem, hogy Mezei András költőnek és publicistának szüksége volna arra, hogy ezen a helyen megvédje egy ökológus. Mégis el kell mondanom: hasznos, hogy ma ökológiai tárgyú versek jelennek meg irodalmi folyóiratokban. Hasznos, hogy publicistáink, íróink szenvedélyes hangú cikkekben ostorozzák a felelőtlen környezetszennyezőket. Szükséges, hogy végre egyszer helyettünk valaki megmondja: politikusaink, termelésben dolgozó, vezetőszintű szakembereink egy részének biológiai és ökológiai tájékozottsága, műveltsége — enyhén szólva — nem kielégítő. Ilyen és ehhez hasonló, rengeteg segítő anyag van azokban a cikkekben, amelyeket ebben a vitában csak bíráltak — de nem méltattak.

Tisztelettel javasolom a Biológiai Osztálynak, az egész Magyar Tudományos Akadémiának: ne féljen a sajtótól. Ne foglaljon el negatív, elutasító

álláspontot hasonló, alapjában véve építő szándékú sajtóvitákkal szemben, mert nem jó az, ha a tudomány vezető fóruma konzervatív olyan kérdésekben, amelynek sok vonatkozásban kényes, de előremutató, s bizony nagyon meggondolandó részletei vannak.

Végül szeretnék arra emlékeztetni, hogy amikor a Bajkál-tóban veszélyes szennyeződés jelentkezett, szintén író, Solohov emelte fel a szavát. Tudomásom szerint nem haragudtak meg rá az akadémikusok; a kormányzat pedig nem úgy vetette fel a kérdést, hogy a Bajkál-tó mentén ennyi meg ennyi cellulóze termelését kell biztosítani, hanem hogy a Bajkál-tó tisztaságát minden áron meg kell őrizni. Az ökológusok ma már elfogadható pontossággal meg tudják mondani: milyen eljárások szükségesek egy tó, egy folyam tisztaságának visszaállításához és megóvásához. A feladat sikeres elvégzéséhez azonban már nem tudományos, hanem népgazdasági döntések szükségesek. Ezeknek kialakításához ökológusnak, írónak, közgazdásznak, politikusnak joga, sőt kötelessége véleményével hozzájárulni!

Befejezésül ismételten hangsúlyozom, hogy a környezetvédelemben a sajtó segítsége mindaddig nélkülözhetetlen, amíg olyan esetek fordulnak elő, mint a váci vízszennyezés vagy az aggteleki barlang vízrendszerének szennyvízzel való veszélyeztetése. Ezeket az eseteket a szakembereknek kell ugyan feltárni, de a közvélemény felrázása, a vétkesek kipellengérezése továbbra is a sajtó feladata marad.

[TÓTH TIBOR]

Tisztelt Elnökség, Tisztelt Hallgatóság! Az idő előrehaladottságára való tekintettel nagyon röviden szeretném a számomra igen tanulságos osztályelnöki beszámolóból visszaidézni az Osztály fokozottabb szerepére vonatkozó utalást a népszerűsítés területén. Itt számos tudományág részéről hangzottak el azok az értékes, számomra szintén tanulságos véleménynyilvánítások, amelyek azonban nem vonatkoznak ugyanúgy a mi tudományágunk területére. Nevezetesen nem arról van szó a mi relációnkban, hogy az újságírók meggondoltak-e vagy nem meggondoltak, elővigyázatosak-e vagy nem elővigyázatosak, hanem arról, hogy van a harmadik változat, amikor sem az újságíró, sem a szakember nem hibás. A szakember a kellő tapasztalat követelményét véve figyelembe még sok-sok éves tevékenység után is tartózkodik a népszerűsítéstől. A harmadik változat az, amikor nem hozzáértő, kevés tapasztalattal, kevés szakmai tevékenységgel rendelkező (mert perifériás területen dolgozó!) egyén ír valamelyik tudományág problémaköréről, pl. az ember származásáról. Ez az a változat, amely gondolom, hogy (szabad legyen felt ételeznem) igen tisztelt Osztályelnökünk átfogó fogalmazásában szintén benne foglaltatik, hogy ti. az utóbbi öt évben mind az ember fejlődésére, mind az ember származására, mind a Földön élő népességre vonatkozó kisebb-nagyobb tanulmányok vagy nagyterjedelmű több száz oldalas monográfiák

jelentek meg, amelyek esetében egyébként ugyan nem vonható kétségbe a jóhiszeműség az adott szerzőknél, azonban náluk (még egyszer hangsúlyozom) nincs meg a kellő elővigyázatosság az adott konkrétumokban, nincs meg a kellő tapasztalat és így természetesen fennáll az eredmények torzult bemutatásának, a dezinformálásnak a veszélye.

Egyáltalán nem mindegy az, hogy a kiadók 30 000-es példányszámban — lényeges hiányosságok miatt torzult tartalmú — kis, 100 oldalas vagy 800 oldalas munkákat a társadalom elé hoznak egyébként megfelelően modern tipográfiai szinten, amelyeket azonban nemcsak a vásárlója és annak rokonsága olvas el, hanem bizonyos centrális, tehát könyvtári relációkban pl. további félmillió érdeklődő. Az ilyen torzult tartalmú könyvekből a jóhiszemű olvasó végeredményben dezinformálódik. Határtalan érdeklődéssel veszi kezébe a pompás kivitelű alkotást, de nyilván nem tudja azt, hogy milyen hibákkal van tele. Itt szó volt arról, hogy a kellő lektorálásnak gyakran egyszerűen nincs nyoma. Bár minden tiszteletem nemcsak a biológiát gondozó, hanem minden más természet- és társadalomtudományi kiadói munkakör iránt, mégis a biológiai tanulmányokat nem lehet nagyon jó felkészültségű, de más irányú népszerűsítésben pl. 30 éves tapasztalattal rendelkező szakértővel lektoráltatni. Ez, úgy gondolom, általános érvényű s tehát az embertanos sem képes lektorálni egy fizikai tárgykörű munkát. Remélhetően nem az a fő érdek, hogy népszerűsítés legyen, mindenáron. Hogyha egy olyan konkrét veszély adva van, mint amire itt utaltam (a jóhiszemű emberek dezinformálása), az legalább olyan kártétel, mint az egyéb defaktó környezetszennyezés. A szellemi „szennyezés"-től valóban tartózkodni kellene. Úgy gondolom, hogy ehhez az osztályelnöki beszámoló vonatkozó utalásai nagyon fontosak, és remélhetően ezek a szándékok effektíve fognak megnyilvánulni az Osztály közeli jövőben várható tevékenységében. — Köszönöm szépen.

TIGYI JÓZSEF

Tisztelt Osztályülés! Ilyenkor az osztályelnöknek az összefoglalója csak akkor lehet jó, ha nagyon rövid. Én nagyon köszönöm a hozzászólásokat, mert valóban kiegészítették a referátumot és több új szempontot adtak. A tény, hogy a 9 hozzászóló közül 5 a környezetvédelemmel foglalkozott, azt mutatja, hogy a környezetvédelem problémáját valóban az osztály tagjai, a biológusok komolyan veszik. Én azt hiszem, hogy ebben a kérdésben először is egyet értek Balogh Jánossal és nem érzem azt, hogy a referátumban előadott kritikámat ő tovább kritizálja. Egyetértek abban, hogy nagyon sok környezetvédelemmel kapcsolatos cikk jelenik meg. Én annak is örülök, hogy a Pápa Assziszi Szent Ferencet a környezetvédelem égi patrónusává deklarálta. Kérem szépen, nem is rossz tipp. De az akadémiának ebben a kérdésben tudományos színvonal szempontjából felelőssége van, ezért nem nézhetjük el a tévedéseket,

amelyek dezinformálnak és félreinformálják a tisztelt nagyközönséget. Tehát írjanak, de ami rajtunk múlik és amiben mi adunk tanácsot, azért mi felelősek vagyunk, biológusok egyenként, az Osztály, a Bizottságok tagjai testületileg, hasonlóképpen a Bizottságok titkárai. Ezt kívántam kifejteni a referátumban. Így egyet értünk Balogh János akadémikussal. Király Zoltán kolléga hozzászólását külön köszönöm, mert végül is az agrár szempont és a környezetvédelem szükséges egyeztetését vetette fel. Azt hiszem, hogy azért a tudomány fegyvertárában van a kemizálás mellett számos olyan módszer, mely kevésbé károsítja a környezetet. Érdemes az ismert biológiai védekezési módokat előszednünk, nem feltétlenül csak a kemizálás növelésével lehet a produkciót növelni. A kemizálás módszertárában is található olyan kis mennyiség alkalmazását kívánó specifikus eljárás, mely kíméli a környezetet.

Jakucs akadémikus — azt hiszem — nagyon jó, hogy elmondta, amit mondott, véleményem szerint az a döntő Jakucs Pál hozzászólásában, hogy a molekuláris biológia és a környezetvédelem nem tűz—víz ellentét. A kettőnek együtt kell működni. Ma okos ökológus molekuláris biológiát tanul és okos molekuláris biológus környezetvédelmet és ökológiát tanul. Csak így lehet együttműködni. Mind a két félnek tanulni kell, mert így haladhatunk és így tehetünk eleget a feladatainknak.

Rakonczay elvtársnak köszönöm és nagyon egyetértek — hogy konkrétan felvetette a problémákat. Itt van a varjú-probléma, védtük őket és most már lassan 5 millió varjú van Magyarországon, és nem tudjuk eléggé irtani, úgy, hogy én azt hiszem, meg kell állapítani azokat a standardokat, amikor már védeni kell valamit és amikor már korlátozni kellene. Nagyon köszönöm Terpó Andrásnak is a véleményét, nem térek ki a részletekre.

Egy más jellegű hozzászólása volt Damjanovich és Elődi kollegának. Damjanovich Sándorral, én azt hiszem, hogy egyet értek, de ahogy itt elmondta, az egy kissé a bibliai „Máté-elv" megvalósítása lenne (a nagyoknak adni kell és a kicsiktől elvenni azt is, ami van).

Nagyon sok olyan kutatócsoport van, ahol nincs meg a kritikus tömeg, de ha együttműködik egy nagy kutatóközponttal, mint a KFKI, mint a KKKI, az ATOMKI, akkor tulajdonképpen megteremtheti magának a kritikus tömeget és azt a felszereltséget, amely lehetővé teszi, hogy eredményes munkát végezzen és itt támogatandó. Tehát kérem, nem szabad a kicsiket, az értelmes gondolatot termelő kutatóhelyeket teljesen elsorvasztani. Én azt hiszem, ennek a magyar biológia nagy kárát látná.

Bizonyos mértékig ezzel a kérdéssel foglalkozott Elődi kolléga is. A 60—70% kapacitás a Szegedi Biológiai Központban a biológiai műszerkapacitásra vonatkozott, mert természetes személyi kapacitással nem így áll. De kérem, nem érdemes ezt kiélezni, azt hiszem, én követtem el a hibát, hogy ezt a %-ot kimondtam, a számok sokszor gyűlöletesek, mert ha nem precizírozzuk teljesen, akkor esetleg félrevezetnek. Azt hiszem, együttműködve a Szegedi

Biológiai Központtal, a kisebb kutatócsoportok is nagyon jól egzisztálnak, minthogy itt mindegyik előadó délelőtt említette, hogy együttműködik legalább három más csoporttal, TSZ-szel vagy egy gyógyszergyárral.

Bihari Istvánnal mindenesetre egyetértek abban, hogy olyan biológusokat kell képezni, akiknek nagyon komoly általános biológiai műveltségük van, mert akkor minden problémában használhatók lesznek. Olyan biológust, olyan diplomást nem tudunk képezni, hogy 4 év alatt minden speciális problémát a fejébe töltünk. Nagyon komoly alapképzés kell harmad, negyedévig, és ezután specializálás. Ehhez kellenek a gyógyszergyár tapasztalt vezetői, hogy ők menjenek a tudományegyetemekre és tanítsák meg a leendő biológust arra, amilyen tudományok nekik hasznosak és merre specializálódhatnak. Nagyon köszönöm még egyszer a hozzászólásokat és főleg a türelmüket.

TÖRŐ IMRE, az ülés elnöke

Osztályülésünk végére értünk és mielőtt bezárnám az osztályülést, engedjék meg, hogy köszönetet mondjak a beszámolóért, amely végeredményben számos olyan kérdést tartalmazott, amely kiváltotta a hallgatóságból ezeket a tartalmas és lényeges hozzászólásokat. Az tény, hogy azok a kérdések amelyek itt felmerültek, semmiféle lényeges megoldást nem kaptak, de nem is kaphattak, hiszen még nagyon sokszor fogunk ezekről a kérdésekről éppen azért tárgyalni, mert azt gondolom, hogy vannak vélemények és ellenvélemények. Az alapkutatás fejlesztése vagy a tervezés problémája, a biológia jelentősége a gyógyszerkutatásban, mezőgazdaságban, nem is említve a környezetvédelmet, olyan kérdések, melyek az osztály tárgyalásai alkalmával nap mint nap felmerülnek és meggyőződésem, a jövőben is uralni fogják a biológiai tudományterület problémáit.

Annak is örülök, hogy tulajdonképpen felmerült olyan kérdés, ami azt hiszem, még soha nem merült fel ilyen nyilvános osztályülés alkalmával és ez pedig a sajtónak a kérdése és pontossága a tudomány terjesztése területén, amivel kapcsolatban, azt hiszem hogy, szintén mindenkinek megvan a maga egyéni véleménye. Mindenesetre éppen, amikor az osztályelnökünk azt hangoztatta, hogy az Akadémia is felelős ebben a tekintetben, alá kell húzni, hogy helyes irányba a közvéleményt és az újságírókat az terelné, hogyha az akadémikusok sokkal többet írnának a sajtóban azokról a kérdésekről, amelyek a nagyközönséget érdekli. Ez volna az, ami helyretenné az általános véleményt és amelyre az a vita, ami most itt lezajlott, felhívta a figyelmet.

Még egyszer nagyon szépen köszönöm a hozzászólásokat és a beszámolót és ezzel a mai osztályülésünket berekesztjük.

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK TUDOMÁNYOS ÜLÉSE

1981. április 22.

ALFÖLDI LAJOS

MEGNYITÓ

Az 50-es és 60-as évek biológiai forradalma során nyilvánvalóvá vált, hogy a molekuláris biológiának is nevezett területen olyan jelentős eredmények születtek, illetőleg várhatók, amelyek a népgazdaság jövője számára is alapvetően fontosak. Az Akadémia és a kormány tudománypolitikai döntése ezért egy olyan intézmény megszervezését tűzte ki célul, amelyben néhány kísérletes biológiai szakterület, ú.m. Biofizika, Biokémia, Genetika és Növényélettan kutatását nemzetközi szinten lehet művelni. Ehhez pedig megfelelő kritikus tömegre volt szükség mind kutatói kapacitásban, mind műszerezettségben.

Azóta is sokszor és sokan megkérdőjelezték, hogy okos volt-e a döntés, érdemes volt-e a Szegedi Biológiai Központot létrehozni. Erre a kérdésre az SZBK, úgy vélem, kizárólag munkájával és teljesítményével adhat választ.

Egy ilyen méretű kutató központ tudományos programja természetesen nem spontán módon alakult ki, hanem ez a már említett tudománypolitikai döntések kereteibe illeszkedett be.

Az első néhány évben a Központ tudományos vezetőinek a legfőbb feladata abban állott, hogy felmérték szakterületük várható fejlődési tendenciáit és azok keretébe illő kutatási programok kialakítására törekedtek. Ezen irányzatok kiválasztásánál olyan problémakörök szelektálása volt a cél, amelyek az elkövetkezendő időszakban nemzetközi érdeklődésre tarthatnak számot, de amelyek vitelére a feltételeket biztosan meg tudjuk teremteni, s amelyekből várható alapkutatási eredményekre a népgazdaságnak belátható időn belül szüksége lesz.

A Biológiai Központ intézeteinek kutatási profilját tehát elsősorban az intézetek igazgatóinak szakmai megítélése határozta meg, az ő felelősségük tehát az intézmény eddigi működésében fokozott mértékű. De az igazgatók által kialakított irányvonalak keretein belül, esetenként azon túl is, a kutatócsoportok vezetői, ill. tagjai voltak azok, akik az elképzeléseket tovább alakították, ill. azt megvalósították.

A Központ megnyitásakor a Biológiai Osztály akkori elnöke megnyitó beszédében azt is hangsúlyozta, hogy az Akadémia vezetése nem a biztonsági munkára való törekvést, hanem bátor kezdeményezést és kockázatvállalást vár az intézménytől. Ilyen kockázatot gyakorlatilag mindegyik intézet vállalt.

A Biofizikai Intézet témaválasztásában a fényenergia hasznosítására vonatkozó döntést emelem ki mint új és idő igazolta témaválasztást.

A Biokémiai Intézet Szegedre már megfelelő hagyományokkal költözött le. Ennek ellenére új kutatási irányként tarthatjuk számon a széles alapokon meginduló nukleinsav kutatást. Senki nem gondolta 1971-ben, hogy ezen a területen a nemzetközi mezőnyben olyan fantasztikus fejlődésnek leszünk szemtanúi, amely végül is a génsebészeti technikák, szekvenálási technikák kidolgozásában és alkalmazásában érte el csúcspontját.

Az Enzimológiai Intézet 1978-ban lett a Biológiai Központ önálló intézete. Tudományos profilját több évtizeden keresztül alakította ki és úgy vélem, az a döntésük, hogy a jövőben komplex enzim rendszerek tanulmányozásával foglalkoznak, csatlakozást is jelent az SZBK általános profiljához.

A Genetikai Intézet, bár szintén Budapestről költözött le és hagyományai is voltak, mégis Szegeden olyan új irányzatok művelését kezdte el, amelynek hazánkban nem voltak hagyományai de amelyre az országnak szüksége van, és eddig ilyen szintű művelésére sem mód sem lehetőség nem nyílt. Különösen sok vitára adott okot kezdetben a növényi sejtgenetika kutatásának a klasszikus genetikai irányzatok elé való helyezése. Az elmúlt 10 év fejlődése azonban az akkor kétkedőket valószínűleg meggyőzte döntésünk megalapozott voltáról.

A Növényélettani Intézet fotoszintézis profilja tradíciókkal került az intézetbe, a növényi sejtgenetikai kutatások intenzív művelése Szegeden alakult ki, s újabb profilváltás az intézet életében a kék-zöld algákkal, valamint a viroidokkal történő foglalkozás.

A felsorolt problémák hallatán is, de különösen ha ezt még kiegészítenénk az intézetekben folyó egyéb témák felsorolásával, rendszerint elhangzik az a kérdés, hogy vajon a Szegedi Biológiai Központ valóban kutatóegységnek tekinthető-e, vagy pedig egyszerűen öt egymás mellé helyezett intézet halmaza. A kutatási feladatok látszólagos sokfélesége ugyanis a kívülálló számára, csak a címek hallatán, nem teszi világossá, hogy a Biológiai Központ 10 év alatt valódi kutató egységgé kovácsolódott össze. Ez azt jelenti, hogy az intézményben egységes szemléletmóddal közelítjük meg a problémákat. Számunkra az élő sejt, legyen az baktérium, növényi vagy állati sejt, ugyanazon funkcionális egységet jelent. A Központ csaknem minden kutatási problematikájának a középpontjában a sejtműködés valamilyen szabályozásának a tanulmányozása áll. Ezeket a szabályozási folyamatokat természetesen másképpen közelíti meg a genetikus, a biokémikus, a biofizikus vagy a növényélettanász. De a problémák jellegéből adódóan, mind gyakrabban találkoznak a különböző szakemberek, s ma már egyáltalán nem ritka az a kutatási program, amelyben mind a négy intézet szakemberei a maguk speciális tudásával részt vesznek. Erre vonatkozó példákat a következő előadások is szolgáltatnak.

Az ország tudománypolitikai vezetése a közelmúltban különösen hangsúlyozottan kívánja meg a kutatóintézetektől, hogy az ország gazdasági problémáinak megoldásában segítséget nyújtsanak. Örömmel látjuk, hogy a tudománypolitikai vezetés azzal is tisztában van, hogy a jövő gazdasági eredményeinek a sikere alapkutatási bázis nélkül nem képzelhető el. Mi tehát eddigi terveinkben és a jövő terveinkben is igyekeztünk és igyekszünk alapkutatási szinten szakterületünk fejlődésével lépést tartani, ha lehet annak élmezőnyébe bekerülni. Ugyanakkor, amint az előadások egy része is demonstrálni fogja, megteszünk mindent annak érdekében, hogy ezek az alapkutatási eredmények minél hamarabb a gyakorlathoz közel kerüljenek, ill. ott felhasználást nyerjenek.

Elnök Úr ! Tisztelt Hallgatók !

Rövid bevezetőmben csak felvillantani kívántam az SZBK működésének néhány aspektusát. Igyekeztem elkerülni, hogy saját munkánkról és a 10 évről értékelést adjak. Nézzék át tájékoztató anyagunkat, kérem, hallgassák meg az előadásokat és azok alapján ítéljék meg, hogy mennyire jutottunk.

MODERN NUKLEINSAVKUTATÁSI MÓDSZEREK FELHASZNÁLÁSA AZ ALAPKUTATÁSBAN ÉS GYAKORLATBAN

VENETIANER PÁL

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézete

Mivel a mai ülés az SZBK fennállásának tízéves évfordulóját ünnepli, talán nem indokolatlan, ha előadásomat visszatekintéssel kezdem. Mikor a mai nukleinsavcsoport őse megkezdte a munkát Szegeden, azt a célt tűztük magunk elé, hogy egy bakteriális gént tisztán előállítsunk. Sem a választott baktérium — az *Escherichia coli* —, sem a választott gén(ek) — a riboszomális RNS-t kódoló gének — semmiféle gyakorlati haszonnal nem kecsegtetett. Munkánkat kizárólag az motiválta, hogy úgy gondoltuk: a génműködés szabályozásának mélyebb megértéséhez tiszta, izolált, in vitro rendszerekre van szükség; a választott objektum technikailag hozzáférhetőnek látszott és elméletileg érdekes problémákat vetett fel. Bár e kutatás potenciális gyakorlati jelentőségét nem sikerült ésszerűen megindokolnunk, az intézet és az akadémia megértő vezetése lehetővé tette e munka elindítását. Mai szemmel visszatekintve kezdeti próbálkozásainkra, azok legfőbb hiányossága, hogy nem tudtuk a DNS-t meghatározott pontokon, specifikusan hasítani. Ezt a feladatot a restrikciós endonukleáz enzimek képesek elvégezni. Ezeknek az enzimeknek — azóta Nobel-díjjal honorált — felfedezése óriási lökést adott munkánknak. A technika alkalmazását azonnal megkezdtük, mielőtt ezek az enzimek kereskedelmi forgalomba kerültek. Ennek a gyors reakciónak köszönhetően nem ért készületlenül a hamarosan bekövetkező két újabb — az elmúlt évben szintén Nobel-díjjal jutalmazott — technikai-módszertani forradalom sem: a DNS-klónozási (génsebészeti) technika megszületése és a gyors nukleinsavszekvencia meghatározási módszerek kidolgozása.

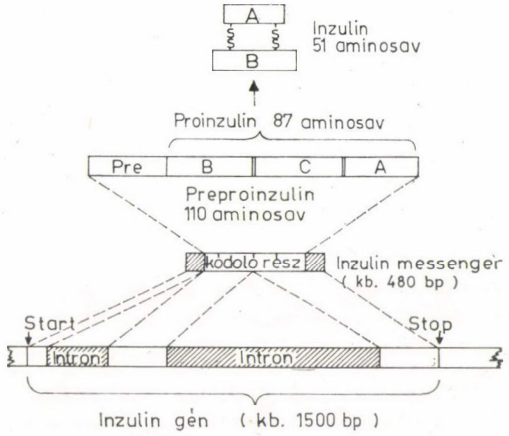
Mindezek a módszerek — hozzászámítva a korábban kidolgozott hibridizációs és elektronmikroszkópos technikákat — olyan eszköztárat adtak a kezünkbe, amelynek segítségével sikerült teljesen megoldani a felvetett problémát, elérni az eredetileg kitűzött célt. Meghatároztuk az *Escherichia coli* kromoszómáján az rRNS-t kódoló gének számát, pontosan feltérképeztük környezetüket. Klónoztuk és izoláltuk az egyik rRNS gént, meghatároztuk a szabályozó régió teljes nukleotidsorrendjét (1800 bázispárt) és az így meghatározott struktúrához elektronmikroszkópos és in vitro transzkripciós vizsgálatokkal hozzárendeltük a funkciót, sikeresen magyarázva ezzel a gén működésének bizonyos sajátosságait. Mivel erről a munkáról az MTA tavalyi köz-

gyűlésén már beszámoltunk (9), a továbbiakban nem fogok erről beszélni. Ugyancsak nem fogok bővebben beszélni e technikák egyéb alapkutatási alkalmazásairól. Csak megemlítem, hogy klónoztunk egy modifikáció metiláz enzimet kódoló gént *Bacillus sphaericus*ból (8), a gén szerkezetének felderítése folyamatban van. Részt vettünk a *Rhizobium meliloti nif* gének klónozásában — erről Kondorosi Ádám előadásában fognak hallani, és meghatároztuk egy mutáns Drosophila gén szerkezetét is — erről Gausz János előadásában lesz szó.

Az elmúlt években világszerte nyilvánvalóvá vált, hogy ezek a módszerek — amelyeket mindenütt alapkutatással foglalkozó laboratóriumok fejlesztettek ki — óriási potenciális gyakorlati jelentőséggel rendelkeznek. Ennek következtében mélyreható változás történt az ilyen típusú kutatások társadalmi és anyagi helyzetében. E változás jegyében a MTA főtitkárának és a Kőbányai Gyógyszergyárnak a megbízásából munkacsoportunk is vállalkozott egy közvetlen gyakorlati célt szolgáló feladat megoldására. E program célja egy olyan baktérium konstruálása, amely tartalmazza az emberi inzulint kódoló gént és azt ki is fejezi, így alkalmazható az emberi inzulin ipari fermentációval történő előállítására. A következőkben e munka állásáról fogok beszámolni, előrebocsátva, hogy a hároméves programnak még csak az első éve telt le, így csak részeredményekről beszélhetek.

A probléma gazdasági jelentősége az, hogy míg a cukorbetegek száma világszerte, így hazánkban is rohamosan emelkedik, az inzulin iránti kereslet növekedésével a hagyományos termelés (sertéspankreászból) nem tud lépést tartani. Ennek következtében az inzulin világpiaci ára az elmúlt két évtizedben megtízszereződött és hasonló ütemű áremelkedés várható a jövőben is. Magyarország jelenleg nem gyárt inzulint, a teljes szükségletet tőkés importból fedezzük. Meg kell jegyezni azt is, hogy a cukorbetegek mintegy 5%-a allergiás a sertésinzulinra és várható, hogy ezeken a betegeken az emberi inzulin segíthet. Ez az igény indokolta, hogy a génmanipuláció ilyen célú felhasználásával a vezető amerikai laboratóriumok már régen foglalkoznak és a Genentech cég kutatói már be is számoltak sikeres eredményekről (3). Az ő általuk konstruált baktériumklón felhasználására az inzulin-világpiac 80%-át kezében tartó Ely Lilly cég új gyárat létesített. Természetesen a baktériumtörzs elvben meg is vásárolható, sajnos, a cég tízmillió dollárt kér érte. Tekintve, hogy a mi munkánk ennél lényegesen olcsóbb, érdemesnek látszik foglalkozni a konstrukcióval — természetesen egészen más úton, mint az amerikai kutatók.

Az emberi inzulin két polipeptidláncból, 51 aminosavból álló molekula, amely több feldolgozási lépésen át a 110 aminosavból álló preproinzulinból keletkezik. Ezt a fehérjét egyetlen gén kódolja. Mint az 1. ábrán látható, az eukaryota gének nagy részéhez hasonlóan az inzulingén is tartalmaz közbeiktatott szekvenciákat, úgynevezett intronokat (1). Ennek következtében az inzulingén közvetlen átültetése a baktériumba nem járható út, mert az



1. ábra. Az emberi inzulin génje és az inzulin bioszintézis vázlata

intronokban kódolt információt a baktérium nem tudja eltávolítani. Az átültetendő szekvencia a preproinzulin messengerben levő információ. Elvileg az volna a legegyszerűbb stratégia, hogy tiszta emberi inzulin-messengert állítunk elő, majd erről DNS másolatot készítünk és ezt visszük be a baktériumba. Sajnos, emberi pankreászból nem jöhet szóba a messenger tisztítása, mert a kiinduló anyag nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségben. Ez a nehézség kikerülhető oly módon, hogy patkányból tisztítunk inzulin-messengert, ennek DNS másolatát klónozzuk és ezzel mint hibridizációs próbával azonosítjuk az emberi inzulint kódoló szekvenciákat egy tisztítatlan emberi pankreász-messengerből készített ún. klónbankban (2). Patkány inzulin-messenger tisztítható volna a Langerhans-szigetek kémiailag indukálható tumorjából (5). Sajnos e tumorok kifejlődése 1—2 év, erre nem akartunk várni. Inkább egy olyan alternatív stratégiát választottunk, amely felhasználja már azt a szerkezeti információt, amely az elmúlt év során ismertté vált az emberi és patkány inzulingénről.

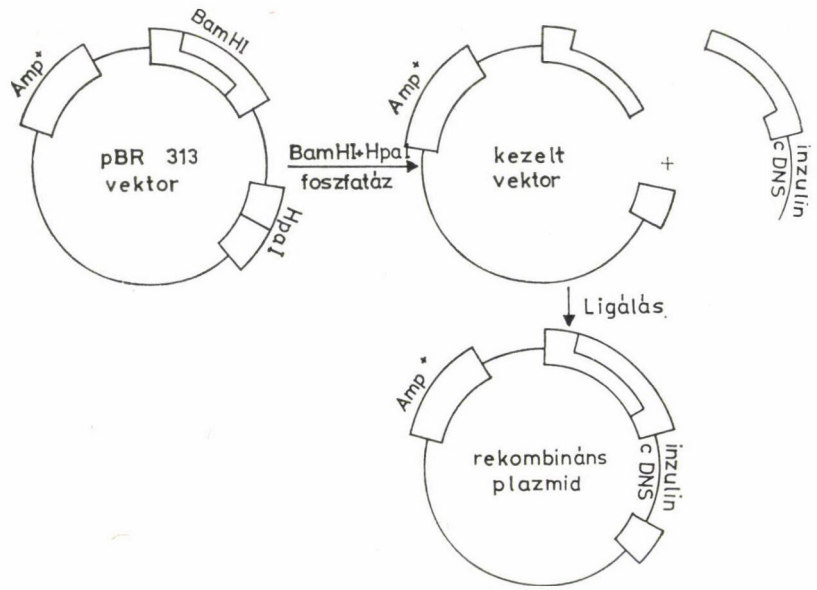
Bármely messenger-RNS-ről általában úgy készíthető DNS másolat, hogy a szintézist végző reverz transzkriptáz enzim a reakcióelegybe bevitt oligo-dT molekulákhoz építi hozzá a DNS láncot és azért másol le minden messenger RNS-t, mert ezek 3'-végénél levő poly A szakasz megköti az oligo-dT-t. Mi abból indultunk ki, hogy ha oligo-dT helyett egy olyan kémiailag szintetizált oligonukleotidot alkalmazunk „primer"-ként, amely az inzulin-messenger valamely részével komplementer, akkor még tisztítatlan messenger esetén is az inzulin-messenger fog preferenciálisan (vagy kizárólagosan) lemásolódni. Az inzulinmolekula utolsó három aminosavát kódoló három tripletet és a terminátor tripletet választottuk erre a célra (TACTGCAACTAG), illetve e szekvencia komplementerjét (CTAGTTGCAGTA). Ezzel egyrészt biztosítottuk, hogy a teljes kódoló szekvenciát lemásoljuk, másrészt ez a szekvencia

közös patkánynál és embernél (2, 6), tehát mindkét esetben alkalmazható. A kémiai szintézist Simoncsits András (SZBK Genetikai Intézet) végezte a módosított triészter módszerrel (7).

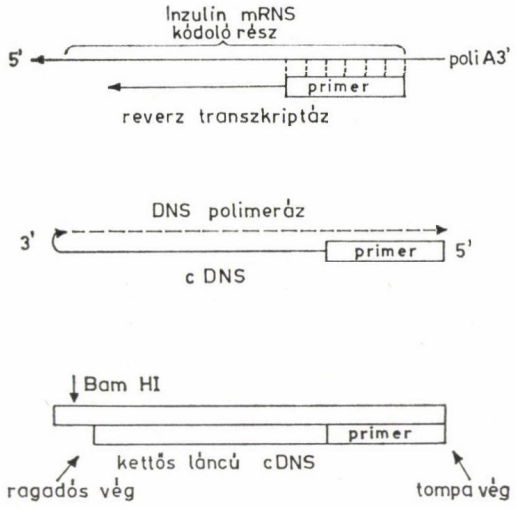
A részlegesen tisztított messenger-RNS preparálását Deák Ferenc végezte el. A módszer lényege: Langerhans-szigetek tisztítása patkány pankreászból, összes RNS izolálása a szigetekből denaturáló közegben, majd a polyA-végű messenger-RNS frakció elválasztása oligo-dT-cellulóz kromatográfiával (4).

A munka következő fázisait — ez Boros Imre nevéhez fűződik — a 2. és 3. ábra szemlélteti vázlatosan. Első lépésként a dodekanukleotid „primer" 5' végét radioaktívan jelöltük, hogy a reakciót könnyebben követhessük, majd reverz transzkriptázzal, a jelölt dodekanukleotid „primer" felhasználásával egyszálú DNS másolatot készítettünk a messengerről. Mint a negyedik ábra mutatja, a „primer" valóban specifikusan irányította a reakciót, a Langerhans-szigetből izolált messenger másolata egyetlen domináns csíkot adott pontosan az inzulin-messengertől várt 390 nukleotid hosszúságú láncnak megfelelő helyen. Összes pankreász-messenger használata esetén is megtalálható ez a csík, de ilyenkor természetesen jóval komplexebb a termék.

A következő lépésben, az RNS eltávolítása után az egyszálú DNS-t DNS-polimeráz segítségével kettős szálúvá alakítottuk, majd a kétszálú DNS-t a 3. ábrán látható klónozási séma követelményeinek megfelelően „méretre vágtuk". Ez annyit jelentett, hogy BamHI restrikciós endonuklázzal hasívenciáját kell tartalmazniuk. E szekvencia eléggé hasonlít az emberi inzulingén



2. ábra. cDNS szintézise az inzulin-messengerről, specifikus „primer"-rel



3. ábra. Az inzulin cDNS klónozása

tottuk, amelyről tudtuk, hogy az inzulingén elején, a 3. aminosav után kell hogy hasítsa a DNS-t. A gén végét nem módosítottuk. Ily módon feltételezésünk szerint az inzulint kódoló szekvencia egyik vége ún. „ragadós" vég, amely könnyen kapcsolódhat más, szintén BamHI enzim által generált végekhez. A klónozásra kiválasztott plazmidvektort ugyancsak BamHI enzimmel, illetve a „tompa" végeket generáló HpaI enzimmel emésztettük, majd a két DNS-t ligázzal összekapcsoltuk. Ligálás után a plazmidot transzformáció útján vittük be az *Escherichia coli* sejtbe és a rekombinánsokat ampicillinrezisztenciájuk alapján szelektáltuk. A rekombinánsok további szűrésénél arra támaszkodtunk, hogy az ismert szekvencia alapján a patkány inzulingénben a 3' végtől 118 bázispárnyira van egy SmaI restrikciós endonukleáz hasítóhely. Ismeretes, hogy eukaryota DNS-ban igen ritkán hasít a SmaI, átlagosan 16 000 bázispárra esik egy hasítóhely. Mivel a használt vektorban a HpaI helytől 220 bázispárnyira szintén van egy SmaI hely, a rekombináns plazmidokat egyenként emésztettük SmaI-gyel és azokat válogattuk ki, amelyekből az inzulinszekvencia alapján várt 338 bázispár hosszúságú fragmentum hasadt ki SmaI emésztésre. Kb 300 klón átvizsgálása után 3 ilyet találtunk (5. ábra) és feltételezzük, hogy ezek tartalmazzák az inzulint kódoló szekvenciát. Ezt a feltételezést természetesen direkt DNS szekvenciameghatározásnak kell megerősítenie — ennek eredményéről sajnos még nem tudok beszámolni.*

Amennyiben feltételezésünk megerősítést nyer, akkor e klónoknak az első 11 nukleotid kivételével a patkány inzulin-messenger teljes kódoló szek-

* Ez a mondat így hangzott el az előadáson. Közben megtörtént a szekvenciavizsgálat és ez igazolta a feltételezést. E klónok valóban a patkány inzulint kódoló DNS-t tartalmaznak. MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete.

szekvenciájához, tehát mint hibridizációs próba, alkalmas annak „felismerésére". A kis mennyiségben rendelkezésre álló emberi pankreászból tehát nem szükséges Langerhans-szigetet tisztítani. Ha az összes messengerből az előbbiekhez hasonló módon DNS másolatot készítünk és klónozzuk, a rekombinánsok közül e próba segítségével választhatjuk ki a megfelelőt. Hála több szegedi és budapesti klinika segítségének, már sikerült is emberi pankreászból messenger RNS-t készíteni és, mint a 6. ábra mutatja, a specifikus „primer"-rel lemásolva ebben a preparátumban is felismerhető az inzulin DNS-nek megfelelő 390 nukleotid hosszúságú lánc. A klónozás tehát elvégezhető lesz, amint megerősítést nyer a patkányból származó „próba" szekvenciája.

Pillanatnyilag itt tartunk. Előadásom érdemi részének befejeztével, az elmondottak alapján három gondolatot szeretnék hangsúlyozni. Az első: az alkalmazott technikák hallatlan teljesítőképessége. Az emlős genom információtartalma körülbelül 3 milliárd bázispár, ebből az inzulint kódoló szekvencia kevesebb, mint 500. A klónozás nanogrammnyi inzulin-messengerből indul ki és ebből nyerhető milligrammos mennyiségben a klónozott DNS. A másik dolog, amire fel szeretném hívni a figyelmet, hogy a „genetic engineering" kifejezés mennyivel jobb, mint a génsebészet. Ezek a kísérletek ugyanis elvben valóban mérnöki pontossággal tervezhetők, sőt gondos munka és némi szerencse mellett még sikerülnek is. Végül a harmadik gondolat: már korábban hangsúlyoztam, hogy ezt a munkát az tette lehetővé, hogy a bakteriális rRNS génekkel dolgozva elsajátítottuk és helyenként továbbfejlesztettük a modern nukleinsav-kutatási módszereket. Mindezeket a módszereket alapkutatással foglalkozó laboratóriumokban dolgozták ki, olyan kísérleti rendszerekben, illetve olyan problémákat kutatva, amelyeknek semmi közük nem volt a gyakorlathoz és a jövendő alkalmazáshoz. A tanulságot talán nem is szükséges megfogalmazni.

Befejezésül el szeretném mondani, hogy az inzulinprogram keretében számos alternatív stratégiát próbáltunk ki és fogunk alkalmazni a jövőben is. Ebben munkacsoportunk valamennyi tagja részt vesz és külső segítséget is igénybe veszünk. Az előbb elmondottak egyetlen utat ismertettek, azt, amelyben eddig legmesszebbre jutottunk. Ezért szeretném felsorolni mindazon kutatókat, akik — a korábban említettek mellett — ebben a munkában részt vettek: Aradi János (DOTE Biokémiai Intézet), Duda Ernő, Erdei Sára, Fehér Zsigmond (DOTE Biológiai Intézet), Fejes Erzsébet, Horváth Péter, Kiss Antal, Kiss Ibolya, Kondorosi Éva, Sain Béla, Török István, Udvardy Andor.

IRODALOM

1. Bell, G. I., Pictet, R. L., Rutter, W. J., Cordell, B., Tischer, E. and Goodman, H. M.: Sequence of the human insulin gene. Nature **284**, 26—32 (1980).
2. Bell, G. I., Swain, W. F., Pictet, R., Cordell, B., Goodman, H. M., Rutter, W. J.: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin. Nature **282**, 525—527 (1979).

3. GOEDDEL, D. V., KLEID, D. G., BOLIVAR, F., HEYNEKER, H. L., YANSURA, D. G., CREA, R., HIROSE, T., KRASZEWSKI, A., ITAKURA, K. and RIGGS, A. D.: Expression in Escherichia coli of chemically synthetised genes for human insulin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **76,** 106—110 (1979).
4. GOODMAN, H. M. and MACDONALD, R. J.: Cloning of human genes from a mixture of cDNA molecules. in: Methods in Enzymology. Vol. 68. Eds: Grossmann, L. and Moldave, K. Academic Press. New York—London. (1980).
5. ITOH, N., NOSE, K. and OKAMOTO, H.: Purification and characterization of proinsulin mRNA from rat B-cell tumor. Eur. J. Biochem. **97,** 1—9 (1979).
6. LOMEDICO, P., ROSENTHAL, N., EFSTRATIADIS, A., GILBERT, W., KOLODNER, R. and TIZARD, R.: The structure and evolution of the two nonallelic rat preproinsulin genes. Cell **18,** 545—558 (1979).
7. SIMONCSITS, A.: Chemical synthesis of a dodecadeoxyribonucleotide complementary to the 3'-end of the coding region of human preproinsulin mRNA. Acta Biologica ASH. Sajtó alatt.
8. SZOMOLÁNYI, É., KISS, A. and VENETIANER, P.: Cloning the modification methylase gene of Bacillus sphaericus R in Escherichia coli. Gene **10,** 219—225 (1980).
9. VENETIANER Pál: Génműködés és nukleinsav-szerkezet. MTA. Biol. Tud. Oszt. Közl. **23,** 327—335 (1980).

GENOM SZERVEZŐDÉS DROSOPHILA MELANOGASTERBEN

GAUSZ JÁNOS

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet, Szeged

Az utóbbi években a molekuláris biológiai kutatások jelentős része a valódi sejtmaggal rendelkező eukarióta szervezetek génszerkezetének megismerését szolgálta. A baktériumok és vírusok, tehát a prokaryoták genetikai szerveződése elég jól ismert, de ezeken az organizmusokon kapott eredmények nem alkalmazhatók közvetlenül az eukariótákra, mivel ezek a szervezetek genetikailag sokkal bonyolultabbak és génjeik működését is eltérő molekuláris mechanizmusok szabályozzák.

Mivel az eukarióták (növények, állatok) kromoszómáin egy időpontban sok gén működik, célszerű ezek közül csak néhányat kiválasztani és ezek szerkezetét vizsgálni. Ilyen jellegű vizsgálatokra csak olyan fajok alkalmasak, amelyek genetikája jól ismert. Ezért választottuk vizsgálati objektumként az ecetmuslicát vagy másként a *Drosophila melanogastert*. Genetikailag előnyös tulajdonságai közül csak az alacsony kromoszómaszámot (n = 4) és a rövid generációs időt (10 nap), valamint a könnyű laboratóriumi tenyészthetőséget kell megemlíteni.

A Drosophila lárvák nyálmirigysejtjeiben óriáskromoszómák alakulnak ki. Ezekben a diploid sejtek kromoszómáihoz képest ezerszeres DNS mennyiség található, így a kromoszómák finomabb szakaszai is jól láthatók és analizálhatók (1. ábra). Jól megfigyelhető, hogy a kromoszómán vékonyabb, vastagabb sávok következnek egymás után. Valószínű, hogy ezek mindegyikéhez csak egy tulajdonságot kódoló gén tartozik (JUDD és mtsai 1972). A sávok morfológiailag eltérőek és mintázatuk állandó, így az egyes gének helyzete az óriáskromoszómán jól meghatározható. Minden egyes sávot egy három tagú kódszámmal jelölünk (pl. 87A7 stb.). A nyálmirigy kromoszómákon nemcsak az egyes géneket lehet azonosítani, hanem az esetek egy részében ezek működése is megfigyelhető. Ezeken a helyeken a DNS erősen fellazul és jellegzetes duzzanatok, ún. „puffok" keletkeznek (1. ábra). Ezek helyzete és mérete jellemző a fajra, ill. a fejlődési stádiumra is. Ez egyúttal azt is jelzi, hogy az egyedfejlődés folyamán a gének egy része differenciáltan működik (BEERMANN 1972).

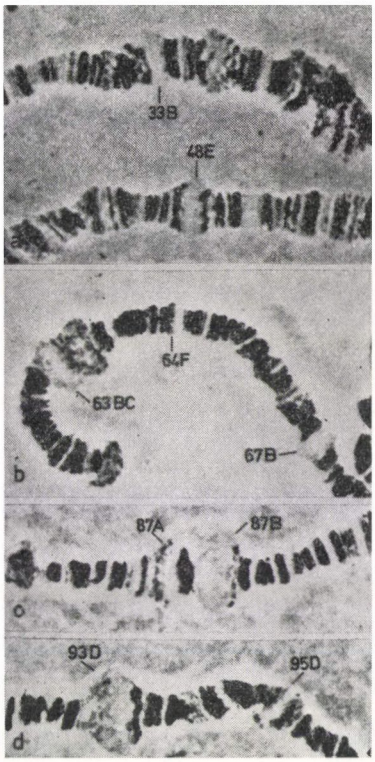
Bizonyos Drosophila gének működését egyszerű mesterséges beavatkozással is kiválthatjuk. Ha a lárvákat rövid ideig 37 °C hőmérsékletre helyezzük,

majd az izolált nyálmirigyek kromoszómáit megvizsgáljuk, 9 specifikus helyen puffok figyelhetők meg, tehát 9 új gén kapcsolódott be (RITOSSA 1962, ASHBURNER 1970). Mivel az új puffokat hővel indukáltuk, hő-sokk puffoknak nevezzük őket. Az új gének bekapcsolásával egyidejűleg a legtöbb addig meglevő puff visszafejlődik, vagyis a legtöbb addig működő gén „kikapcsol". Ezzel egyidejűleg biokémiailag kimutatható változások is lejátszódnak. A hőkezelés 6—8 új mRNS és azonos számú protein nagy mennyiségű szintézisét váltja ki (TISSIÉRES és mtsai 1974), míg az addig képződő sokféle mRNS és protein szintézise megszűnik, ill. visszaszorul (MCKENZIE és mtsai 1975, SPRADLING és mtsai 1977). Fontos megemlíteni, hogy a génműködés citológiailag csak a nyálmirigysejtekben mutatható ki, viszont a keletkező RNSek és fehérjék szintézisét minden megvizsgált szövettípusban észlelték. Így joggal feltételezhető, hogy a magas hőmérséklet minden szövetben ugyanazon gének működését indukálja. Ezeket a géneket alkalmasnak találtuk arra, hogy a gén és a róla képződő mRNS, ill. az arról lefordított protein közötti gén—termék viszonyt analizáljuk.

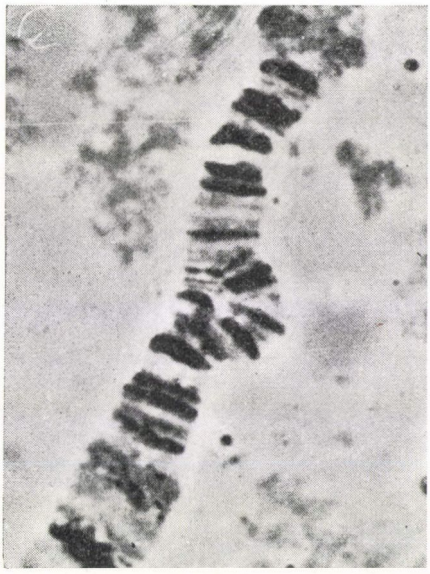
Amikor 1976-ban elkezdtük vizsgálatainkat, a hő-sokk jelenség biokémiájáról már sok adat gyűlt össze, keveset tudtunk azonban a hő-sokk proteinek kódolásáért felelős génekről. Ezért célul tűztük ki, hogy ezen gének közül néhányat genetikai módszerekkel analizáljunk. Egy gén szerkezetét, ill. működését ugyanis csak akkor tudjuk megérteni, ha ezt a gént mutációval „elrontjuk" és a működésképtelen mutáns szerkezetét összehasonlítjuk a funkcionális vagy más szóval vad típusú génnel. Természetesen nem mertük volna ezt a megközelítést választani, ha nem számíthattunk volna biokémikus kollégáink segítségére, mivel ilyen típusú analízist csakis komplex interdiszciplináris kutatás keretében (biokémikusok és genetikusok együttműködésével) lehet végrehajtani.

A hővel indukálható hő-sokk puffok közül 9-et sikerült eddig azonosítani, mi ezek közül kettőt (a 87A és 87C kódjelűeket) választottuk ki, mivel egymáshoz közel helyezkednek el és így együttes vizsgálatukhoz nem kellett külön genetikai rendszert kifejleszteni.

A genetikai kísérletekben először azt a célt tűztük ki, hogy a két hősokk puff képződéséért felelős géneket eltávolítsuk a kromoszómáról. Ezt elvben legegyszerűbben deléciós kromoszómák előállításával érhetjük el. Ennek érdekében kifejlett imágókat Röntgen sugárzással kezeltünk, hogy kromoszóma töréseket idézzünk elő. Így olyan deléciós kromoszómákat hoztunk létre, amelyekből a puffok képződéséért felelős gének hiányoztak (2. ábra). A nyálmirigy kromoszómák esetében a diploid szervezetekre jellemző apai, ill. anyai eredetű homológ kromoszómák úgy párosodnak egymással, hogy a két kromoszóma egynek tűnik. Deléciós törzsekben az egyik kromoszóma-szálról egy géncsoport hiányzik, míg a másik sértetlen, a hiányzó szekvenciákkal szemközti rész egy hurkot képez. A sávok jellegzetes morfológiája alapján az is



1. ábra. Drosophila melanogaster nyálmirigy óriáskromoszómák hő-indukált puffjai (ASHBURNER 1970)



2. ábra. Df(3R)karrIW/TM3 deléciós nyálmirigy kromoszóma citológiai képe. A kontroll kromoszóma szál hurkot képez

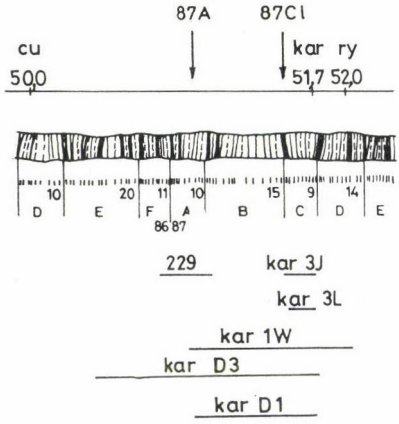
meghatározható, hogy egy deléciós törzsben pontosan milyen gének hiányzanak. Megfelelő szelekciós rendszerrel sok különböző méretű deléciós kromoszómát szelektálva olyan törzseket állítottunk elő, amelyekből a deléciók különböző géneket távolítottak el (ISH-HOROWICZ és mtsai 1979 a, GAUSZ és mtsai 1979). Mivel a hő-sokk gének esetében a gén aktív állapota is jól látható puff formájában, egy olyan deléciós kromoszómán, amelyen hő-sokk puff nem indukálható, az annak képződéséért felelős génnek hiányoznia kell (3. ábra).

A 3a. ábrán jól látható, a két hő-sokk puff képződése az egyik szálon, míg a másikon csak a 87C puff látható, tehát a 87A képződéséért felelős gén hiányzik. A 3b. ábrán viszont a deléciós szálról a 87C puff képződéséért felelős gének hiányoznak. A 3c. ábra pedig olyan deléciót mutat, amelyben mindkét hő-sokk puff képződéséért felelős gének hiányoznak. A különböző deléciós törzsek segítségével így lehetségessé vált, hogy a hő-sokk puff képződéséért felelős sávokat — tehát a géneket — azonosítsuk. Így, ma már tudjuk, hogy ezek a 87A7, ill. 87C1 sávokban találhatók.



3. ábra. Hőkezelt lárvák nyálmirigy kromoszómáinak citológiai képe. *a)* 87A puffot eltávolító, deléció, *Df/3R/229*, *b)* 87C puffot eltávolító deléció, *Df/3R/kar*^{3J} *c)* mindkét hő-sokk puffot eltávolító deléció *Df/3R/229 Df/3R/kar*^{3J}. A nyíl a hiányzó puff helyét jelöli, a háromszög a kontroll kromoszóma 2 hő indukált puffja között helyezkedik el

Szerettük volna megállapítani, hogy ez a két hő-sokk puff milyen hő-sokk proteinek kódolásáért felelős. Ezekhez a vizsgálatokhoz is deléciós törzseket használtunk (4. ábra).

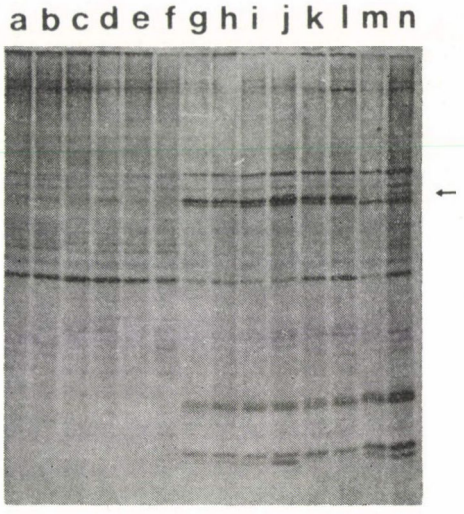


4. ábra. A hő-sokk proteinek analíziséhez felhasznált deléciók citológiai kiterjedése

A *229* jelű törzsből csak a 87A hő-sokk puff, a kar^{3J} jelűből csak a 87C hő-sokk puff, míg a kar^{1W} jelűből mindkettő hiányzott. Erre a célra azonban olyan deléciós állatokat kellett használni, amelyekben mindkét kromoszóma-homológról hiányoztak a puff-képződéséért felelős gének. Ilyen embriókat választottunk ki és a hőkezelés előtt, ill. után proteinjeiket elektroforézist követő autoradiográfiával vizsgáltuk (5. ábra).

Jól megfigyelhető, hogy hőkezelés nélkül mindegyik deléciós törzsben azonos a protein-mintázat. Ugyanakkor az is látszik, hogy a hőkezelt állatokban gyakorlatilag csak hő-sokk proteinek képződnek. Azonos hő-sokk proteinek találhatók a vad típusú, valamint a 87A, ill. a 87C puff-hiányos törzsekben. Az egyetlen eltérést az utolsó két oszlopban látjuk (5m és 5n ábra), egyetlen protein hiányzik azokból az állatokból, ahol mindkét (a 87A és a 87C) hő-sokk gén hiányzik. Ez a protein kb. 70 000 dalton mólsúlyú, így ezt 70 hsp-nek nevezzük. Ebből a kísérletből az is következik, hogy mind a 87A, mind a 87C hő-sokk puff azonos proteint kódol, és a két gén bármelyikének a hiányát a meglevő másik képes működésével ellensúlyozni (Ish-Horovicz és mtsai 1979a).

A genetikus törekvése arra irányul, hogy az általa vizsgált gén működését mutációval megakadályozza és az új mutáns fenotípusból következtessen az eredeti funkcióra. Ez esetünkben nem látszott könnyű feladatnak. Első



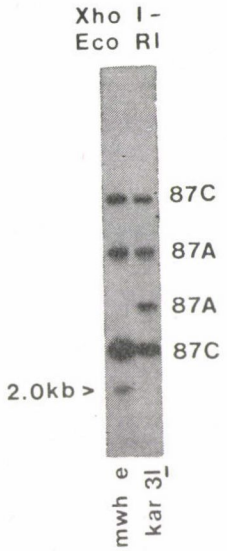
5. ábra. Hőindukált protein szintézis embriókban, amelyekből az egyik vagy mindkét 87 hő-indukált puff képződésért felelős gének hiányoznak. Egyedi embriókat 25 percig inkubáltunk 22°, ill. 36 °C hőmérsékleten és S^{35}-metioninnal jelöltük őket 30 percig 25 °C hőmérsékleten. A proteineket extraháltuk, majd 11%-os SDS-akrilamid gélen szeparáltuk és autoradiográfiával tettük láthatóvá. Nem hőkezelt: (a és b) *Df/3R/229*, (c és d) *Df/3R/kar*^{3J} (e és f) *Df3R/229 Df/3R/kar*^{3J} embriók. Hőkezelt: (g és h) vad típusú (i és j) *Df/3R/229*, (k és l) *Df/3R/kar*^{3J}, (mn és n) *Df/3R/229 Df/3R/kar*^{3J} embriók. A nyíl mutatja a 70 hsp helyét a gélen



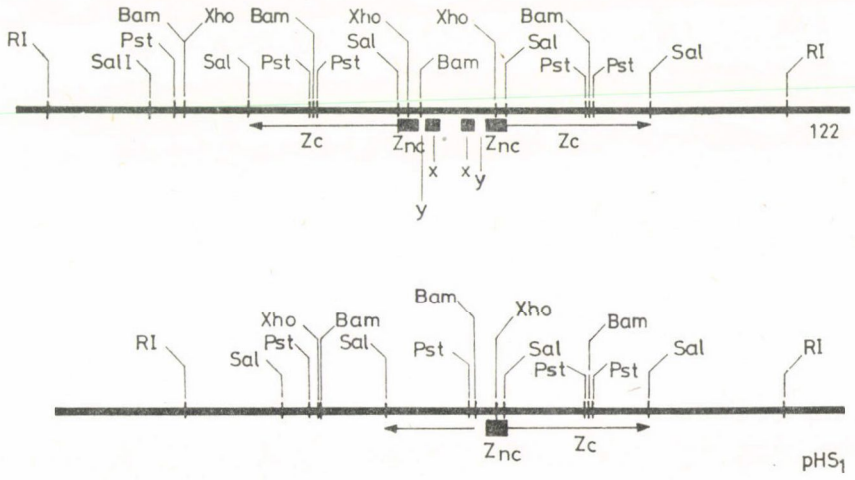
6. ábra. Mutáns törzs *(mwhe)* hőindukált 87A és 87C puff képződése 37 °C hőkezelés után. A nyíl mutatja a kontrollhoz képest kisebb méretű 87A puffot

eredményeink kissé kiábrándítóak voltak, mivel nagyon nehéz egy olyan gén mutációs változását kimutatni, amelyből több példány is van a haploid genomban. Munkánkkal egyidőben más, külföldi laboratóriumokban a 70 hsp-t kódoló géneket sikeresen izolálták génsebészeti módszerekkel (SCHEDL és mtsai 1978, CRAIG és mtsai 1979) és szerkezetüket analizálva megerősítették, hogy a 87A és a 87C puffok a 70 hsp-t kódolják. Bebizonyították továbbá, hogy a 87A helyen legalább kettő, míg a 87C helyen legalább három 70 hsp-kódoló gén található (HOLMGREN és mtsai 1979, ISH-HOROWICZ és mtsai 1979b). Mivel a 70 hsp gének száma néhány esetben variációt mutatott (MIRAULT és mtsai 1979), arra gondoltunk, hogy talán olyan állatok is előfordulnak, amelyekben a 70 hsp gének esetleg kevesebb példányban vannak jelen. Feltételeztük, hogy a 70 hsp struktúrgének számának csökkenésével arányosan csökkent mértékű gén-aktivitás kisebb hő-sokk puff mérettel jellemezhető. Sok különböző eredetű laboratóriumi törzset vizsgáltunk át és végül sikerült is egy olyan törzset találni, amelyben kisebb méretű hő-sokk puff képződött a 87A kromoszómális helyen (6. ábra).

Ez a csökkent génműködés feltételezésünk szerint egy spontán mutáció eredménye. Ilyen mutáció természetesen többféle okból is létrejöhet, bár a következő két lehetőség tűnt a legvalószínűbbnek: (1) a kisebb génaktivitást okozhatja a 2 struktúrgén egyikének hiánya, vagy (2) mindkettő megvan, de aktivitásuk kisebb. Ezen lehetőségek között csak úgy tudtunk különbséget tenni, hogy meghatároztuk a mutáns törzsben a 70 hsp gének számát.



7. ábra. 70 hsp gének számának meghatározása mutáns *(mwhe)* és kontroll *(kar^{3J})* törzsben. XhoI és EcoRI restrikciós enzimekkel emésztett DNS-t agaróz gélen különítették el és a 70 hsp géneket az 56H8 klónozott hősokk génből származó radioaktív próbával mutattuk ki. A nyíl jelzi, hogy a mutáns törzsből származó egyik 87A gén helyett egy kisebb méretű (2,0 kb.) fragmentum található



8. ábra. A mutáns (pHSl) és vad típusú (122) plazmidokban izolált 87A specifikus 70 hsp gének fizikai térképének összehasonlítása. A nyíllal jelölt szakasz a 70 hsp struktúrgént jelzi (Zc), míg a Znc, *x* és *y* jelű szakaszok a 70 hsp struktúrgének közötti egyéb DNS szekvenciákat jelölik, amelyek valószínűleg a transzkripció regulációjában jelentősek. Az RI, Bam, Pst, Xho és Sal pedig egyes restrikció enzim hasítási helyeket jelölnek. Jól megfigyelhető, hogy a pHSl mutáns törzsből származó 70 hsp gének egyike rövidebb és a 2 struktúrgén közötti DNS szekvenciák is hiányoznak

A mutáns törzsből *(mwhe)* DNS-t izoláltunk és megfelelő módszerekkel agaróz gélen autoradiográfiával elkülönítettük az egyedi 70 hsp struktúrgéneket különböző méretű DNS-darabok formájában (7. ábra).

A kontroll törzsben *(kar^{3L})* jól látható 4 eltérő DNS darab, amely valójában 5 70 hsp gént mutat. A mutánsból származó *(mwhe)* DNS-ben az egyik gén helyett egy sokkal kisebb méretű DNS darab található. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a spontán mutáció eredményeként a 87A-ban található 2 gén egyike részben elveszett. A továbbiakban ezt a hibás szerkezetű gént szerettük volna részletesen megvizsgálni és összehasonlítani a működőképes génnel.

Génsebészeti technikák alkalmazásával izoláltuk a mutáns törzsből származó 87A 70 hsp géneket és az izolált klón (pHSl) fizikai térképét összehasonlítottuk egy vad típusú gén (122) már ismert szerveződésével (Goldschmidt-Clermont 1980). Az eredmények azt mutatják, hogy a mutáns törzsben az egyik 70 hsp struktúrgén sokkal rövidebb (8. ábra), és ez magyarázhatja a nyálmirigy kromoszómákon megfigyelt kisebb génaktivitást. További vizsgálatainkban részleteiben is sikerült bizonyítani, hogy a hibás génről nem történik transzkripció és így transzláció sem (Udvardy és mtsai 1981).

Összefoglalás

Genetikai és biokémiai módszerek alkalmazásával olyan Drosophila géneket analizáltunk, amelyek hőkezeléssel aktiválhatók. Ezek közül kettőnek megállapítottuk a kromoszómális helyét; bizonyítottuk, hogy ez a két gén azonos proteint kódol. Sikerült olyan spontán mutációt szenvedett törzset találni, amelyben az egyik 70 hsp sturktúrgén hibásan működik.

A továbbiakban szeretnénk tisztázni a hő-sokk proteinek celluláris szerepét. Genetikai módszerekkel, a 70 hsp struktúrgének számát tovább csökkentve lehetségessé vált 70 hsp struktúrgén mutánsok előállítása és így a hő-sokk proteinek funkcionális analízise (Gausz és mtsai 1981).

Az utóbbi években több közlemény számolt be arról, hogy hő-sokk proteinek a legkülönbözőbb eukariota szervezetekben is képződnek, pl. nyálkagombákban (Loomis és Wheeler 1980), amőbákban (Walsh 1980), élesztőben (McAlister és Finkelstein 1979), emlős- és madársejtkultúrákban (Kelley és Schlesinger 1978). Jelenleg általában elfogadott nézet, hogy ezek a proteinek szerepet játszanak abban, hogy a magasabb rendű szervezetek alkalmazkodni tudjanak a szélsőséges környezeti viszonyokhoz (Ashburner és Bonner 1979). Természetesen ezeket a feltételezéseket további vizsgálatokkal kell igazolni; reméljük, hogy további eredményeink nemcsak Drosophilára, hanem más szervezetekre is kiterjeszthetők lesznek.

Az előadásban ismertetett munkában a következő kutatók vettek részt: az SZBK Genetikai Intézetéből: Bencze Gábor, Gyurkovics Henrik, Gausz

János, valamint Abdel Fattah Awad, az SZBK Biokémiai Intézetéből Udvardy András, Csordás-Tóth Éva, Sümegi János, Török István, külföldi kollégáink közül pedig David Ish-Horowicz,[1] Paul Schedl[2] és Jeanette Holden[3] nevét kell megemlíteni.

IRODALOM

ASHBURNER, M.: Patterns of puffing activity in salivary gland chromosomes of *Drosophila* V. Responses to environmental treatment. Chromosoma (Berl.) **31,** 356—376 (1970).

ASHBURNER, M., BONNER, J. J.: The induction of gene activity in *Drosophila* by heat-shock. Cell **17,** 241—254 (1979).

BEERMANN, W.: Chromomeres and genes. In: Developmental studies on giant chromosomes. pp. 1—34, Berlin, Springer (1972).

CRAIG, E. A., MCCARTHY, B. J., WADSWORTH, S. C.: Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat-shock induced protein of *D. melanogaster.* Cell **16,** 575—588 (1979).

GAUSZ, J., BENCZE, G., GYURKOVICS, H., ASHBURNER, M., ISH-HOROWICZ, D., HOLDEN, J. J.: Genetic characterization of the 87C region of the third chromosome of *D. melanogaster.* Genetics **93,** 917—934 (1979).

GAUSZ, J., GYURKOVICS, H., BENCZE, G., AWAD, A. A., ISH-HOROWICZ, D., HOLDEN, J. J. Genetic characterization of the region between 86F1,2 and 87D3,4 on the third chromosome of *D. melanogaster.* Genetics (közlésre elfogadva) (1981).

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.: Two genes for the major heat-shock protein of *Drosophila* melanogaster arranged as an inverted repeat Nucleic Acid Res. **8,** 235—252 (1980).

HOLMGREN, R., LIVAK, K., MORIMOTO, R., FREUD, R., MESELSON, M.: Studies of cloned sequences from four *Drosophila* heat-shock loci. Cell **18,** 1359—1370 (1979).

ISH-HOROWICZ, D., PINCHIN, S. M., GAUSZ, J., GYURKOVICS, H., BENCZE, G., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., HOLDEN, J. J.: Deletion mapping of two *D. melanogaster* loci that code dor the 70 000 dalton heat-induced protein. Cell **17,** 565—571 (1979a).

ISH-HOROWICZ, D., PINCHIN, S. M., SCHEDL, P., ARTAVANIS-TSAKONAS, S., MIRAULT, M. E.: Genetic and molecular analysis of the 87A7 and 87C1 heat-inducible loci of *D. melanogaster.* Cell **18,** 1351—1358 (1979b).

JUDD, B. H., SHEN, M. W., KAUFMAN, T. C.: The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *D. melanogaster.* Genetics **71,** 139—156 (1972).

KELLEY, P. M., SCHLESINGER, M. J.: The effect of amino acid analogues and heat-shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. Cell **15,** 1277—1286 (1978).

LOOMIS, W. F., WHEELER, S.: Heat shock response of Dictyostelium. Dev. Biol. **79,** 399—408 (1980).

MCALISTER, L., FINKELSTEIN, D. B.: Transient changes in translational patterns by heat-shock of *Saccharomyces cerevisae.* Abstract in the molecular biology of yeast meetings, New York (1979).

MCKENZIE, S. L., HENIKOFF, S., MESELSON, M.: Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *D. melanogaster.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72,** 1117—1121 (1975).

MIRAULT, M. E., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., ARTAVANIS-TSAKONAS, S., SCHEDL, P.: Organizaton of the multiple genes for the 70 000-dalton heat-shock protein in *D. melanogaster.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76,** 5254—5258 (1979).

RITOSSA, F.: A new puffing pattern induced by heat-shock and DNP in *Drosophila.* Experientia **18,** 571—573 (1962).

SCHEDL, P., ARTAWANIS-TSAKONAS, S., STEWARD, R., GEHRING, W. J., MIRAULT, M. E., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., MORAN, L., TISSIÉRES, A.: Two hybrid plasmids with *D. melanogaster* DNA sequences complementary to mRNA coding for the major heat-shock protein. Cell **14,** 921—929 (1978).

[1] Imperial Cancer Research Fund, Mill Hill Labs., London.
[2] Department of Biology, University of Princeton, Princeton).
[3] Department of Biology, Queen's University, Kingston).

SPRADLING, A., PARDUE, L. M., PENMAN, S.: Messenger RNA in heat-shocked *Drosophila* cells. J. Mol. Biol. **109**, 559—587 (1977).

TISSIÉRES, A., MITCHELL, H. K., TRACY, U.: Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. **84**, 389—398 (1974).

UDVARDY, A., SÜMEGI, J., CSORDÁS-TÓTH, É., GAUSZ, J., GYURKOVICS, H., ISH-HOROWICZ, D., SCHEDL, P.: Genomic organization and functional analysis of a deletion variant of the 87A7 heat-shock locus of *D. melanogaster*. J. Mol. Biol. közlésre elfogadva (1981).

WALSH, C.: Appearence of heat-shock proteins during the induction of multiple flagella in Naegleria groberi J. Biol. Chem. **255**, 2629—2632 (1979).

KLOROPLASZTISZ ÁTVITEL DOHÁNY PROTOPLASZT FÚZIÓVAL

MALIGA PÁL

MTA SZBK Növényélettani Intézete, Szeged

A Szegedi Biológiai Központ (SZBK) megalakulása után az Intézet vezetősége minden — a növényi szövettenyésztéssel kapcsolatos — témát felkarolt. Ezt részben az indokolta, hogy tenyésztett sejtekből számos fajnál ismét növények regenerálhatók, így várható volt, hogy az elméleti kutatási eredmények később valamilyen formában a gyakorlatban is hasznosíthatók lesznek. A módszert az SZBK-ban három csoport alkalmazza. Mint az SZBK 10 éves fennállása alkalmából rendezett előadás-sorozat előadója, helyénvalónak érzem, hogy a bevezetőben megemlékezzem a többi munkacsoport által elért néhány jelentősebb eredményről is.

DUDITS Dénes és munkatársai (SZBK Genetikai Intézet) a testi sejtek fúziójával létrehozott hibridek vizsgálatára specializálta magát. Rendszertanilag közel álló fajok esetén sikerült mindkét szülő teljes kromoszóma szerelvényét hordozó répa hibrideket előállítani (4). Besugárzott petrezselyem sejtekkel történő fúzió után a nem-répa szülő kromoszómái egy kivételével elvesztek (6), míg a más genus-ba tartozó útifűvel *(Aegopodium podagraria)* való fúziót követően útifű kromoszómát nem lehetett kimutatni, csak a belőle származó néhány gén jelenlétére lehetett következtetni (5).

FÖGLEIN Ferenc és kollégái (SZBK Növényélettani Intézet) módszereket adaptáltak növények steril tenyészetben történő gyors szaporítására, amit jelenleg a MERIKLON gazdasági társulás hasznosít.

Saját csoportom „hagyományos" témája mutáns növények előállítása tenyésztett dohány sejtek szintjén történő szelekció, majd növény regeneráció útján. Érdekesebb eredményeink ezen a területen kloroplasztiszban (8, 9, 12) és sejtmagban (10) kódolt sztreptomicin rezisztencia faktort hordozó mutánsok, valamint izoleucin igényes növények (16) előállítása. Ez utóbbiról („non-leaky" auxotróf) sokáig azt tartották, hogy virágos növényeknél a gén-duplikációk miatt nem állítható elő (15). A mutánsokat a citoplazmás organellumok protoplaszt fúzióval történő manipulációjánál hasznosítjuk, ami a jelen előadás témáját is képezi.

Miért kloroplasztisz átvitel?

A fotoszintézis plasztiszokban, a légzés mitokondriumokban zajlik. Ezek a sejt-szervecskék DNS-t tartalmaznak, amely részben megszabja a sejt-szervecskék tulajdonságait, így befolyással van pl. a fotoszintézis hatékonyságára, a citoplazmás hímsterilitás kialakulására. Keresztezés során a sejtszervecskék DNS-e minden gazdaságilag jelentős növényfajban (pl. búza, kukorica) csak anyai úton öröklődik, ezért az ivaros szaporodás során organellum keverékek nem jöhetnek létre. Így nincs mód a sejt-szervecskék közötti genetikai rekombinációra, a tulajdonságok — esetleg kedvezőbb — újrakombinálására, bár erre gombáknál és algáknál számos példa ismert (7).

Ivaros ciklus nélkül, testi sejtek fúziójával — mint látni fogjuk — a probléma megkerülhető. Lehetőség van pl. a plasztiszok megtartása mellett a mitokondriumok kicserélésére, az organellumok idegen mag környezetbe juttatására és a DNS átrendeződése, rekombinációja eredményeként új típusú, addig nem létező sejtorganellumok létrehozására.

A virágos növényekkel folytatott ilyen irányú kísérletek még gyermekcipőben járnak. Az egyetlen, kloroplasztiszban kódolt, tenyészetben szelektálható marker a sztreptomicin rezisztencia. Mitokondriumban lokalizált, hasonlóan szelektálható markert eddig nem írtak le. Érthető tehát, hogy az organellumok genetikai manipulációját célzó kísérleteket az általunk korábban előállított (8, 9) sztreptomicin rezisztens SR1 dohány mutánsra alapoztuk. A kérdés, amit vizsgálni kezdtünk, igen egyszerű: hogyan lehet plasztiszokat az egyik sejtből a másikba átvinni anélkül, hogy a donor sejtmagból kromoszómát vinnénk át. Ez alapkutatási és gyakorlati szempontból is lényeges, hiszen átalakított citoplazmás organellumok fenotípusának összehasonlítása csak azonos maghátter mellett lehetséges (hibrid maghátter több okból nem jöhet szóba), mivel néhány, a donorból átkerült kromoszóma teljesen értéktelenné teheti a termesztett növényfajtákat. Az átvitel természetesen azt jelenti, hogy a recipiensben található organellumok eltűnnek, és helyüket a donorból származó organellumok foglalják el.

Az átvitel elve

A protoplaszt fúziót követően a sejtmagok vagy fuzionálnak és (mag-) hibridek jönnek létre, vagy elkülönülnek, és szülői típusú maggal rendelkező szegregáns sejtek keletkeznek. A hibridek és a magszegregánsok is kevert citoplazmával rendelkeznek. Bár eredetileg a sejtekben viszonylag nagy számú organellum található (pl. 50—100 db plasztisz egy levél sejtben), a kevert citoplazma csak rövid ideig marad fenn. A szegregáció a tapasztalat szerint random, így új mag-organellum kombinációk is keletkeznek (3).

Új eredmények

Az irodalomban elsőként leírt organellum-átviteli kísérletekben BELLIARD és munkatársai sejtes szinten egyáltalán nem alkalmaztak szelekciót, csak növénnyé regenerálás után tudták megkülönböztetni morfológiai és biokémiai bélyegek alapján a szülői, hibrid és transzfer kategóriákat (1, 2). Mivel a változatlan szülői típusú sejtek hányada viszonylag nagy — és minden klónból válogatás nélkül növényt kell regenerálni — ezért a rendszer rendkívül munkaigényes. GALUN és munkatársai vezették be a letális dózissal történő besugárzást a donor szülői sejttípus osztódásának gátlására (18). Mi ez utóbbi rendszert egészítettük ki a besugárzott (nem osztódó) sejtből származó citoplazmás sztreptomicin rezisztenciára történő szelekcióval, így a fúzióból származó utódsejtek már 1 mm átmérőjű kolóniák szintjén azonosíthatókká váltak (11). A kísérletek során besugárzott *Nicotiana tabacum* (SRl) sejtekből vittük át a citoplazmás sztreptomicin rezisztencia faktort, azaz a plasztiszokat a *Nicotiana plumbaginifolia* vad dohányfajba (13). A kezeletlen, szenzitív sejtekkel történő fúzió ugyanis biztosította a besugárzott SRl plasztiszok túlélését. Megállapítottuk a donor mag eliminációját nagy gyakorisággal eredményező sugárdózisokat is (13; 1. táblázat). Jódecetsavval osztódásra képtelenné tett sejtekből is át lehetett vinni a plasztiszokat fúzióval (11), de ez a kezelés nem segítette a donor magvak eliminációját, ami a hibrid képződés nagy gyakorisága miatt kívánatos lett volna (13; 1. táblázat).

A kétféle kezelés kombinációjával sikerült szelekciós marker felhasználását nem igénylő, hatékony, irányított átviteli rendszert kidolgozni (17). A fényérzékeny plasztiszt hordozó *N. tabacum* donort letális besugárzással, a recipienst (vad típusú *N. plumbaginifolia)* jódecetsavval kezeltük. A fúziót követően csak a két faj protoplasztjainak összeolvadásából származó sejtek

1. táblázat

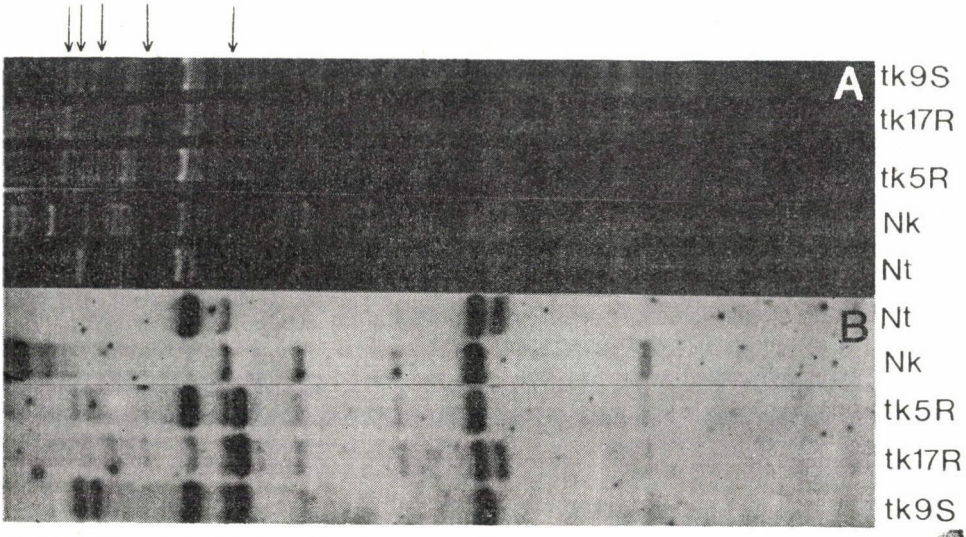
N. tabacum plasztiszok átvitele *N. plumbaginifolia* magháttérbe inaktivált sejtből származó sztreptomicin rezisztenciára történő szelekcióval

^{60}Co sugárdózis (J kg^{-1})	Vizsgált klónok száma	Klónok száma, melyekből növényt sikerült regenerálni*				Plasztisz átvitel gyakorisága (%)§
		H	H és Nt	H és Np	Np	
0+	100	69 (5)	3 (0)	1 (1)	1 (1)	0
50	38	10 (0)	0	6 (0)	11 (5)	44
120	41	15 (0)	0	0	20 (0)	57
210	33	5 (0)	0	0	26 (0)	84
300	35	9 (0)	0	0	21 (1)	69

* H = hibrid; Nt = *N. tabacum*, Np = *N. plumbaginifolia*. A zárójelben azon klónok száma található, melyekből szenzitív és rezisztens növényt is kaptunk.

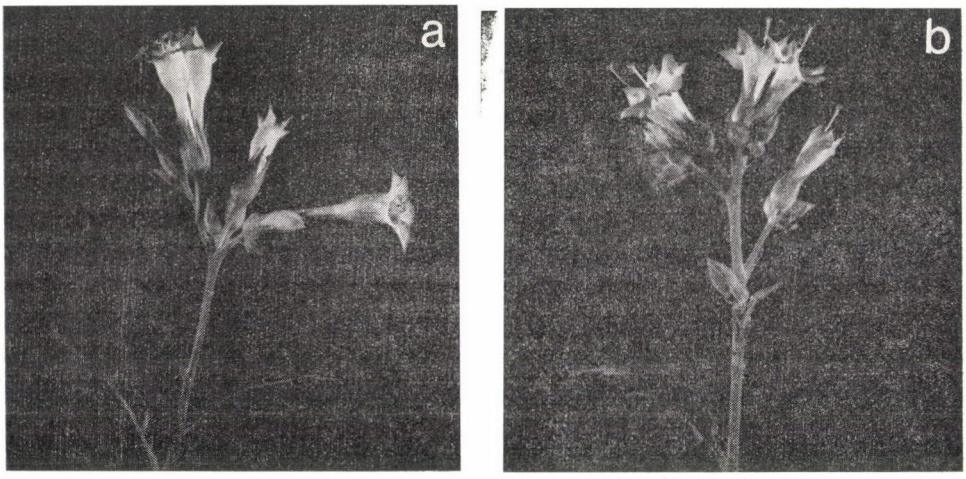
+ SRl protoplasztokat 10 mM jódecetsavval kezeltünk.

§ Regeneráló klónok gyakorisága, melyekből *N. tabacum* plasztiszokat tartalmazó *N. plumbaginifolia* növényeket kaptunk.



1. ábra. MtDNS átalakulása *N. tabacum* és *N. knightiana* szomatikus hibridekben. Az átrendeződés eredményeként létrejött, szülőkben nem található BamHI restrikciós fragmenteket nyíl jelzi (A). A riboszomális RNS géneket hordozó fragmenteket *E. coli* rRNS gént tartalmazó próbával történő hibridizációval mutattuk ki (B). A fragmentek szeparálása elektroforézissel 0,7%-os agar gélben történt. Nt és Nk a szülői mintázatot jelöli; tk9S, tk17R, tk5R különböző szomatikus hibrid vonalak

osztódtak. A besugárzás, a várakozásnak megfelelően, az esetek jelentős részében a besugárzott mag elvesztését eredményezte. A besugárzott plasztiszok kompetíciós képessége viszont a jódecetsavval kezelteknél lényegesen jobb



2. ábra. N. tabacum növény (A) és egy *N. tabacum* magszegregáns (B). A szegregáns *N. tabacum* plasztiszt és rekombináns mitokondriumot hordoz. Feltűnő a virágok közötti morfológiai eltérés, ami a mitokondrium DNS-ben történt változások következménye

volt, így a heterokarion eredetű kolóniák nagy gyakorisággal recipiens magot és donor plasztiszt tartalmaztak.

Citológiai adatok azt mutatják, hogy a besugárzott sejtekből történő kloroplaszt átvitel során a recipiensbe nem kerültek át donor kromoszómák (13).

Kloroplasztisz DNS rekombinációt transzfer és szomatikus hibridizációs kísérletekben sem másnak, sem nekünk nem sikerült kimutatni. A mitokondrium DNS (mtDNS) átalakulása a fúziót követően tapasztalatunk szerint a fajkombináció függvénye: A *N. tabacum* és *N. knightiana* kombinációnál minden klónban bekövetkezett (14; 1. ábra). A *N. tabacum* és *N. sylvestris* kombinációban eddig nem találtunk mtDNS átrendeződést (nem közölt). A mtDNS átalakulása a virágmorfológia megváltozásával járhat (2. ábra).

Tervek, munkahipotézisek, perspektívák

A további kísérletek célja elsősorban módszerek kidolgozása új típusú citoplazmával rendelkező növények előállítására, melyek közül néhány remélhetőleg felülmúlja majd a kiindulási növényeket valamilyen gazdaságilag értékes tulajdonság (fotoszintézis, energiaháztartás, növekedés) tekintetében. E módszerek kiaknázása megkívánja, hogy a kísérleteket megfelelő időben megkezdjük a népgazdaság szempontjából kiemelkedően fontos gabonafélékkel, búzával és kukoricával is, amire még nem állnak rendelkezésre megfelelő szövettenyésztési módszerek. A hasznosítás terén szerény kezdetként, a debreceni Dohánykutató Intézettel együttműködve, megkezdtük egy termesztett dohány hímsteril formájának előállítását. Ez a hagyományos 6—8 év helyett 2 évet vesz igénybe. A hímsteril forma hibrid vetőmag előállítás során anyai szülőként szerepel majd, így szükségtelenné válik a porzók eddigi kézzel történő eltávolítása.

Tervezzük plasztiszok átvitelét távoli fajok között, és plasztisz-DNS rekombináció indukciójára szolgáló eljárások kifejlesztését.

Az előző fejezet végén felvetett jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy létezik valamilyen fajspecifikus felismerő rendszer, amely megszabja, bekövetkezzék-e átrendeződés vagy rekombináció a mtDNS-ben. Eddigi tapasztalataink szerint a mtDNS megváltozása, azonos maghátter mellett, összefüggésbe hozható a plasztiszok típusával. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy a mtDNS átalakulását a plasztisz determinálja. Ezek további vizsgálatra érdemes, kísérletesen részben megalapozott munkahipotézisek, melyek vizsgálata folyamatban van. Az új típusú mtDNS vizsgálatával szeretnénk meghatározni a hímsterilitásért felelős régiókat, és azokat klónozás után megkíséreljük termékeny növényekbe bejuttatni. Vizsgáljuk plasztiszra történő szelekció esetén a mitokondriumok együttes átvitelének gyakoriságát is.

IRODALOM

1. Belliard, G., Pelletier, G., Vedel, F.: Molec. Gen. Genet. **165,** 231—237 (1978).
2. Belliard, G., Vedel, F., Pelletier, G.: Nature **281,** 401—403 (1979).
3. Chen, K., Wildman, S. G., Smith, H. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74,** 5109—5112 (1977).
4. Dudits, D., Hadlaczky, Gy., Lévi, E., Fejér, O., Haydu, Zs., Lázár, G.: Theor. Appl. Genet. **51,** 127—132 (1977).
5. Dudits, D., Hadlaczky, Gy., Bajszár, Gy., Koncz, Cs., Lázár, G., Horváth, G.: Plant Sci. Lett. **15,** 101—112 (1979).
6. Dudits, D., Fejér, O., Hadlaczky, Gy., Koncz, Cs., Lázár, G., Horváth, G.: Molec. Gen. Genet. **179,** 283—288 (1980).
7. Gillham, N. W.: Organelle heredity. Raven Press, New York (1978).
8. Maliga, P., Sz.—Breznovits, Á., Márton, L.: Nature New Biol. **224,** 29—30 (1973).
9. Maliga, P., Sz.—Breznovits, Á., Márton, L.: Nature **255,** 401—402 (1975).
10. Maliga, P.: Theor. Appl. Genet. **60,** 1—3 (1981).
11. Medgyesy, P., Menczel, L., Maliga, P.: Mol. Gen. Genet. **179,** 693—698 (1980).
12. Menczel, L., Nagy, F., Kiss, Zs., Maliga, P.: Theor. Appl. Genet. **59,** 191—195 (1981).
13. Menczel, L. Galiba, G., Nagy, F., Maliga, P.: Genetics (1981). (Megjelenés alatt)
14. Nagy, F., Török, I., Maliga, P.: Molec. Gen. Genet. **183,** 437—440 (1981).
15. Rédei, G. P.: Ann. Rev. Genet. **9,** 111—127 (1975).
16. Sidorov, V. A., Menczel, L., Nagy, F., Maliga, P.: Planta **152,** 341—345 (1981).
17. Sidorov, A., Menczel, L., Maliga, P.: Nature **293,** 87 (1981).
18. Zelcer, A., Aviv, D., Galun, E.: Z. pflanzenphysiol. **90,** 397—407 (1978).

A SZIMBIOTIKUS NITROGÉNKÖTÉS MOLEKULÁRIS GENETIKÁJA

KONDOROSI ÁDÁM

MTA Szegedi Biologiai Központ, Genetikai Intézet, Szeged

Bevezetés

Közismert, hogy a biológiai nitrogénkötés az élő szervezetek nitrogénellátásának az alapja.

Nitrogénkötésre — azaz a molekuláris nitrogénnek ammóniává történő redukciójára — azonban csak bizonyos mikroorganizmusok képesek. Egyes szervezetek önállóan, szabadon élve kötik meg az N_2-t, míg a nitrogénkötő élőlények egy csoportja — a Rhizobium baktériumok — csak a pillangós virágú növényekkel együttélve, szimbiózisban képesek erre a folyamatra. A szimbiotikus nitrogénkötésnek óriási jelentősége van: az élővilág nitrogénellátását elsősorban ez a nitrogénkötési forma biztosítja.

Az utóbbi évtizedekben a mezőgazdasági növények nitrogénellátására széleskörűen alkalmazzák a műtrágyázást. Minthogy a műtrágya előállításához nagyon sok energia szükséges, és a túlzott műtrágyázás a talajt lerontha tja, előtérbe került a biológiai nitrogénkötés hatékonyságának fokozása. Az egyik elvi lehetőség a szimbiotikus nitrogénkötést kódoló gének, illetve szabályozásuknak felderítése, és ezek alapján a nitrogénkötés fokozása genetikai módszerekkel. A Szegedi Biológiai Központban — ennek a távlati célnak a megvalósítása érdekében — vizsgáljuk a szimbiotikus nitrogénkötés genetikai hátterét.

Az alábbiakban ismertetendő kutatások csoportmunka eredménye, többirányú külső kollaborációval. Közvetlen munkatársaim, DUSHA Ilona, KISS György Botond, SVÁB Zóra és az OMFB támogatásával a csoportban dolgozó BÁNFALVI Zsófia, FORRAI Tamás, VINCZE Éva mellett az SZBK Biokémiai Intézetéből KISS Antal és TÖRÖK István, a Genetikai Intézetből KONCZ Csaba és egy ösztöndíjas szovjet kutató, VEHARY SAKANYAN vettek részt a kutatásokban.

A szimbiotikus nitrogénkötés genetikai vizsgálatát megnehezíti az a tény, hogy a baktérium és a növény közötti együttélés mindkét partner által kódolt és nagyon összetett folyamatok eredménye. Közismert, hogy bizonyos Rhizobium fajok csak bizonyos növényfajokkal képesek együttélni. A *Rhizobium meliloti* például a lucernával, a *R. leguminosarum* a borsóval stb. Munkacsoportunk a *R. meliloti* és a lucerna közötti szimbiózist vizsgálja.

A Rhizobium és a növény közötti együttműködés eredményeképpen a növény gyökerén képződő gumóban történik az N_2 redukciója. Az 1/a ábrán

egy gumó hosszanti keresztmetszete látható. A belső növényi sejtek tömve vannak a nitrogénkötést végző *Rhizobium* formával, az ún. bakteroidokkal (1/b és 1/c ábra). A megkötött nitrogént a bakteroid ammónium ionok formájában kiválasztja és ezt építi be a növény nitrogéntartalmú vegyületekbe. A növény a nitrogénkötéshez szükséges energiát és O_2-limitált környezetet biztosít a nitrogenáz enzim számára.

Ennek a röviden vázolt együttélési formának a genetikai kontrollját vizsgáljuk; egyelőre azokat a géneket, amelyek a baktériumban vannak.

Célkitűzés

Egy probléma genetikai vizsgálatának két fő előfeltétele van: egyrészt a kérdéses génekben hibás mutánsokat kell izolálnunk, másrészt a mutánsok között biztosítanunk kell a genetikai kicserélődést, azaz génátviteli rendszert kell kidolgozni. Rhizobiumban mindkét előfeltétel biztosítása nehézségekbe ütközött. Egyrészt szimbiózisban hibás mutánsokat nehéz izolálni, mivel a szimbiotikus gének szabadonélő állapotban nem nyilvánulnak meg, másrészt Rhizobiumban hatékony génátviteli rendszer nem állott rendelkezésre.

A mai előadásban először e két előfeltétel megteremtéséről szeretnék beszélni. Ha rendelkezésre állnak a szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok, vagyis a vizsgálandó géneket mutációval megjelöltük, akkor meghatározhatjuk a gének elrendeződését a Rhizobium DNS-én. A gének elhelyezkedésének, térképhelyének ismeretében a gének szerveződésének, szabályozásának vizsgálata könnyebb lesz, a géneket izolálhatjuk, illetve beépíthetjük más élőlényekbe. Az előadás második részében be szeretném mutatni, hogy ennek a molekuláris genetikai megközelítésnek az eredményeképpen ma már nemcsak néhány szimbiotikus gént azonosítottunk, illetve izoláltunk, hanem különböző Rhizobium törzseket génátvitellel módosítani is tudunk.

Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás Rhizobium mutánsok izolálása és jellemzése

A mutációkat különböző mutagén ágensekkel indukáltuk. A szimbiotikus mutánsok kiválogatásához a mutagenizált populáció egyedeivel egyenként fertőztük a lucerna gazdanövényt. Ilyen módon meglehetősen fáradságos munkával kétféle mutánst izoláltunk, egyrészt olyanokat, amelyek nem képeztek gumót a növény gyökerén (nodulációban defektív, a továbbiakban Nod^- mutánsok), illetve olyanokat, amelyek kötöttek gumót, de nem fixáltak N_2-t (Fix^- mutánsok). Az 1. táblázat a mutánskeresés eredményét mutatja. Egy kémiai mutagén, a nitrozoguanidin mellett egy transzlokálható genetikai elemmel, a Tn5 transzpozonnal is végeztünk mutagenezist. A transzpozíciós

1. táblázat

Nod⁻ és Fix⁻ mutánsok izolálása *Rhizobium meliloti*ból

Mutagenezis	Vizsgált telepek száma	Szimbiotikus mutánsok	
		Nod⁻	Fix⁻
NTG	3900	2	42
Tn5	4550	3	15

FORRAI, T., VINCZE, E., PLAZINSKI, J., BÁNFALVI, Z., KISS, G. B., KONDOROSI, A.: Proc. Int. Congr. Soil Biology (nyomdában) (1981).

mutagenezis során egy speciális ugráló DNS szakasz, a Tn5, egy génbe beépülve azt elrontja, másrészt — mivel a transzpozonok antibiotikum rezisztencia gént, jelen esetben kanamicinnel szembeni rezisztenciát, hordoz — a vizsgált gént egy könnyen szelektálható markerrel megjelöli. A transzpozíciós mutánsoknak az az óriási előnyük, hogy a mutáció helyének vizsgálatát nagyon megkönnyítik: míg a szimbiózist befolyásoló mutációkat egyszerű mikrobiológiai módszerekkel nem tudjuk követni, a génbe beépült antibiotikum rezisztencia marker követése igen egyszerű. A táblázatból látható, hogy mind Nod⁻, mind Fix⁻ mutánsokat elő tudtunk állítani.

Megjegyzem, hogy mutációval nemcsak elrontani lehet a szimbiotikus nitrogénkötő képességet, hanem javítani is. Van néhány olyan mutánsunk, amelyek laboratóriumi körülmények között több nitrogént kötnek meg, és így a lucerna növények nagyobb szárazsúllyal rendelkeznek. Ezen törzseknek a mezőgazdaságban való alkalmazhatóságát azonban még vizsgálni kell.

Visszatérve a Nod⁻ és Fix⁻ mutánsokhoz; ha van egy sorozat ilyen mutánsunk, feltehetjük a kérdést, hogy a szimbiotikus nitrogénkötés milyen lépése blokkolt az egyes mutánsokban. A 2. táblázat a gumófejlődés egyes jól felismerhető lépéseit mutatja be. A gumófejlődési folyamat bizonyos fokig hasonlít egy anyagcsereúthoz. A gumófejlődés bármely szakaszában bekövetkező mutáció leállítja a további folyamatot (a mutáns a baktérium Nod⁻ vagy Fix⁻ fenotípusú). A Nod⁻ mutánsok egy része az ún. előfertőzési foyamatban lehet hibás: pl. a baktérium nem tud a hajszálgyökerekhez tapadni, vagy nem idézi elő a hajszálgyökerek elágazódását és görbülését. A 2/a ábrán vad típusú baktériummal fertőzött, görbült hajszálgyökerek láthatók. Az ábra másik részén (b) egy Nod⁻ mutánssal fertőzött növény gyökerét látjuk: itt a baktérium nem jutott be a növénybe és így az egész fertőzési folyamat leállt. Természetesen a Nod⁻ mutánsok hibásak lehetnek a fertőzési folyamat későbbi lépéseiben is. Más szimbiotikus mutánsok a szimbiózis későbbi folyamatában, valamelyik gumófunkcióban lehetnek gátoltak: ilyenkor a gumó kialakul, de nincs nitrogénkötés. Vannak mutánsaink, ahol a bakteroidok nem alakulnak ki. A gumófunkcióban hibás mutánsok egy része a nitrogenáz enzimet kódoló ún. nitro-

2. táblázat

A gumófejlődés szakaszai

Szakasz	Szimbiotikus fenotípus, ha a szakasz gátolt
I. Előfertőzés	
1. A baktérium elszaporodik a gyökér közelében	Nod^-
2. A baktérium a gyökér felületéhez kötődik	Nod^-
3. A hajszálgyökerek elágazódnak	Nod^-
4. A hajszálgyökerek meggörbülnek	Nod^-
II. Fertőzés és gumóképződés	
5. Kialakul az infekciós fonal	Nod^-
6. Kialakul és differenciálódik a gumó	Nod^-
7. A baktériumok kiszabadulnak az infekciós fonalból	Nod^+Fix^-
8. A baktériumok átalakulnak bakteriodokká	Nod^+Fix^-
III. Gumófunkciók	
9. A nitrogenáz enzim az N_2-t NH_4^+-é redukálja	Nod^+Fix^-
10. Kiegészítő biokémiai és fiziológiai funkciók	Nod^+Fix^-
11. A gumófunkciók fenntartása	$Nod^+Fix^\pm$

génkötési *(nif)* génekben hibás. Végeredményben a mutánsokat ezen tulajdonságok alapján csoportosítani tudjuk. (Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat a Biofizikai Intézetben Joó Ferenccel együttműködve végezzük.)

Génátvitel, genetikai térképezés Rhizobium melilotiban

A jellemzett mutánsok felhasználásával meghatározhatjuk az érintett szimbiotikus gének elrendeződését a baktériumban. Ehhez a mutánsokat térképezni kell, meg kell állapítani a mutációk helyét a kromoszómán. Amikor 1976-ban ezeket a vizsgálatokat elkezdtük, hatékony génátviteli rendszer Rhizobiumban nem volt ismert. Ezért egyik kutatási célunk ennek kifejlesztése volt. Ezt a bakteriális genetikában jól ismert konjugációs módszerrel, egy speciális plazmid, ún. R faktor felhasználásával sikerült létrehozni. Egy angol és egy amerikai laboratóriummal egy időben megszerkesztettük a Rhizobium kromoszóma első genetikai térképét. A 3. ábrán látható kör a *Rhizobium meliloti* 41-es törzs kromoszómájának térképét szemlélteti. A géntérkép főleg a konvencionálisan használt aminosav- és bázisauxotrófia, valamint rezisztencia markereket tartalmazza, de egyúttal keretet nyújt szimbiotikus mutációk térképezéséhez is. A továbbiak során *in vivo* és *in vitro* módszerekkel előállítottunk egy olyan R plazmid sorozatot, ahol a plazmidok a Rhizobium kromoszóma egyes darabjait tartalmazzák (3. ábra). Ezek a plazmidok új mutációk lokalizálására, az ún. genetikai komplementációra és Rhizobium fajok közötti rokonság vizsgálatára igen alkalmasak. Ezek felhasználásával konjugáció után a Rhizobium gének más, igen távoli baktériumfajokba is átvihetők és ott a

gének megnyilvánulása vizsgálható. Genetikai térképezéssel, illetve az R plazmidok felhasználásával egy angol laboratóriummal kollaborációban megállapítottuk, hogy a 6 fő Rhizobium faj közül négynek a kromoszómája menynyire homológ egymással. A *Rhizobium leguminosarum*, *phaseoli* és *trifolii* kromoszómái szinte teljesen homológok, míg a *R. melilotié* kissé eltér, bár a markerek elrendeződése igen hasonló a *R. leguminosaruméhoz*. Véleményünk szerint a fajok közötti rokonság megállapítására ez talán a legmegbízhatóbb módszer.

Megemlítendő, hogy kisebb DNS szakaszok finomtérképezésére a Genetikai Intézetben Sík Tibor és munkacsoportja fejlesztett ki transzdukciós módszert.

Szimbiotikus gének lokalizálása a R. melilotiban

A szimbiotikus mutációk térképezését konjugációs módszerrel jelenleg is végezzük. A kezdeti eredmények arra utalnak, hogy *fix* gének a kromoszómának nem csak egy helyén találhatók. Egy másik fontos következtetés, hogy a *nod* mutációk és a *fix* mutációk egy jelentős része nem térképeződött a kromoszómára, amiből extrakromoszómális öröklődésre lehet következtetni. Tehát a Rhizombiumnak kell hogy legyen olyan saját plazmidja, amely szimbiotikus géneket tartalmaz.

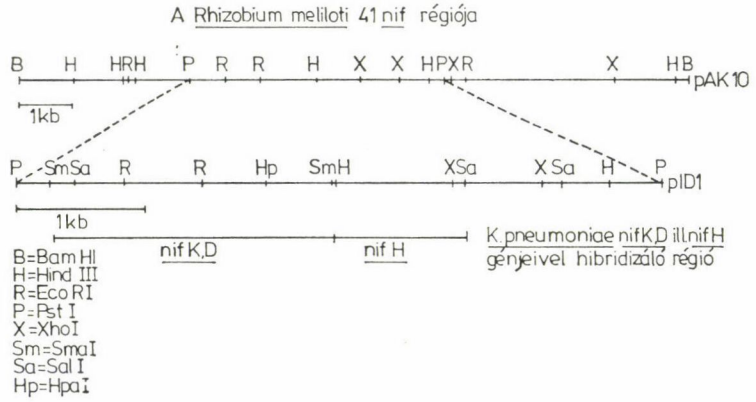
Az előadás hátralevő részében be szeretném mutatni, hogy valóban ez a helyzet: a szimbiotikus gének nagy része plazmidon kódolt. Az általunk tanulmányozott *Rhizobium meliloti* 41-es törzsben agaróz gélelektroforézissel két plazmidot: egy 140 Md-ost és egy rendkívül nagyot (nagyobb mint 300 Md-ost) tudtunk kimutatni (4. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a nagy plazmidról bizonyos kezelések (pl. magas hőmérséklet) hatására különböző méretű DNS szakaszok eshetnek ki. A deléciókat a gélen ki lehetett mutatni. A 4. ábrán látható, hogy néhány ilyen törzsben a nagyobbik plazmid elektrooforetikus mobilitása megnövekedett, ami delécióra utal. A deléciós plazmidot hordozó törzsek mindegyike gumókötésre képtelen volt. Ebből arra következtettünk, hogy a gumókötési *(nod)* géneknek legalább egy része a nagyobbik plazmidon található, amelyek a deléció során elvesztek.

Egy angol laboratórium kimutatta, hogy a *Rhizobium leguminosarum* baktériumban a nodulációs gének plazmidon vannak, és ez a plazmid konjugációval átvihető más Rhizobium törzsekbe. A vizsgálat külön érdekessége, hogy ha ezt a plazmidot átvisszük pl. *Rhizobium phaseoli*ba, akkor a *Rhizobium phaseoli* nemcsak az eredeti gazdán (a babon), hanem a borsón is képes lesz gumót kötni. Tehát az ún. gazdaspecificitás kiszélesíthető volt. Azt tapasztaltuk, hogy ennek a plazmidnak bizonyos génjei *R. melilot*iban is megnyilvánulnak. Tehát különböző Rhizobium fajok között is átvihetők a szimbiotikus gének és így a Rhizobium fajok szimbiotikus tulajdonságai módosíthatóak.

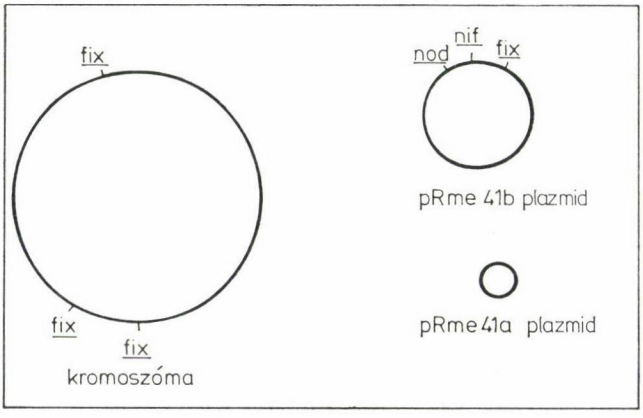
Megállapítottuk, hogy a nodulációs géneken kívül egy másik géncsoport, a nitrogenázt kódoló *nif* struktúrgének is plazmidon vannak. Ehhez a korábbi előadásokban már részletesen tárgyalt DNS-DNS hibridizációs technikát használtuk, illetve a *R. meliloti nif* struktúrgéneket izoláltuk

A. R. meliloti nitrogenáz struktúrgénjeinek izolálása és szerkezete

Egy amerikai kutatócsoport vizsgálatai szerint a legkülönbözőbb nitrogénkötő szervezetekben a nitrogenáz enzimet kódoló gének eléggé homológok egymással, tehát az evolúció során ezen gének konzerválódtak. Egy szabadonélő nitrogénkötő baktérium, a *Klebsiella pneumoniae* nitrogénkötési génjeit már korábban meghatározták. Ismert, hogy a 17 *nif* gén közül a nitrogenáz 3

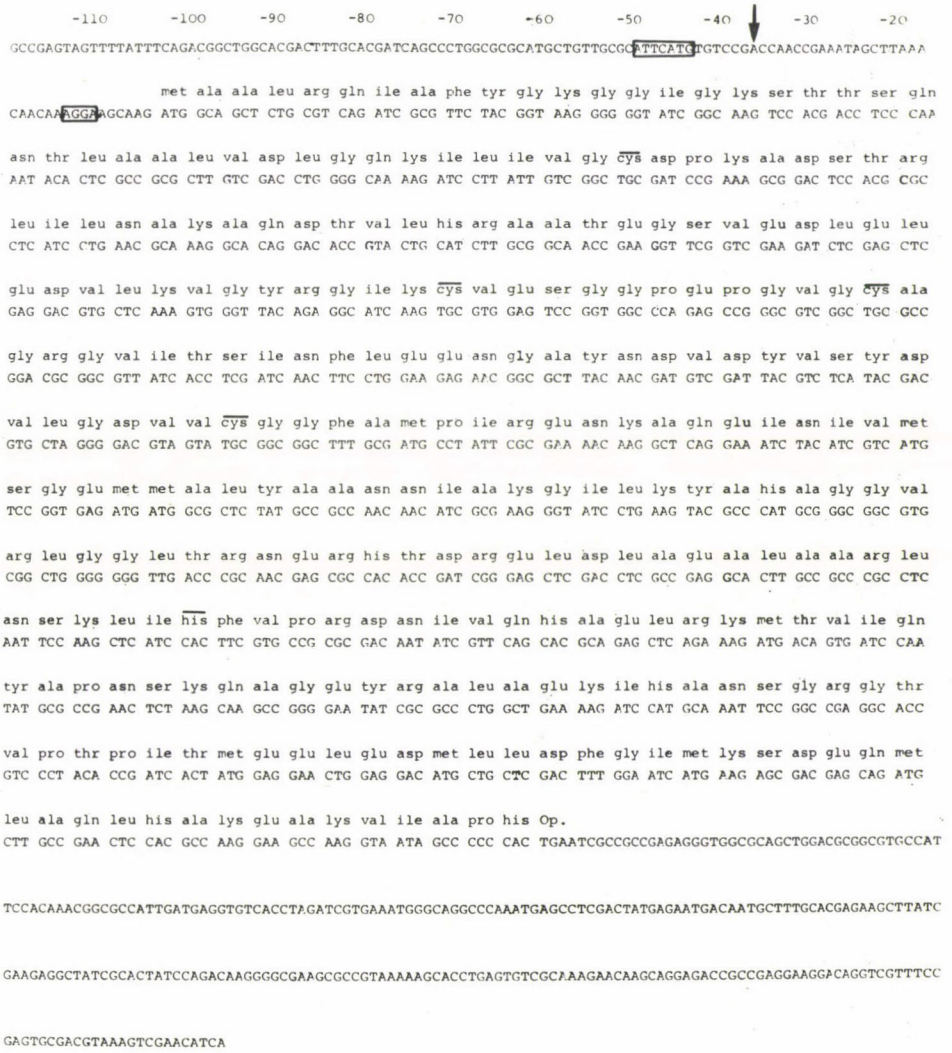


5. ábra. A *R. meliloti* 41 törzs *nif* régiójának szerkezete (restrikciós térképe). A rövidítések különböző restrikciós endonukleázok hasítóhelyét jelölik. BÁNFALVI, Z., SAKANYAN, V., KONCZ, C., KISS, A., DUSHA, I., KONDOROSI, A.: Mol. Gen. Genet. (közlésre beküldve) (1981)



6. ábra. Néhány szimbiotikus nitrogénkötési gén elhelyezkedése *R. meliloti* 41-es törzsben

polipeptidjét, a *nifK*, *D*, *H* gének kódolják. Kimutattuk, hogy a *Klebsiella pneumoniae nifK*, *D*, *H* génjeit tartalmazó DNS szakasz hibridizál a *R. meliloti* nitrogénkötési génjeihez és ezt kihasználva — génsebészeti technikák alkalmazásával — izolálni tudtuk a *Rhizobium nif* struktúrgénjeit. Az izolált *nif* régió szerkezetét az 5. ábrán mutatjuk be. A klónozott DNS szakaszokon a *Rhizobium nifD* és *H* — és valószínűleg a *K* gén is rajta van. A Rhizobium nitrogenázának aminosavsorrendje nem ismert, mivel az enzimet rendkívül nehéz a piciny gumókból tisztítani. A nitrogenáz egyik komponensét a nitrogenáz-



7. *ábra.* A *R. meliloti nifH* génjének nukleotid szekvenciája és a nitrogenáz-reduktáz aminosav sorrendje TÖRÖK, I., KONDOROSI, A.: Nucleic Acid Res. (közlésre beküldve) (1981)

reduktázt kódoló *nifH* gén nukleotid szekvenciáját a 7. ábra mutatja. A nukleotid szekvenciából a nitrogenáz-reduktáz fehérje aminosavsorrendjét fel lehetett írni.

A nitrogénkötési gének a nagyobb plazmidon helyezkednek el

A klónozott *nif* génszakaszokat használtuk fel annak bizonyítására, hogy a *nif* struktúrgének a nagyobbik Rhizobium plazmidon vannak. A vad típusú baktérium két plazmidját agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk és a DNS-t hibridizáltuk izotóp foszforral jelölt *nif* DNS szakasszal. A 4. ábrán látható, hogy a nagyobbik plazmid hibridizált, amit a sötét csík mutat. Tehát a nagyobbik plazmid tartalmazza a *nif* struktúrgéneket. Ha a különböző Nod$^-$ mutánsokból izolált plazmiddal (az ábrán az 1., 2., 3. és 4. minta) is elvégeztük a hibridizációt, hibridizáló csíkot nem kaptunk. Tehát a nagyobbik plazmidon a delécióval nemcsak a nodulációs, hanem a *nif* struktúrgének is kiestek. Ez azt jelenti, hogy a plazmidon ezek a gének valószínűleg közel helyezkednek el egymáshoz. További vizsgálataink szerint más fixációs gének is találhatók ebben a régióban.

A 6. ábra mutatja, hogy a *Rhizobium melilot*iban a nagyobbik plazmidon viszonylag közel helyezkedik el egymáshoz a szimbiotikus nitrogénkötési gének nagy része. Más laboratóriumok vizsgálatai más Rhizombium törzsekben és fajokban hasonló eredményre vezettek. Mi lehet ennek a jelentősége? Egyelőre csak spekulálni lehet ezen. Pl.: a plazmid gének általában mobilisabbak, de a plazmid fenntartása egyúttal teher is a baktériumnak. Ha a talajban két baktérium találkozik, a plazmid konjugációval átjuthat egyik baktériumból a másikba, és így a kötött nitrogénben szegény környezethez való alkalmazkodást elősegítheti.

Ahhoz, hogy a plazmidon levő szimbiotikus géneket vizsgálni tudjuk, az előzőekben említett R-prime származékokat izoláltunk *in vivo* és *in vitro* módszerekkel, vagyis az R plazmidba a Rhizobium plazmid egyes szakaszait beépítettük. A gén funkcióját úgy ellenőrizhetjük, hogy ha a R plazmid-primot az adott génben hibás mutánsba bevisszük, akkor a mutáns visszanyeri szimbiotikus nitrogénkötési képességét. A gének izolálása egyúttal elősegíti a gének termékének a megállapítását és így meg tudjuk mondani, hogy a szimbiózis egyes lépéseinél a baktérium milyen biokémiai funkciót szolgálhat.

Összefoglalás

Elmondhatjuk, hogy már tudjuk néhány fontos szimbiotikus funkciót kódoló gén helyét a Rhizobium DNS-én és mind kromoszómális, mind plazmid DNS szakaszokat át tudunk vinni egyik baktériumból a másikba. Így elvben a nitrogénkötés szempontjából hasznos tulajdonságok egy hibrid Rhizobiumban egyesíthetők.

Eddigi munkánk során csak a baktériumban levő szimbiotikus géneket vizsgáltuk. A molekuláris biológia fejlődése ma már megengedi, hogy a növénypartnerből is izoláljunk szimbiózist kódoló géneket, illetve bizonyos növényekbe idegen gének is beépíthetők. Igen valószínű, hogy a szimbiotikus nitrogénkötés szabályozásának mélyebb megismeréséhez és új, hatékonyabban nitrogénkötő szervezetek létrehozásához a baktérium mellett a növénypartner molekuláris genetikai vizsgálata is szükséges lesz.

BAKTERIORODOPSZIN: EGY EGYSZERŰ PROTON PUMPA

ORMOS PÁL

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Szeged

Bevezetés

Napjainkra a biológiai rendszerek energiaháztartására alapelvet adó MITCHELL-féle kemiozmotikus hipotézis általánosan elfogadottá vált (13). Ez az elv lényegében az élő rendszerek energia termelő és felhasználó mechanizmusainak kapcsolatát magyarázza. Lényege a következő: az energia termelése (külső energiaforrásokból biológiailag hasznosítható energiafajták létrehozása) mindig membránhoz kötötten zajlik. Megfelelő membránfehérjék — enzimek — a külső energia rovására protont transzportálnak a membránon keresztül, így az energia elsődlegesen a membrán két oldala közti proton koncentráció különbség energiájává, a proton elektrokémiai potenciáljává alakul. Az így tárolt energiát később más, szintén membránokban levő rendszerek használják fel a különböző energiaigényes folyamatokhoz.

Jellemző példa az energiatranszformációk e sorozatára az oxidatív foszforiláció. Első lépésben a tápanyag elégetése nyomán felszabadult energia rovására működő protonpumpák létrehozzák a proton koncentráció különbséget, ez később ATP-áz enzimeken keresztül egyenlítődik ki, miközben az ADP-ből és foszforból ATP-t szintetizál. Végeredményben a tápanyag energiája az ATP pirofoszfát kötésében tárolódik. E folyamat a mitokondriumokban játszódik le. Másik tipikus ilyen folyamat a fotofoszforiláció, mely a zöld növények kloroplasztiszaiban történik, itt az elsődleges energiaforrás az abszorbeált fény.

Bár igazoltnak tekinthető, hogy az energia átalakítása és tárolása a MITCHELL-hipotézis szerint történik, az egyes részfolyamatok pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert. Világszerte nagy erőfeszítések történnek e bioenergetikai szempontból óriási fontosságú folyamatok felderítésére.

A Halobacterium halobium és a bakteriorodopszin jellemzése

Az utóbbi évtizedben fedezték fel, hogy a már régen ismert *Halobacterium halobium* az eddig ismertektől különböző, aránylag egyszerű, és a részfolyamatok tanulmányozása szempontjából „kellemes" energiaháztartással rendelkezik (14). A *Halobacterium halobium* erősen sós vízben élő baktérium. Nagy mennyiségben található tengermellékek sólepárló helyein, ahol a sókoncentráció igen nagy — e medencék gyakran jellemző piros színüket e bakté-

riumoktól kapják. Ez az egysejtű tápanyagban és oxigénben dús környezetben energiáját a tápanyag elégetésével, oxidatív foszforilációval nyeri. Ha azonban erre a körülmények nem kedvezőek, képes a fény energiájának hasznosítására is. A fényenergia átalakítására egy a sejtmembránban található fehérje-festék komplex, az úgynevezett bakteriorodopszin (BR) szolgál. Ez a fehérje nevét onnan nyeri, hogy szerkezetében és működésének sok részletében nagyon hasonló a szemben található rodopszinhoz (15). Alapvető részei a kb. 26000 Dalton molekulasúlyú fehérje, és az ennek egy lizin aminosavjához kapcsolódó retinal molekula, a komplex kromofórja. E bakteriorodopszin molekulák a sejtmembrán egyes tartományaiban, az ún. bíbor membrán fragmentumokban koncentráltan helyezkednek el.

E bíbor membránok a BR-en kívül egyetlen más fehérjét sem tartalmaznak. A BR molekulák pedig e bíbor membránokban szigorú rendben, erősen rögzítetten, kétdimenziós hexagonális kristályrács rácspontjaiban helyezkednek el (1. ábra). A sejtmembrán egyéb részei tartalmazzák a többi működési egységet (légzési lánc, ATP-áz stb.).

Kísérletekkel kimutatták, hogy fény hatására a baktériumban ATP szintetizálódik, mely folyamat a következő lépésekben történik: az abszorbeált fény hatására a bakteriorodopszin protont pumpál a sejt belsejéből a sejten kívüli térbe, ezáltal a sejten belüli protonkoncentráció lecsökken, proton koncentráció különbség alakul ki a membrán két oldala között. E különbség úgy szűnik meg, hogy a protonok ATP-ázon keresztül visszaáramlanak a sejten belülre, miközben ATP szintetizálódik. Vagyis a fény energiája a protonok elektrokémiai energiájává, ez utóbbi pedig az ATP pirofoszfát kötésének energiájává alakult. Végül is a fotonok energiája a MITCHELL-elmélettel összhangban, két alapvető lépésben alakult kémiai energiává:

$$\text{fényenergia} \xrightarrow[\substack{\text{BR}\\\text{protonpumpa}}]{} \mu H^+ \xrightarrow[\substack{\text{ATP-áz}\\\text{ADP} + P_i}]{} \text{ATP}$$

A *Halobacterium halobium* alapvető energiafolyamatainak sémája a 2. ábrán látható.

Az előzőekből is látható, hogy a *Halobacterium halobium* főleg egyszerűségénél fogva ideális objektum az alapvető bioenergetikai kutatások számára. A rajta kapott eredmények nagyban hozzájárultak a MITCHELL-féle kemiozmotikus hipotézis elfogadásához.

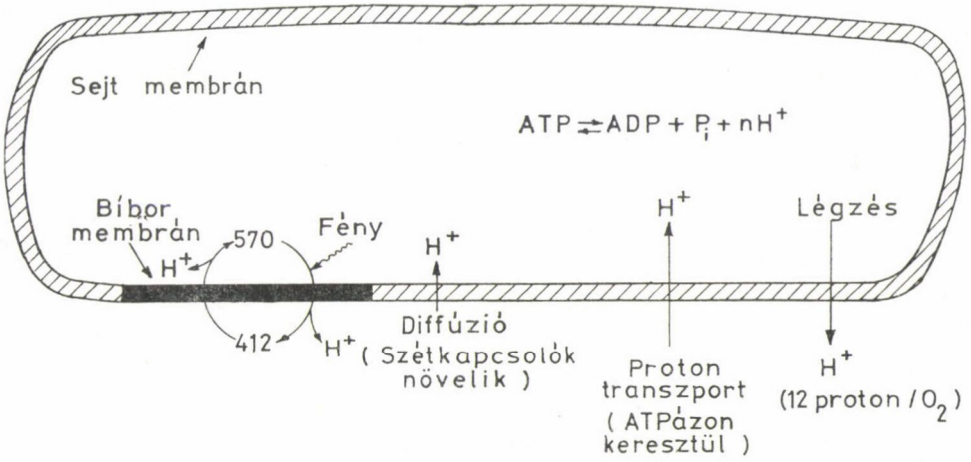
A BR rendszernek több, elméleti és gyakorlati szempontból igen fontos tulajdonsága van. Mint láttuk, a BR egy (felfedezésében) új biológiai fényenergia hasznosító rendszer, a klorofillal működőtől teljesen különböző szerkezettel és működéssel. Mivel itt egyetlen molekula egyetlen lépésben végzi a proton transzportot, logikus, hogy a pumpálás mechanizmusának részleteit, az általá-



1. ábra. A bíbormembrán röngendiffrakciós vizsgálatokból rekonstruált kétdimenziós térképe. Egy rácspont körül három, egyenként 7 helixből álló bakteriorodopszin molekula helyezkedik el

nos törvényszerűségeket célszerű rajta vizsgálni. (Meg kell azonban jegyeznünk, hogy ennek az egyszerűségnek „ára" van: a BR rendszer kevesebbre is képes a fotoszintézisnél (pl. vízbontás nem történik, energiaátalakítási hatásfoka is kisebb).

A BR további, gyakorlati szempontból igen kellemes tulajdonsága, hogy a bíbor membrán fragmentumok könnyen izolálhatók, alapvető strukturális és funkcionális tulajdonságuk izolált állapotukban megmarad, és rendkívül



2. ábra. A *Halobacterium halobium* sejtmembránjának funkcionális vázlata

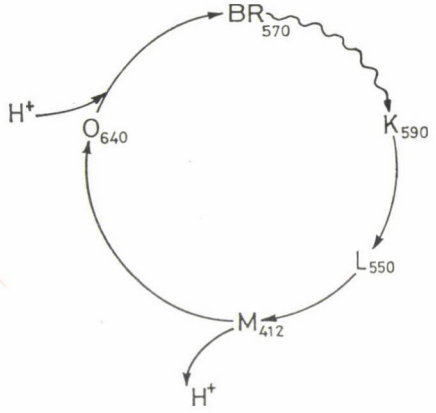
stabil: szobahőmérsékleten is akár hónapokig eltartható. A bíbor membrán fragmentumok a kvázi-kristályos szerkezetük révén alkalmasak arra, hogy krisztallográfiai módszerekkel vizsgáljuk szerkezetét: röntgen-, elektron- és neutrondiffrakciós vizsgálatokkal térbeli szerkezetét már igen jól feltérképezték (4) (1. 1 ábra), így a bakteriorodopszin a gyakorlatilag legjobban ismert membrán fehérjévé vált. Ezen információk birtokában lehetőség nyílik a proton transzport részleteinek, egyes lépéseinek a kutatására, a pontos működési mechanizmus megismerésére. Valószínű, hogy a bakteriorodopszin lesz az első aktív transzport fehérje, amelynek pontos molekuláris működési mechanizmusát megismerjük.

A napenergia hasznosításának új kísérletei

További jelentőséget kölcsönöz a BR kutatásának az a tény, hogy napjainkban óriási erőfeszítéseket tesznek új energiaforrások kutatására. Az alaptudományos ismeretek és a technológia fejlődésével egyre több figyelem fordul a biológiai energiaforrások felé. E terület igen sokrétű, az ún. biomassza feldolgozásától a hidrogéntermelő baktériumok kutatásáig; a vizsgálatok jelenleg az alapvető folyamatok megismerésénél, az elméletileg sokat ígérő rendszerek gyakorlatba való átültetésének kísérleteinél tartanak. E rendszerek között előkelő helyet foglal el a bakteriorodopszin. Már ismertetett tulajdonságai alapján komoly remény van arra, hogy felhasználásával a napenergiát villamos energiává (az átpumpált protonok elektrokémiai potenciáljának elektromos részét felhasználva) alakító biológiai fényelemet szerkesszünk belőle, amely potenciálisan a gyakorlatban is használható energiaforrássá válhat. Nyilvánvaló tehát, hogy a bakteriorodopszin protonpumpa működési mechanizmusának tisztázása mind alaptudományos, mind gyakorlati szempontból nagy jelentőségű.

A bakteriorodopszin fotociklusa

A BR funkciójának alapja az ún. fotokémiai ciklus, mely fogalom a fénnyel való gerjesztés nyomán lejátszódó fotokémiai változások sorát jelöli. A BR alapállapotában 570 nm-nél abszorbeál. Elnyelt foton hatására, kb. 10 ps alatt új, 590 nm-nél abszorbeáló nagy energiatartalmú formába megy át, e forma ezután energiáját több lépésben, termikus gerjesztésű reakciók nyomán veszti el visszajutva alapállapotába — innen a fotokémiai ciklus elnevezés. Az egyes lépések nyomán különböző hullámhossznál abszorbeáló ún. intermedierek alakulnak ki, melyek elnevezései a következők. A már említett első termék az ún. K forma, ez szobahőmérsékleten kb. 5 μs alatt az L formába jut ($\lambda_{max} = 520$ nm) ezt követi az M forma ($\tau \sim 80\mu$s, $\lambda_{max} = 410$ nm), ezt az O ($\lambda \sim 8$ ms, $\lambda_{max} = 640$ nm), mely $\tau \sim 3$ ms alatt visszaalakul BR-á (5, 6) (3. ábra).



3. ábra. A bakteriorodopszin fotociklusának a vázlata

E fotokémiai ciklus során történik a proton pumpálása úgy, hogy a ciklus első felében proton hagyja el a bíbor membránt az extracelluláris oldalon [az L → M vagy az M → O átmenet során — erre vonatkozóan ellentmondóak az irodalmi adatok (12)], majd az O → BR átmenet során protont felvéve a sejten belülről helyreáll a kiinduló állapot. Általánosan elfogadott vélemény, hogy a pumpált proton eredete a retinált és a fehérjét összekapcsoló Schiff-bázis (C = N kötés) nitrogénje, ezen alapállapotban van egy kompenzálatlan proton, mey a ciklus során leválik (10). Legújabban olyan eredmények jelentek meg, melyek szerint egy ciklus során két proton is átpumpálódhat — e második proton eredete bizonytalan (19).

A fotociklus lefolyásának módosítása fény gerjesztéssel

A fotociklus tanulmányozása során kiderült, hogy az egyes intermedierek gerjesztése nyomán lefolyása megváltozhat. A köztes termékek nagy része fényérzékenynek bizonyult abban az értelemben, hogy gerjesztés nyomán rajtuk is fotokémiai reakciók zajlanak le, melyek útja nem egyezik meg az illető intermedierek termikus reakcióival. E reakciók közös tulajdonsága, hogy a fény gerjesztés nyomán a BR_{570} alapállapotba való visszatérés sokkal gyorsabban és más úton zajlik le, mint a ciklus sötétreakciói révén.

Oesterhelt és mtsai egy korai munkájukban azt találták (16), hogy a bíbor membránok éteres-vizes szuszpenziójában, ahol az M forma élettartama igen nagy, az intermediert az őt gerjesztő kék fénnyel megvilágítva az igen gyorsan visszatér a BR_{570} alapállapotba.

A folyamatot később normál körülmények között flash-fotolízis módszerrel Kalisky és mtsai részleteiben vizsgálták (5). Megállapították, hogy kék fény gerjesztés nyomán igen gyorsan, $t < 10$ ns alatt kialakul egy kissé a kék

fele, 405 nm-re eltolódott abszorpciós maximumú termék, mely ezután termikus reakcióval, szobahőmérsékleten kb. 200 ns időállandóval jut a BR 570 alapállapotba.

LITVIN és BALASOV (11) mély hőmérsékletű spektroszkópiai kísérletekkel úgy találták, hogy a termikus visszaalakulás több lépésben, még két intermedieren keresztül történik.

Modellrendszerek a BR funkciójának kutatásában

A protonpumpa működése előnyösen tanulmányozható modellrendszerekben, ahol az egyes folyamatok tisztán, zavaró körülményektől mentesen vizsgálhatók. Gyümölcsöző módszer a modellmembránok alkalmazása, sok alapvető probléma tisztázására nyílt általuk lehetőség. E módszerek lényege, hogy létrehozzuk a sejtmembrán egy modelljét két elektrolit között, és ebbe megfelelő módon beépítjük a bakteriorodopszint. Irányított beépülés esetén fény hatására proton transzportálódik a membránon keresztül, és proton koncentráció különbség mérhető a membrán két oldala közt. Ilyen jellegű rendszereken sikerült közvetlenül bizonyítani, hogy a bakteriorodopszin önmagában aktív protontranszportra képes (20). Az egyidejű elektromos membrán potenciál ébredését is bizonyították (7).

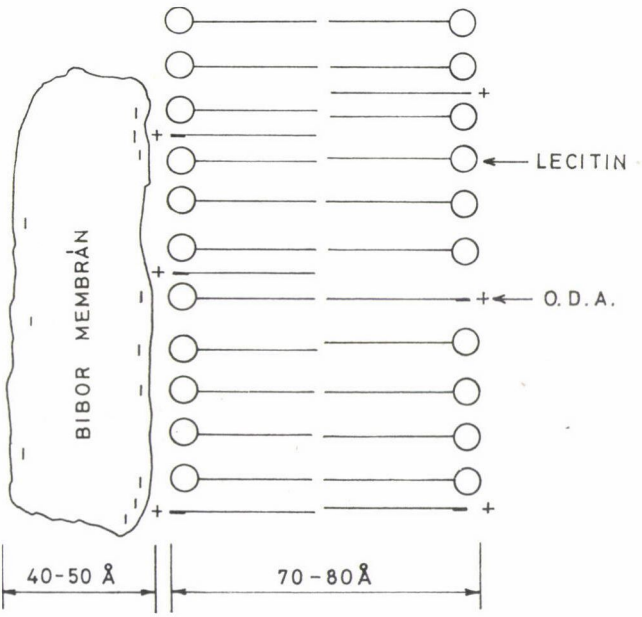
A bakteriorodopszin tartalmú BLM

Igen jó, a bakteriorodopszin protonpumpa tanulmányozásában használható modellrendszert dolgozott ki DANCSHÁZY és KARVALY (2). A bakteriorodopszint a biológiai membránok egyik legjobb modelljének tartott bimolekuláris lipid membránba építették be. A beépítést elektrosztatikus vonzás kihasználásával érték el — a negatív felületi töltésű bíbor membrán darabkák az oktadecilamin hozzáadásával elektromosan pozitívvá tett BLM-re feltapadnak.

A rendszer a nettó protontranszport megjelenéséhez szükséges aszimmetriáját úgy nyeri, hogy a bíbor membrán fragmentumokat csak a BLM egyik oldali fürdető oldalába viszik, és ezen az oldalon (a bíbor membrán felületi töltés — aszimmetriája révén) a membrán fragmentumok irányítottan helyezkednek el a BLM felületén (4. ábra).

E modellrendszer fotoelektromos aktivitást mutat, fénnyel megvilágítva fotoáramot és fotofeszültséget kelt, mely bizonyítottan a bimolekuláris lipid rétegre tapadt bakteriorodopszin gerjesztése révén ébred (3).

KARVALY és DANCSHÁZY megfigyelték (6), hogy ha a bakteriorodopszint fő abszorpciós sávjában gerjesztő zöld megvilágító fényre kék fényt szuperponáltak, a hozzáadott kék fény a zöld fény által keltett fotofeszültség csökkenését okozta nagy zöld fényintenzitás esetén.



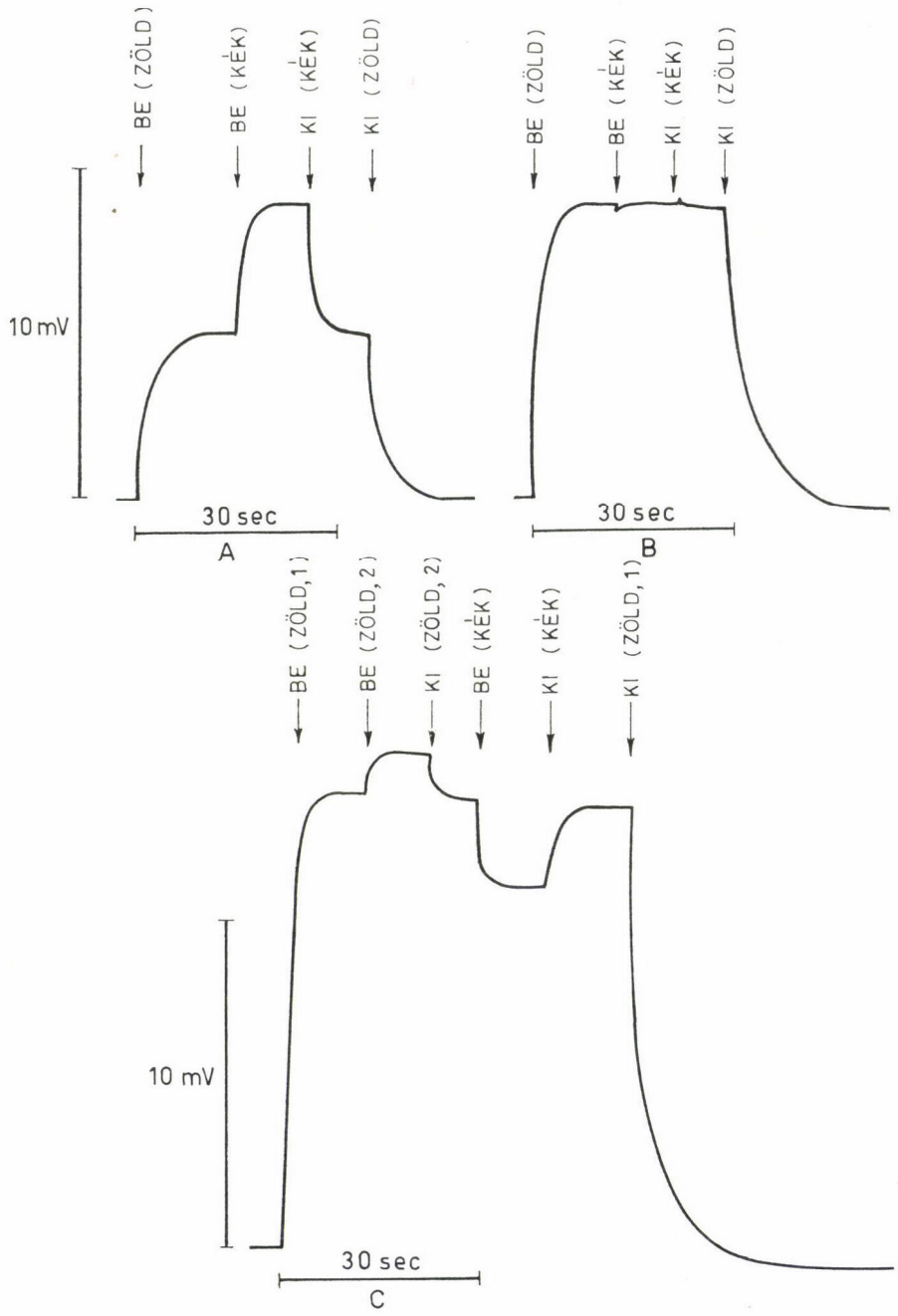
4. ábra. A bakteriorodopszin tartalmú biomolekuláris lipid membrán sémája

A jelenséget úgy magyarázták, hogy a kék fény a zöld fény által létrehozott M formát gerjeszti, és az M forma gerjesztésével módosított fotokémiai ciklus során elmarad a protontranszport.

A fotofeszültség generálódásának és a kék fény hatásának részletes vizsgálata a BR-BLM rendszeren

A protonpumpa pontos működésének megismerésére részletes kísérleti és elméleti vizsgálatokat végeztünk (17). Kísérleti objektumunk a már leírt bakteriorodopszin tartalmú BLM volt. A bimolekuláris lipid membránt tojás lecitinből hoztuk létre két elektrolitot elválasztó teflon fal 1,5 mm átmérőjű körkeresztmetszetű lyukán. A membrán pozitív felületi töltését a membránképző oldathoz a lecitinhez képest 1 : 8 arányban kevert oktadecilamintól nyerte. A membrán kialakulása után az egyik oldalhoz bíbor membrán fragmentumokat adva kialakult a fotoelektromosan aktív BR-BLM. A membrán feszültségét az elektrolitba merülő kalomel elektródákkal érzékeltük, és nagy bemenő impedanciájú Keithley 604 típusú elektrométerrel mértük.

A membrán gerjesztése kétutas optikai rendszerrel történt, egyidejűleg két, egymástól függetlenül változtatható fénnyel világíthattuk meg a mintát. Nagynyomású 200 W-os higanylámpák megfelelő vonalait üvegszűrőkkel kivágva nyertük a gerjesztéshez szükséges zöld (565 nm) és kék (405 nm) fényt.



5. ábra. A BR-BLM fotofeszültség-válasza egyidejű zöld és kék fény gerjesztés esetén. A) $I_Z = 2{,}2 \times 10^{20}$ foton/m²s; $I_K = 10^{22}$ foton/m²s B) $I_Z = 8 \times 10^{20}$ fotom/m²s; $I_K = 10^{22}$ foton/m²s C) $I_Z(1) = 6 \times 10^{21}$ foton/m²s; $I_Z(2) = 3 \times 10^{21}$ foton/m²s $I_K = 10^{22}$ foton/m²s

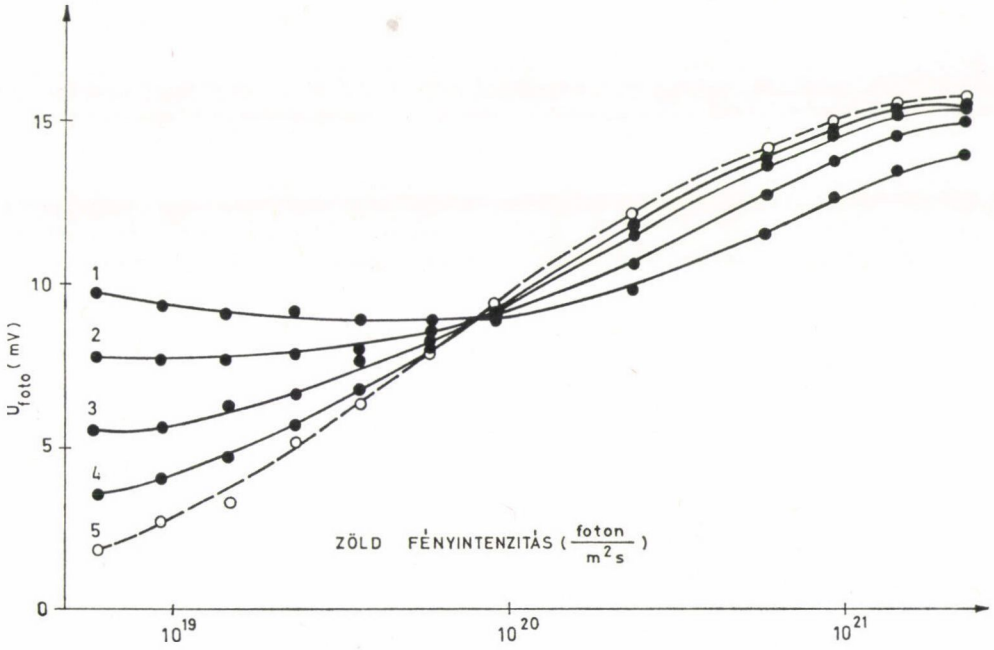
A membránt tetszőleges hullámhosszú fénnyel megvilágítva fotoelektromos aktivitást mutat. A fotoválasz jellege azonos, csak amplitúdója függ természetesen a bakteriorodopszin abszorpciós spektrumának megfelelően a hullámhossztól.

Ha a bakteriorodopszint abszorpciós maximumában gerjesztő zöld fényre kék fényt szuperponálunk, a mért fotofeszültség megváltozik (5. ábra). Kis zöld fényintenzitás esetén a kék fény a fotofeszültség növekedését okozza. Egy bizonyos zöld intenzitás (5B. ábra) fölött azonban a hozzáadott kék fény a fotofeszültség csökkenését idézi elő (5C. ábra).

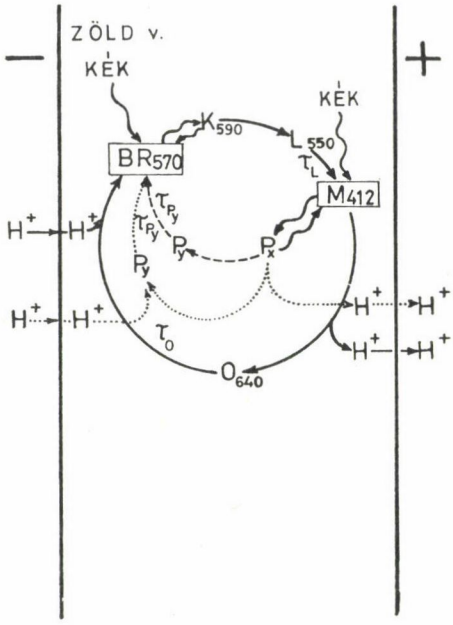
6. ábránk mutatja, hogyan függ a fotofeszültség a zöld, illetve kék fényintenzitástól; szembetűnő, hogy az a zöld fotonsűrűség, amelynél a kék fény okozta változás előjelet vált, nem függ a kék fény intenzitásától.

A jelenség kvalitatív magyarázata az, hogy nagy zöld fényintenzitáson az M forma feldúsul, a kék fény ekkor elsősorban ezt gerjeszti, és az M intermedier gerjesztése nyomán úgy zárul a fotociklus, hogy akkor protontranszport nem történik.

A kvantitatív leírás alapjául a fotociklus kinetikai tulajdonságai, illetve a protonpumpálásnak a ciklushoz kötése szolgál. A fotociklusnak a 7. ábrán bemutatott sémáját használjuk tárgyalásunkban, mely megegyezik a 3. ábrán



6. ábra. Az eredő fotofeszültség függése az egyidejű zöld és kék fény gerjesztés esetén a zöld fényintenzitástól, különböző konstans kék fényintenzitások mellett. A kék fényintenzitások az alábbiak: 1. $I_K = 10^{22}$ foton/m²s 2. $I_K = 2{,}7 \times 10^{21}$ foton/m²s 3. $I_K = 7{,}2 \times 10^{20}$ foton/m²s 4. $I_K = 2 \cdot 10^{20}$ foton/m²s



7. ábra. A fotociklus sémája, feltüntetve a protontranszport egyes lépéseit. Az ábra tartalmazza az M forma gerjesztésével induló új reakcióút két lehetséges típusát: ---------: nem történik protontranszport .....: történik protontranszport

mutatottal, kiegészítve az M gerjesztésével induló új reakcióúttal LITVIN és BALASOV nyomán (11). E reakcióutat azért „kettőzzük meg", mert nem tudjuk, az összes ilyen úton elmarad-e a protontranszport, vagy csak részben (kvalitatív meggondolásokkal ez nem dönthető el, előfordulhat, hogy bizonyos mértékben ez a reakció is hozzájárul a pumpáláshoz). Feltesszük, hogy ezen reakcióutak η hányadában gátlódik a protonpumpa, ekkor értelemszerűen az aktív lépések hányada l-η.

Ekkor a fotociklus az alábbi differenciál-egyenletrendszerrel írható le:

$$\frac{d[BR]}{dt} = -(I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K)[BR] + \frac{1}{\tau_P}[P_Y] + \frac{1}{\tau_P}[P'_Y] + \frac{1}{\tau_M}[M] \quad (1)$$

$$\frac{d[L]}{dt} = (I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K)[BR] - \frac{1}{\tau_L}[L] \quad (2)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = \frac{1}{\tau_L}[L] - I_K\sigma_K^*[M] - \frac{1}{\tau_M}[M] \quad (3)$$

$$\frac{d[P_Y]}{dt} = \eta I_K\sigma_K^*[M] - \frac{1}{\tau_P}[P_Y] \quad (4)$$

$$\frac{d[P]'_Y}{dt} = (1-\eta)I_K\sigma_K^*[M] - \frac{1}{\tau_P}[P'_Y] \tag{5}$$

és

$$[BR]_0 = [BR] + [L] + [M] + [P_Y] + [P'_Y], \tag{6}$$

ahol I_Z és I_K a zöld és kék fény intenzitása; $\sigma_{Z'}$, σ_K és σ_K^* a hatásos abszorpció-hatáskeresztmetszetek a BR_{570} formának zöld fényre, illetve kék fényre és az M formának a kék fényre. $[BR_{570}]_0$ a mért protontranszportban résztvehető bakteriorodopszin koncentrációja; $[BR_{570}]$, $[L_{550}]$, $[M_{410}]$ $[P_Y]$ és $[P'_Y]$, illetve τ_{BR}, τ_L, τ_M, τ_P pedig az egyes intermedierek koncentrációi és időállandói. Egyenleteinkben feltettük, hogy $\tau_P = \tau_P$, és csak a domináns reakciókat vettük figyelembe.

Ezen egyenletrendszert megoldva az M_{412} forma egyensúlyi koncentrációjául az alábbi adódik:

$$[M] = [BR]_0 \frac{I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K}{1 + \tau_L(I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K)} \times$$

$$\times \frac{1}{\frac{I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K}{1 + \tau_L(I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K)}(1 + \tau_P I_K\sigma_K^*) + \frac{1}{\tau_M} + I_K\sigma_K^*}. \tag{7}$$

Az egység idő alatt a membránon átpumpált protonok számát úgy kapjuk meg, hogy meghatározzuk a hatásos úton zárult fotociklusok másodpercenkénti számát (f):

$$f = \frac{1}{\tau_M}[M] + (1-\eta)I_K\sigma_K^*[M], \tag{8}$$

ahol η a korábban bevezetett hatásfok-paraméter.

Ezen irányított protontranszport létrehoz egy $2\Delta c$ koncentrációkülönbséget a membrán két határrétege között, amely passzív vissza-diffúziót hajt. Reális feltételezés szerint e visszáram arányos a $2\Delta c$ koncentrációval egy, a membránra jellemző α arányossági tényezővel (mely a membrán proton-permeabilitásától stb. függ). Egyensúlyi állapotban e két irányban folyó áramok egyenlőek, így

$$\frac{1}{\tau_M}[M] + (1-\eta)I_K\sigma_K^*[M] = \alpha\Delta c, \tag{9}$$

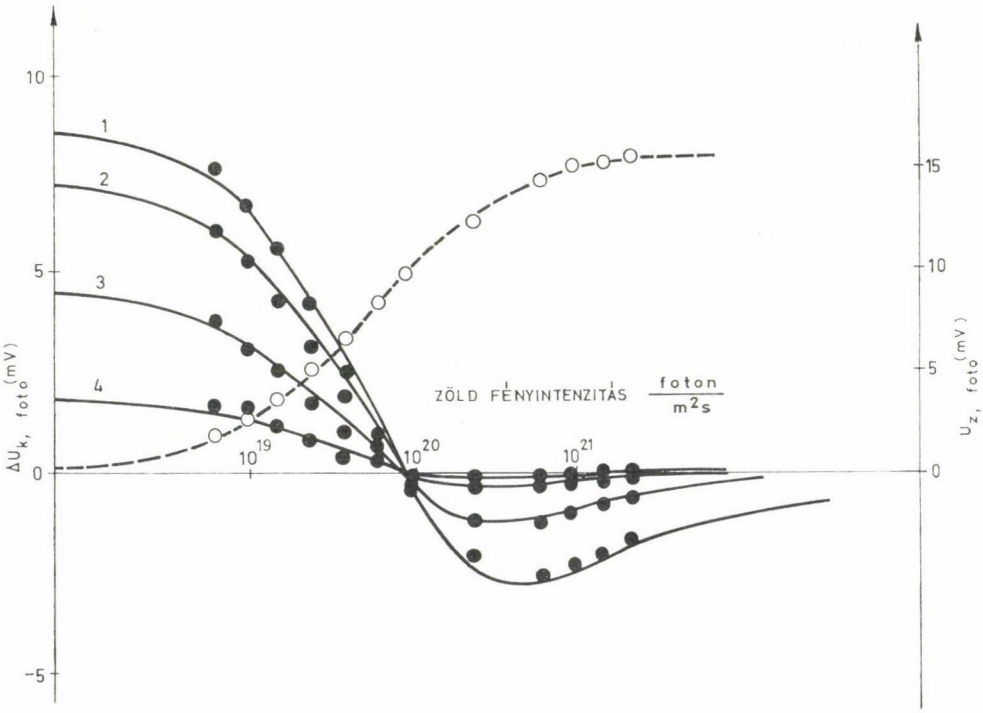
vagyis Δc arányos a membrán határrétegben felhalmozódott töltéssel (a membrán különböző oldalain különböző előjellel). Δc a membrán kapacitását tölti, és így a megjelenő fotofeszültség

$$U_{foto} = \frac{\beta}{2\alpha}\left(\frac{1}{\tau_M} + (1-\eta)I_K\sigma_K^*\right)[M], \qquad (10)$$

ahol β gyakorlatilag a membrán inverz kapacitása.

A kísérleti adatok összevetése a számításokkal

Amint az a (7) és (10) egyenletekből látszik, kifejezésünk tartalmazza a $[BR_{570}]_0 \frac{\beta}{2\alpha}$ amplitúdó faktort és a görbék karakterisztikus tulajdonságait megadó σ, τ, η molekuláris paramétereket. Az amplitúdófaktor egyes tagjainak az értéke nem ismert, így az illesztés során az amplitúdótól ilyen értelemben eltekintettünk, ezt megtehettük, mert a görbék lefutását a molekuláris paraméterek egyértelműen meghatározzák, egyértelmű illesztésre van lehetőség. Az irodalomból ismert $\tau_L = 30\ \mu s$; $\tau_M = 10$ ms; $\sigma_Z = 3\times10^{-17}$ cm^2 $\sigma_Z = 0\cdot9\times$ $\times10^{-17}$ cm^2 és $\sigma_K^* = 1\cdot5\times10^{-17}$ cm^2 értékeket használtuk (6), és a τ_P és η értékeket változtattuk az illesztés során. Eredményünket a 8. ábra mutatja.



8. ábra. A modellszámítás illesztése a mérési eredményekhez. A zöld fény indukálta fotofeszültség ($U_{Z,foto}$) függése a zöld fény intenzitásától (○: mért, ----------: számított) és a kék fény okozta fotofeszültség-változás ($\Delta U_{K,foto}$) függése a zöld fény intenzitásától (●: mért, ———: számított) különböző állandó kék fényintenzitások esetén

Megállapítható, hogy modellünk jól leírja mind az alapfotojel változását a zöld fényintenzitás függvényében, mind a kék fény teljes hatását. Ezek szerint magyarázatunk a fotofeszültség ébredésére, valamint a kék fény gátló mechanizmusára helyes.

Az ábra illesztése $\tau_P = 75\ \mu s \pm 30\%$ és $\eta = 1-5\%$ értékekkel történt, ebből a pumpa további tulajdonságaira következtethetünk.

1. Az M_{412} forma gerjesztésével indított reakcióút, mely a BR_{570} gyorsabb regenerálódást eredményezi, 75 μs időállandójú sebességmeghatározó termikus folyamattal rendelkezik.

2. Mindazon fotociklusokban, amelyek az M_{412} forma gerjesztése nyomán záródnak, elmarad a protontranszport.

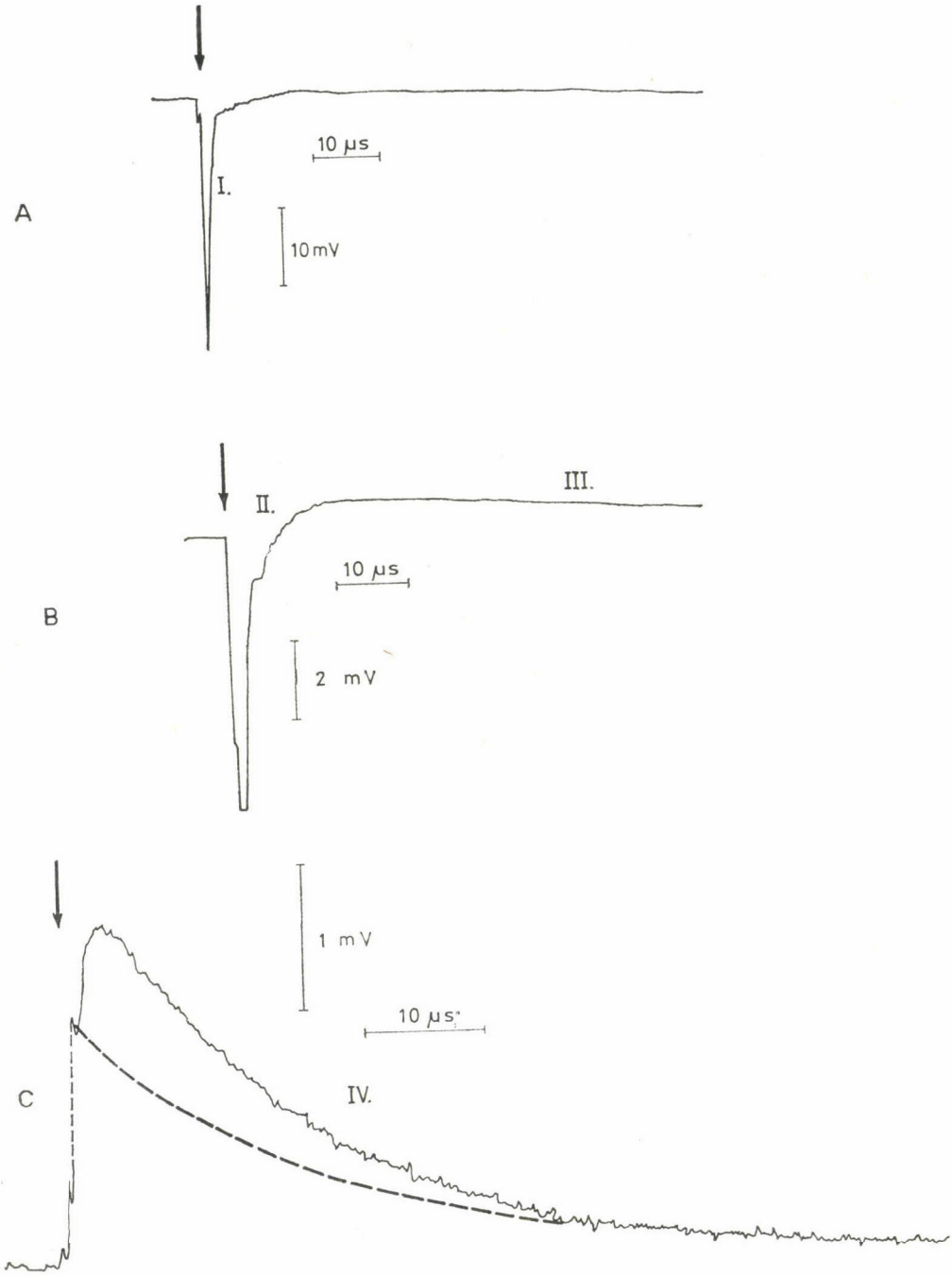
A kék fény gátló hatása két konkrét módon történhet. Amennyiben az M_{412} forma kialakulásakor a proton az extracelluláris oldalon már felszabadult, kék fény hatására a protont visszaveszi, és végül is nettó transzport nem történik.

Ha az M_{412} forma kialakulásakor a proton még a fehérjén belül van, a kék gerjesztés nyomán valószínűleg le sem adódik, hanem még a molekulán belül visszakerül eredeti helyére.

Kísérleti módszerünk, illetve modellünk e kérdés megválaszolására nem képes, eldöntésére más módon nyílt lehetőség.

Eltolódási áramok vizsgálata bíbor membránok orientált szuszpenzióján

Hogy a protontranszport részleteiről további információkat szerezzünk, olyan modellrendszert dolgoztunk ki, melyben a bakteriorodopszin tisztán, segédrendszer (pl. hordozó membrán) nélkül, kvantitatívan jól értékelhetően vizsgálhatjuk. Módszerünkre az adott lehetőséget, hogy kiderült, a bíbor membrán fragmentumok permanens elektromos dipól momentummal rendelkeznek, így elektromos térben orientálhatók. Az egyes bakteriorodopszin molekuláknak a bíbor membrán normálisába mutató dipól momentumuk van, és mivel a membrán fragmentumokban a molekulák szigorúan rendezetten, azonos orientációban helyezkednek el, dipól momentumaik összegződnek. A bíbor membránok átlagos dipól momentuma $6 \cdot 10^{-23}$ Cm így már $10\ \frac{V}{cm}$ nagyságrendű (tehát a biológiai membránokon fellépőekhez képest jelentéktelenül kicsiny) elektromos térrel gyakorlatilag 100%-osan orientálhatók. A membrán szuszpenzió orientált állapota meglehetősen hosszú ideig fenntartható ($\sim$ 10 s), így további vizsgálatok végzésére van rajta lehetőség (8). Mi ezen orientált rendszeren (amelynek tehát lényeges tulajdonsága, hogy a bíbor membránok „tiszta" vizes szuszpenziója, egyéb segéd rendszert nem tartalmaz) tanulmányoztuk a proton transzport lépéseit úgy, hogy egy gerjesztő fényimpulzus hatására megjelenő elektromos jeleket mértük. Az elektromos méréssel egyide-

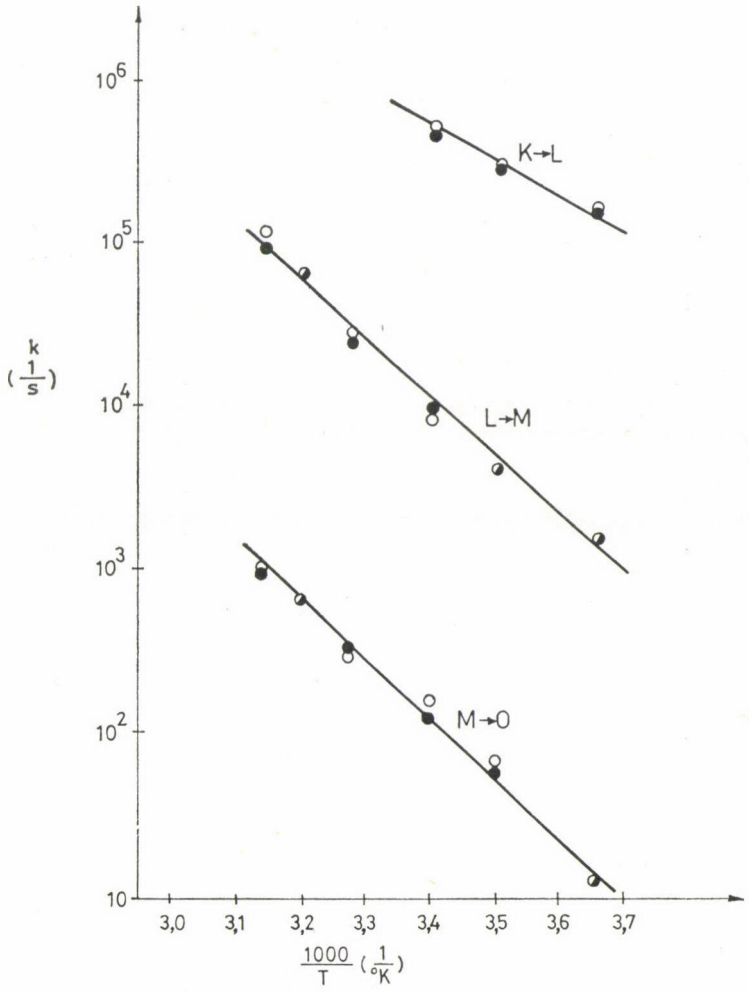


9. ábra. A bíbor membránok orientált szuszpenzióján fényimpulzus hatására megjelenő eltolódási áramjel a, b, c: A jel egyes komponensei

jűleg az egyes intermedierek karakterisztikus hullámhosszain figyelve az abszorpció időbeni változását követtük a fotociklus lefutását.

A mérési eljárás részleteit a (9) munkában ismertettük. Az orientált minta gerjesztésével többkomponensű elektromos jelet kapunk, az egyes karakterisztikus összetevőket a 9. ábránk mutatja.

Az elektromos jel első, negatív komponense követi a gerjesztő lézerimpulzus lefutását, vagyis a folyamat jóval gyorsabb a rendszerünk időfelbontását limitáló fényimpulzus 1 μs tartamánál. Következésképpen, a fotociklus első, BR → K átmenetének (melynek időállandója szobahőmérsékleten 15 ps) feleltethető meg. A későbbi, jól mérhető kinetikájú folyamatoknak a foto-



10. ábra. Az elektromos és abszorpció-kinetikai jelek komponensei sebességének hőmérséklet-függése. ○: elektromos jel ●: abszorpciós jel

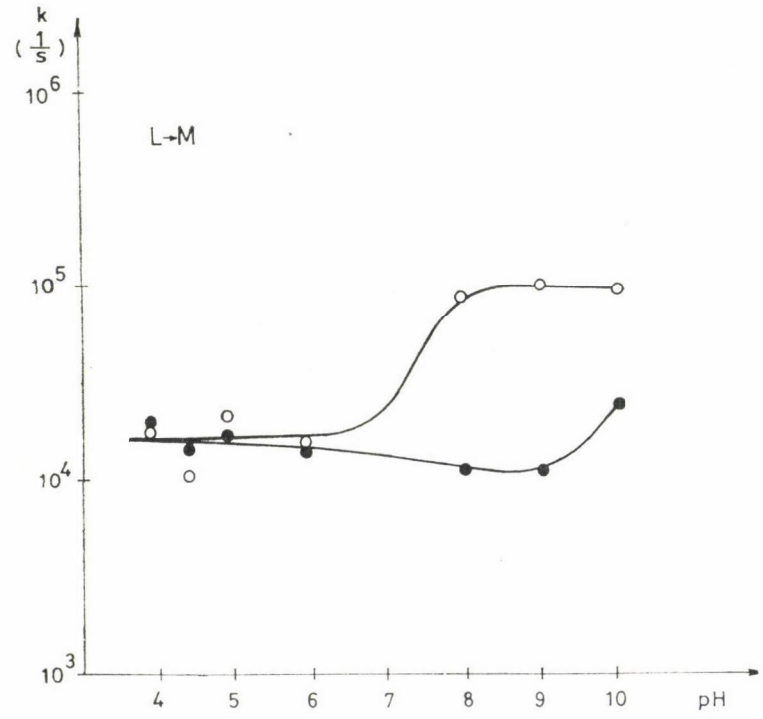
kémiai ciklussal való összehasonlítására meghatároztuk mintánkon az egyes intermedierek élettartamát abszorpció-kinetikai mérésekkel.

Meglepő módon azt találtuk, hogy az elektromos és abszorpció-kinetikai jelek azonos lefutásúak. Ezek szerint a II. komponens a K → L átmenetnek, a III. komponens az L → M átmenetnek, a IV. komponens pedig az M → O és O → BR átmeneteknek felel meg (a szaggatott vonal mutatja a IV. komponens összetevőit).

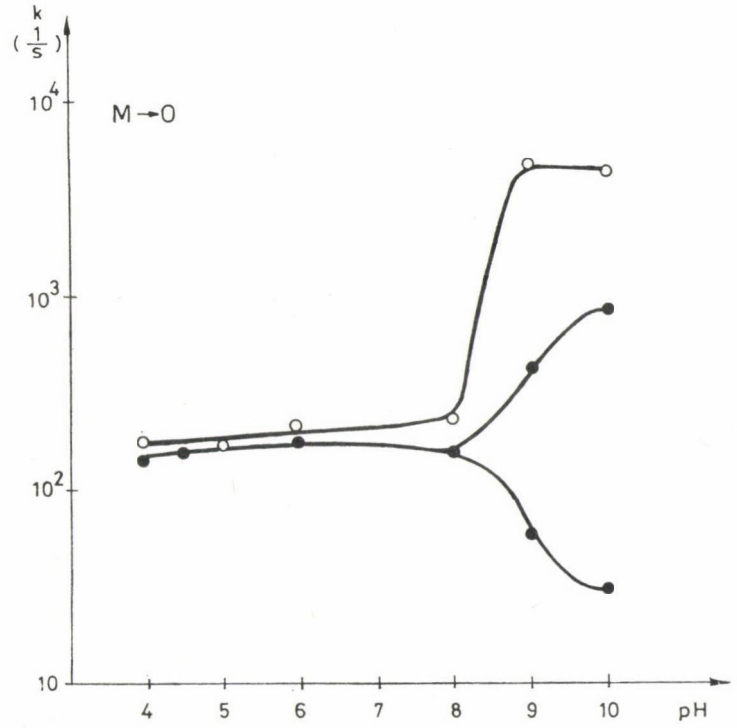
A hozzárendelést megerősítendő, megvizsgáltuk, hogyan függ az egyes jelkomponensek sebessége a hőmérséklettől. A kapott eredményeket a 10. ábra mutatja Arrhenius ábrázolásban, mely a megfeleltetést igazolja.

Tekintve, hogy a bakteriorodopszin protonpumpa elektromos jelei nagy valószínűséggel a protonok transzportjával függnek össze, vizsgáltuk, hogyan viselkedik a rendszer különböző pH értékeken. Ismert, hogy a pH változása befolyásolja a fotociklus lefutását, így érdemes a kinetikai értékeket összehasonlítani.

A mérések eredményeit a 11. és 12. ábra foglalja össze. A K → L átmenet, illetve a hozzá tartozó elektromos jel a vizsgált pH-tartományon a hibahatáron belül nem változik. Az L → M, illetve az M → O átmenet lefutásában azonban mind az optikai, mind az elektromos mérések tanúsága szerint jelentős válto-



11. ábra. Az L → M átmenethez tartozó elektromos (○) és abszorpció-kinetikai (●) jelek pH-függése



12. ábra. Az M → O átmenethez tartozó elektromos (○) és abszorpció-kinetikai (●) jelek pH-függése

zások történnek. A fotociklus L → M átmenete, amelyet abszorpció-kinetikai méréssel határozunk meg, pH = 9—10 között kissé felgyorsul. A hozzá tartozó elektromos jel pH = 8-as értékig együtt halad az optikai jellel, pH = 8-tól a nagyobb értékek felé közel nagyságrenddel gyorsabbá válik. Ezek szerint a sebességek különböző pH-függése révén az elektromos és abszorpciós jel az L → M átmenet esetében pH = 8-nál, illetve efölött szétcsatolódik. Lényegileg hasonló a helyzet az M → O átmenet esetében. Alacsony értékeken, pH = 4 és 8 között az abszorpciós és elektromos jelek együtt futnak, és nem mutatnak pH-függést. pH = 8-as érték fölött az M forma bomlása kétfázisú exponenciálissal írható le. A fotociklus kinetikájának e változásakor ez esetben is a jelek szétcsatolódása következik be, hiszen az elektromos jel nagymértékben, nagyságrendnél gyorsabban felgyorsul.

Az elektromos jelek értelmezésének alapja, hogy jelünk az orientált molekulákban egy irányban, egyszerre elmozduló töltések által keltett eltolódási áram. Kvantitatívan a (9)-ben leírtak szerint értékelhetőek adataink. Az egyes lépésekben történő töltés elmozdulásokat az 1. táblázat mutatja:

Tekintve, hogy $\Sigma d_i = 5$ nm, mely a membrán-fragmentum vastagságával egyezik meg, jelünket egy töltésnek a membránon keresztüli transzportjával

1. táblázat

A fotociklus egyes lépéseiben történő töltéselmozdulások a bakteriorodopszin molekulában

Átmenet	$d_i/2$ (nm)
K → L	−0,15
L → M	+0,5
M → O	+3,1
O → BR	+1,5

kell értelmeznünk. A bakteriorodopszin protont pumpál a fotociklus során, így nyilvánvalóan az eltolódási áram a protontranszport egyes lépéseit tükrözi.

Így az e modellrendszeren a protontranszportról nyert új információk továbblépést jelentenek a bakteriorodopszin tartalmú bimolekuláris membránon kapott eredményekhez képest: a stacioner viselkedés megértésén túl az egyes részlépésekre is fény derült. A legfontosabb megállapítás, hogy a proton transzlokálása diszkrét lépésekben történik, és e lépések fiziológiás körülmények között a fotociklus egyes reakcióival szigorúan együtt zajlanak le. A proton az egyes állapotokban valószínűleg a fehérje bizonyos proton megkötésére képes oldalláncain ül, és az átmenetek ezen oldalláncai közti átugrását jelentik.

A nagy pH értékeken megfigyelt hatás, az optikai és elektromos jelek szétválása, így nagy valószínűséggel azzal függ össze, hogy az illető (L és M) állapotokban a proton akceptor-donor csoportok protonfelvevő képessége változik meg, így a protontranszport sem tud a normális módon lezajlani. Tekintve, hogy a jelek szétválása pH = 8 körül történik, valószínű, hogy e lépésekben a hasonló pK értékű tirozin oldallánc vesz részt a proton transzportjában.

A proton mozgása által keltett eltolódási áram révén ez a korábban említett kérdés is megválaszolható volt, hogy kék fénnyel gerjesztve az M formát, a proton még a membránon belülről vagy a membránon kívülről vevődik vissza, meggátolva a protontranszportot. Az 1. táblázatunkból látható, hogy a proton az M állapot elérésekor az eredeti (a membrán citoplazma felőli harmadában levő) helyéről még csak 0,5 nm-t haladt az extracelluláris oldal felé. Így az M gerjesztésekor a kiinduló állapot úgy érhető el, hogy a proton visszatér eredeti helyére anélkül, hogy a membrán szélét elérte volna. Ezt kísérletesen is igazoltuk (9, 18).

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy alkalmazott módszereink a protontranszport sok részletének feltárására adtak lehetőséget. Ezenkívül az eljárások a későbbiekben alkalmasak lehetnek más, töltött részecskéket (különböző ionokat) transzportáló fehérjék működésének vizsgálatára.

A leírt munkában közvetlenül részt vettek Keszthelyi Lajos és Dancsházy Zsolt, nekik ezúton mondok köszönetet.

IRODALOM

1. Applebury, M., Peters, K. és Rentzepis, P.: Biophys. J. **15,** 375 (1978).
2. Dancsházy, Zs. és Karvaly, B.: FEBS Lett. **72,** 136 (1976).
3. Dancsházy, Zs., Ormos, P., Drachev, A. és Skulachev, V.: Biophys. J. **24,** 423 (1978).
4. Henderson, R. és Unwin, P.: Biophys. Struct. Mech. **3,** 121 (1977).
5. Kalisky, O., Lachisch, U. és Ottolenghy, M. **28,** 261 (1978).
6. Karvaly, B. és Dancsházy, Zs.: FEBS Lett. **76,** 36 (1977).
7. Kayushin, L. és Skulachev, V.: FEBS Lett. **72,** 136 (1974).
8. Keszthelyi, L.: BBA **598,** 429 (1980).
9. Keszthelyi, L. és Ormos, P.: FEBS Lett. **109,** 189 (1980).
10. Lewis, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **71,** 4462 (1974).
11. Litvin, F. és Balasov, S.: Biofizika **22,** 1111 (1977).
12. Lozier, R., Bogomolni, R. és Stoeckenius, W.: Biophys. J. **15,** 955 (1975).
13. Mitchell, P.: Nature **191,** 144 (1961).
14. Oesterhelt, D. és Stoeckenius, W.: Nature **233,** 149 (1971).
15. Oesterhelt, D. és Stoeckenius, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. US **70,** 2853 (1973).
16. Oesterhelt, D. és Hess, B.: Eur. J. Biochem. **37,** 316 (1973).
17. Ormos, P., Dancsházy, Zs. és Karvaly, B.: BBA **503,** 304 (1978).
18. Ormos, P., Dancsházy, Zs. és Keszthelyi, L.: Biophys. J. **31,** 207 (1980).
19. Ort, D. és Parson, W.: Biophys. J. **25,** 341 (1979).
20. Renthal, R. és Lányi, J.: Biochemistry **10,** 2136 (1976).

A FOTOSZINTETIKUS PIGMENTEK SZERVEZŐDÉSE A KLOROPLASZTISZ FÉNYBEGYŰJTŐ ÉS ANTENNAKOMPLEXÉBEN

FALUDI-DÁNIEL ÁGNES

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növényélettani Intézet, Szeged

Az ásványi energiahordozók készletének fokozódó beszűkülése egyre inkább tudatosítja azt a tényt, hogy az élővilág számára felhasználható energia túlnyomó részének jelenlegi és eredeti forrása a Nap sugárzó energiája melyet a zöld növények kloroplasztiszai fognak fel, alakítanak át elektrokémiai potenciállá és raktároznak kémiai kötésenergia formájában. E funkciója révén az egyenként 10 μm átmérőjű, lencse alakú kloroplasztisz összességében a Föld legnagyobb erőműve és vegyigyára. Méretét és jelentőségét szemlélteti az, hogy a kloroplasztiszok belsejében képződött energiaátalakító membránrendszer felülete a Föld felületének sokszorosa (1. táblázat), és évente mintegy 10^9 tonna szén szerves vegyületbe való beépítését teszi lehetővé.

1. táblázat

A fotoszintetikus apparátus és a Föld felszín méretének összehasonlítása

Föld felszín	$5{,}10^{21}$ cm^2
Levélfelület$^+$	10^{21} cm^2
Kloroplasztisz szám	$3{,}10^{28}$ db
Fotoszintetikus membrán	$12{,}10^{23}$ cm^2
Fotoszintetikus membrán / Föld felszín	240

$^+$ terület és tenyészidő átlag

Jelenlegi ismereteink szerint a kloroplasztiszmembránban folyó energiaátalakítás elsődleges folyamatai, három pigment-protein komplex típusban játszódnak le: az egymás után kapcsolt fotokémiai rendszerek (fotoszisztémák) antennáiban, a két ún. reakciócentrum-komplexben és a gerjesztési energia két fotoszisztéma közötti eloszlását szabályozó ún. fénybegyűjtő komplexben (BUTLER 1978).

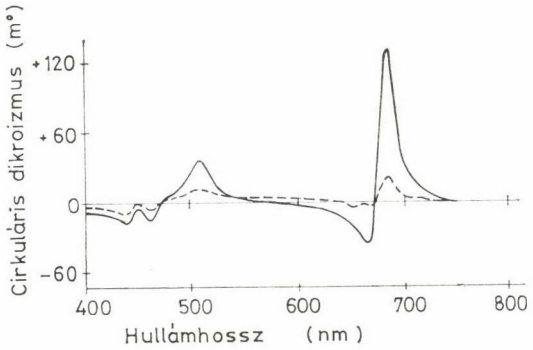
A fotoszintetikus pigmenttartalom 98—99%-a az antennákban és a fénybegyűjtő komplexben található. A pigmentek működésének módja és hatékonysága nagymértékben függ a pigmentmolekulák organizációjától, melyben lényeges mozzanat: a pigmentek molekuláris környezete, egymástól való tá-

volsága és kölcsönös orientációja (SEELY 1973, SAUER 1975). Ebből az elvi megfontolásból kiindulva választotta kutatási témául az SZBK Növényélettani Intézetében működő fotoszintézis csoport az elmúlt időszakban a fénybegyűjtő és antennakomplexeket felépítő pigmentek szerveződésének vizsgálatát.

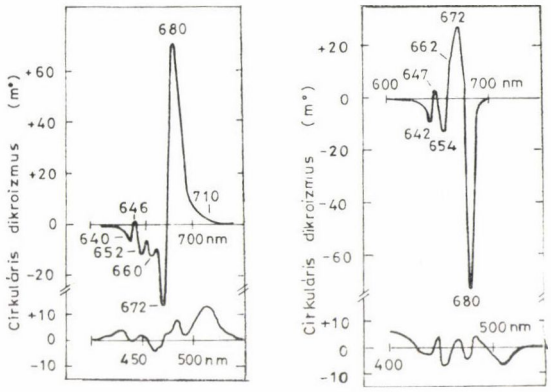
A kloroplasztiszmembránok pigment-protein komplexei hidrofób proteinek, melyeket tisztán és működőképes állapotban még nem sikerült előállítani. Ez kizárja egy sor közvetlen szerkezetkutató módszer alkalmazását és a vizsgálatokat olyan közvetett módszerekre utalja, mint pl. kloroplasztiszokban és membránalegységekben alkalmazott polarizációs spektroszkópia. A polarizációs spektroszkópiai módszerek sorából a fotoszintézis csoport főként két eljárást alkalmazott: *a)* rendezetlen, kloroplasztiszmembránok és fragmentumok cirkuláris dikroizmusának (CD) vizsgálatát, *b)* meghatározott módon rendezett kloroplasztiszmembránok és fragmentumok abszorpciós lineáris dikroizmusának (LD) és fluoreszcencia polarizációjának (FP) tanulmányozását.

Kloroplasztiszmembránok és membránalegységek CD vizsgálatából nyert információk

Ép kloroplasztiszokban az a-klorofillra jellemző abszorpciós spektrumtartományban egy igen nagy CD jelet mértünk (DEMETER és mtsai 1972). Speciális, nem gránumos kloroplasztiszokból ez a CD jel hiányzik (1. ábra), amiből arra következtettünk, hogy a nagy CD a kloroplasztisz membránrendszerének mintegy 60—70%-át kitevő gránum lamellákból vagy a gránummembránok valamely jellegzetes összetevőjétől ered (FALUDI-DÁNIEL és mtsai 1973). A nagy CD jel értelmezése során sikerült kizárni annak lehetőségét, hogy a nagy CD lineáris dikroizmusból (FALUDI-DÁNIEL és BRETON 1975) vagy differenciális fényszórásból eredő (FALUDI-DÁNIEL és mtsai 1978) mérési műter-



1. ábra. Gránumos és gránumot nem tartalmazó intakt kloroplasztiszok CD spektruma. A gránumos kloroplasztiszokat kukoricalevelek mezofillumából izolált protoplasztokból, a gránumot nem tartalmazókat levékonyított sejtfalú hüvelyparenchima sejtekből nyertük (—: gránumos, — — —: gránumot nem tartalmazó kloroplasztisz). A szuszpenziók klorofilltartalma 10^{-5} M, a minta hőmérséklete 23 °C volt



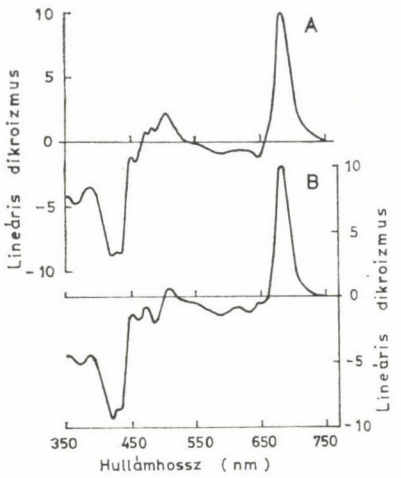
2. ábra. Gránumos kloroplasztiszok és *in vitro* aggregált fénybegyűjtő komplex CD spektruma —250 °C-on, 60% glicerinben. (A spektrumokat 678 nm-nél 0,5 abszorpcióra normáltuk; bal: kloroplasztisz, jobb: fénybegyűjtő komplex)

mék volna, így igazoltuk, hogy a nagy CD a gránummembránok belső szerkezeti sajátságát tükrözi. Azt tapasztaltuk azonban, hogy a gránumok izolálása során a nagy CD jel elvész (DEMETER és mtsai 1976), ami arra utal, hogy a nagy CD jel valamely izolálásra érzékeny membránösszetevőhöz tartozik. Ennek a membránkomponensnek az azonosítására irányuló törekvések során kimutattuk, hogy a gránummembránok különböző alegységeiben (1. fotoszisztéma, 2. fotoszisztéma részecskék és a fénybegyűjtő komplex monomér formája) nagyságrenddel kisebb, és az ép kloroplasztisz CD-jétől spektrálisan is különböző CD jel mérhető, ami klorofill molekulapárok közötti egyszerű kölcsönhatással magyarázható. A membránfrakciók Mg^{2+} ionok jelenlétében aggregálódnak, ami a fénybegyűjtő komplex esetében egy kloroplasztiszmembránhoz hasonló képződményt eredményez (2. ábra).

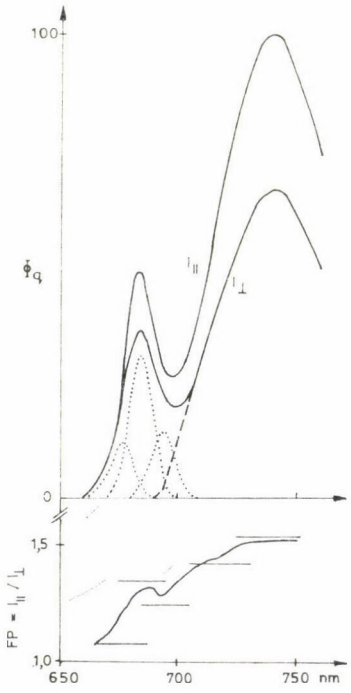
Ennek a „self-assembly" jellegű folyamatnak során a pigmentmolekulák között olyan kölcsönhatás létesül, mely az ép kloroplasztiszok jellegzetes CD-jéhez hasonló nagyságú és spektrális sajátságú CD jelet ad (GREGORY és mtsai 1980). Bár a natív és az *in vitro* fénybegyűjtő komplex szerkezete között van eltérés (amit az előjelkülönbség mutat), a hasonlóság mértéke elegendő ahhoz a következtetéshez, hogy a kloroplasztisz nagy CD jelét a fénybegyűjtő komplexből származtassuk. Ilyen „felerősített" CD jelek folyadékkristályokba ágyazott pigmentekre jellemzők (HOLZWARTH és HOLZWARTH 1973). Ez arra mutat, hogy a fénybegyűjtő komplex szerkezete folyadékkristályokéhoz hasonló.

Kloroplasztiszmembránok LD és FP vizsgálatából nyert ismeretek

Az LD mérések a pigmentmolekulák abszorpciós dipólusainak orientációjáról informálnak meghatározott módon rendezett membránsíkhoz viszonyítva. Mivel az utóbbi állandó, az LD különbségekből áttételesen a pigmentek egymáshoz viszonyított orientációjára is lehet következtetni.



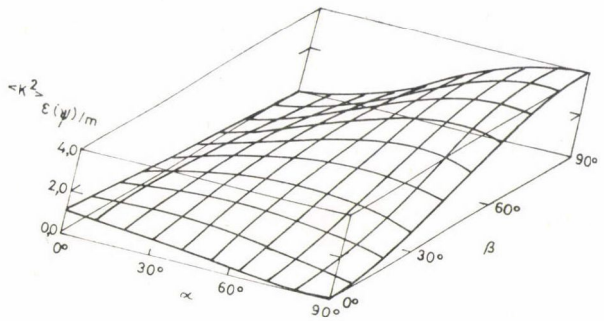
3. ábra. Normális és b-klorofill mentes árpakloroplasztiszok LD spektruma. (A vörös abszorpciós csúcsnál 1,0-re normálva; felső: normális, alsó: mutáns kloroplasztisz)



4. ábra. A kloroplasztiszmembránnal párhuzamosan és arra merőlegesen emittált fluoreszcencia intenzitása (felül) és az FP hullámhosszfüggése (alul). A pontozott vonal görbebontással nyert sávokat jelöl, a vékony vízszintes szakaszok 675, 685, 695, 720 és 735 nm-es maximumú sávok FP-jét mutatja. A minta hőmérséklete —130 °C volt

Mágneses térben és mechanikai úton rendezett koroplasztiszmembránok LD vizsgálata során megállapítottuk, hogy különböző membránkörnyezetben elhelyezkedő és kémiailag eltérő karotinoidok orientációja eltér egymástól (FALUDI-DÁNIEL és BRETON 1975). Normális és b-klorofill hiányos kloroplasztiszok LD-jének összehasonlításából (DEMETER és mtsai 1976) arra lehetett következtetni, hogy a b-klorofill vörös abszorpcióért felelős elektronátmenetének iránya közelebb áll a kloroplasztiszmembrán normálisához, mint az a-klorofill formák megfelelő elektronátmenete (3. ábra).

Ha meghatározott módon orientált kloroplasztiszmembránokat polarizálatlan fénnyel megvilágítunk, akkor a pigmentmolekulák által a membránsíkkal párhuzamosan és merőlegesen kibocsátott fluoreszcencia intenzitásából, az emissziós dipólusok membránhoz (és egymáshoz) viszonyított orientációjára lehet következtetni. A membrán normálisával párhuzamosan és merőlegesen emittált fluoreszcencia intenzitások hányadosa FP = 1,0 azt jelenti, hogy az emissziós dipólusok a membrán normálisához viszonyítva véletlen elrendeződésűek vagy pontosan 54,7°-ot zárnak be (GARAB és BRETON 1976). A különböző protoklorofillformákra nézve FP = 1,0 érték mérhető, amit a molekulák véletlen elrendeződésének lehet tulajdonítani (GARAB és mtsai 1980). Az a-klorofill 670 nm fölött emittáló formái a membrán normálissal egyre nagyobb szöget zárnak be, azaz az FP a hosszabb hullámok felé növekszik (4. ábra). Kivétel a 695 nm-es fluoreszcencia sáv, amely viszonylag kisebb mértékben rendezett vagy a membrán síkjába kevésbé besimuló emissziós átmenetet jelez. Mivel a 695 nm-es fluoreszcencia sáv a 2. fotoszisztéma antennájából ered az alacsony FP, vagy ennek az antennának kevésbé szabályos organizációját tükrözi, vagy a 2. fotoszisztémához szorosan kapcsolódó helikális felépítésű fénybegyűjtő komplex hatásával magyarázható. Egyébként a hosszúhullámú emisszió FP-je fokozatosan a reakciócentrumok orientációját jellemző abszorpciós dikroizmus hányadoshoz közelít (BRETON és mtsai 1975, GARAB és mtsai 1981). Ennek alapján az antennapigmenteket a reakciócentrum pigmentekhez



5. ábra. A gerjesztési energia átviteli sebességét befolyásoló orientációs faktor $\varkappa^2$ függése a donor (α) és akceptor (β) dipólusok membránnormálissal bezárt szögétől. A véletlen elrendezésnek megfelelő orientáció esetén $\varkappa^2 = 0{,}66$

hasonló orientációban képzelhetjük el. Ennek az orientációs mintázatnak a gerjesztési energia továbbítási sebességére gyakorolt hatását elemző számítások szerint a rendezett modellben az energiavándorlás sebessége többszörösen nagyobb lehet, mint véletlen elrendezésben levő pigmentek között (5. ábra).

Összefoglalás

Kloroplasztiszmembránokkal folytatott polarizációs spektroszkópiai tanulmányok során kimutattuk, hogy

a fénybegyűjtő komplex szerkezete folyadékkristályokéhoz hasonló,

az antennakomplexekben a pigmentmolekulák a reakciócentrum felé mutató irányban fokozottan rendezettek és a vörös abszorpciós (ill. emissziós) dipólusok a reakciócentrumokhoz hasonló orientáció felé haladva a membránok normálisával növekvő szöget zárnak be.

Az antennapigmenteknek ez a szabályos elrendeződése az energiaátvitel sebességét többszörösére növeli — így a fotoszintetikus fényhasznosítás szempontjából kiemelkedő jelentőségű.

A beszámoló tárgyát képező munka egy biológusokból és fizikusokból álló team (Demeter Sándor, Garab Győző, Horváth Gábor, Mustárdy László és Faludi-Dániel Ágnes) vizsgálatainak eredménye, melyben az I.18.1-es KGST együttműködési csoport, a Saclay-i Atomenergia Központ és a Manchesteri Egyetem Biokémiai Tanszékének munkatársai is részt vettek.

IRODALOM

Breton, J., E. Roux, J. Whitmarsh: Biochim. Biophys. Res. Comm. **64**, 1274—1276 (1975).
Butler, W. L.: Ann. Rev. Plant Physiol. **29**, 345—378 (1978).
Demeter, S., Á. Faludi-Dániel, A. S. Garay: Abst. 4th Internatl. Biophysics Congress, Moscow, Sect. I—IV p. 365 (1972).
Demeter, S., L. A. Mustárdy, E. Machowicz, R. P. F. Gregory: Biochem. J. **156**, 469—472 (1976).
Demeter, S., H. Sagromsky, Á. Faludi-Dániel: Photosynthetica, **10**, 193—197 (1976).
Faludi-Dániel, Á., S. Demeter, A. S. Garay: Plant Physiol. **52**, 54—56 (1973).
Faludi-Dániel, Á., J. Breton: Photochem. Photobiol. **22**, 125—127 (1975).
Faludi-Dániel, Á., G. E. Bialek, G. Horváth, Zs. Sz.—Rózsa, R. P. F. Gregory: Biochem. J. **174**, 647—651 (1978).
Garab, Gy. I., J. Breton: Biochem. Biophys. Res. Comm. **71**, 1095—1102 (1976).
Garab, Gy. I. Chr. Sundqvist, L. A. Mustárdy, Á. Faludi-Dániel: Photochem. Photobiol. **31**, 491—494 (1980).
Garab, Gy. I., G. J. Kiss, L. A. Mustárdy, M. Michel-Villaz: Biophys. J. **34**, 423—437 (1981).
Gregory, R. P. F., S. Demeter, Á. Faludi-Dániel: Biochim. Biophys. Acta **591**, 356—360 (1980).
Holzwarth, G., N. A. W. Holzwarth: J. opt. Soc. Amer. **63**, 324—331 (1973).
Sauer, K.: in Govindjee (ed.) Bioenergetics of Photosynthesis, Acad. Press, New York, pp. 206—247 (1975).
Seely, G. R.: J. theor. Biol. **40**, 189—199 (1973).

BIOLÓGIAI MEMBRÁNOK SZEREPE A HŐMÉRSÉKLET ADAPTÁCIÓS FOLYAMATOKBAN. A NÖVÉNYEK HIDEGTŰRÉSÉNEK PROBLÉMÁI

FARKAS TIBOR, VIGH LÁSZLÓ és HORVÁTH IBOLYA

Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete, Szeged

A környezet hőmérséklete fontos szerepet játszott és játszik ma is az állatok és növények elterjedésében. Földünk egyenlítői vidékeit melegkedvelő állatok és növények népesítik be, a sarki régiókat pedig hidegkedvelő szervezetek, amelyek közül számos meglepően alacsony hőmérsékletek elviselésére is vállalkozik. A mérsékelt övi régiókban a hőmérsékleti adaptációnak széles skálájára alkalmas szervezetek élnek. A meleg égövi növények nagy hányada már nem túl alacsony pozitív hőmérsékleti tartományokban is károsodik (hidegérzékeny növények), mások csak a víz fagyáspontja alatti hőmérsékleteken károsodnak (hidegtűrő növények), ismét mások megfelelő edzés után aránylag alacsony negatív hőmérsékleteket is elviselnek (fagytűrő növények).

Annak ellenére, hogy a hőmérséklet az az egyik környezeti tényező, melyhez valamennyi élő szervezetnek alkalmazkodnia kellett, azokat az élettani és biokémiai folyamatokat, amelyek alkalmazkodóképességüket szabályozzák, még ma sem ismerjük pontosan. Viszont egyre parancsolóbbnak látszik az a szükségszerűség, hogy ezeket alaposan megismerjük, hiszen a Földünkön egyre több embert kell élelemmel ellátni változatlan termőfelület igénybevételével. Ha ismernénk azokat a „fogásokat", amelyeket a hideg-, ill. fagytűrő növények alkalmaznak alacsony, sokszor negatív hőmérsékletek elviselésére, nemcsak hogy redukálhatnánk az évente rendszeresen jelentkező fagykárokat, de esetleg befolyásolhatnánk bizonyos növények horizontális elterjedését is. Nem elképzelhetetlen az sem, hogy ezen ismeretek birtokában a növények hőmérsékleti optimumait is befolyásolhatnánk és így pl. az üvegházak fűtőenergiaigényét csökkenthetnénk. Az ilyen irányú kutatásoknak elméleti vonatkozásaikon túlmenőleg, komoly gyakorlati jelentőségük is van.

Az utóbbi évtizedekben végzett kutatások egyik jelentős eredménye az a következtetés, hogy a biológiai membránok azok a struktúrák, amelyek a környezet hőmérsékletének változásaira talán a legegyértelműbben válaszolnak, és lényegében a válasz minősége határozza meg a szervezet hőmérséklethez való alkalmazkodóképességét. A hőmérsékletet felfoghatjuk úgy is, mint egy membrán perturbeáló ágenst, melynek hatását a fennmaradás érdekében a szervezeteknek ki kell védeniök. A SINGER-NICOLSON (53)-féle fluid mozaik membrán modell alapján ez a válasz egy aránylag konstans fluiditás fenntartása

•ehet. Alacsony hőmérsékleti viszonyok mellett ui. csak akkor lehetséges a sejt fennmaradása, ha legkülönbözőbb membránstruktúrák kellőképpen fluidak. Ellenkező esetben e szerkezetek a folyadékkristályos állapotból egy merevebb, gélszerű állapotba mennek át, aminek következtében megszűnik szemipermeabilitásuk, növekszik a membránkötött enzimek aktivációs energiája és felborul a sejt anyagcsere-egyensúlya. Mindezek együttesen tartós sejtkárosodáshoz és pusztuláshoz vezethetnek (29). De nemcsak a gél állapotban levő membránstruktúrák alkalmatlanok tartós életfolyamatokra, de az ún. „hyperfluid" membránok is. Egy bizonyos kritikus hőmérsékleti érték felett a membránok kettős réteg szerkezete fel is bomolhat.

Homeoviszkózus adaptáció

A hőmérséklet hirtelen csökkenései ellen a membránok általában túl vannak biztosítva. A folyadékkristályos — szilárd gél fázisátmeneti hőmérsékletek jóval alacsonyabban vannak, mint a fiziológiás hőmérséklet. Az I. táblázatból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy kb. egy 15—20 °C különbség van a membránok fázisváltozási hőmérséklete és a sejtműködés optimális hőmérséklete között. Az a tény, hogy még a patkány máj plazmamembránja is mutatja ezt a különbséget, egy egyetemleges regulációs mechanizmusra hívja fel a figyelmünket. Valószínűleg az adaptáció szempontjából éppen ennek a hőmérsékletkülönbségnek a fenntartása a lényeges. Ennek a feltevésnek a helyességét

I. táblázat

Biológiai membránok folyadékkristályos — szilárd gél állapot átmeneti hőmérséklete és a biológiai hőmérsékletek közötti különbségek

Membrán eredete	T_{ph}—T_C	Irodalom
Escherichia coli	16	53
Escherichia coli	17	26
Yersina enterolytica	27	1
Anacystis nidulans	23	15
Anacystis nidulans	12	56
Boerhavia annulata	23	42
Camissionian claviformis	25	42
Brassica oleracea	13	51
Triticum aestivum	16	22
Tetrahymena pyriformis	24	12
Carassius auratus	11	8
Cyprinus carpio	15	2
Lepomis cyanellus	20	9
Rattus norvegicus	18	36
Átlag	18,6	—

T_{ph} = fiziológiás hőmérséklet, T_C = membránok fázisátalakulási hőmérséklete.

látszanak SINENSKY (52) *E. colin* végzett kísérletei igazolni. Kimutatta, hogy e baktériumból izolált membránok fázisváltozási hőmérséklete mindig 15—16 °C-kal volt alacsonyabb, mint a tenyésztés hőmérséklete. Más prokarióta és eukariota szervezetek is képesek membránjaik fluiditását (mikroviszkozitását) meglehetősen szűk határok között szabályozni és ez a válasz meglehetősen gyors (7, 23, 36). Első megközelítésben igaznak tekinthetjük, hogy tökéletes hőmérsékleti adaptációhoz egy ilyen 15—20 °C-os hőmérsékletkülönbség fenntartása szükséges. Azok a szervezetek, amelyek nem képesek ennek a hőmérsékletkülönbségnek a biztosítására, változó mértékben károsodhatnak alacsonyabb hőmérsékleteken.

A membrán fluiditásának szabályozási lehetőségei

A membránok fizikai állapotának meghatározásában elsősorban a lipidkomponensek játszanak szerepet. A lipidösszetevőket tekintve mind a foszfolipidek poláris fejcsoportja és az észterző zsírsavaknak a minőségi és mennyiségi viszonyai, mind pedig a sztereoidok foszfolipidekhez viszonyított aránya lehetnek azok a tényezők, melyeket figyelembe kell venni a kérdés értékelésekor. Kimutatták, hogy azonos zsírsavösszetétel esetében a szintetikus foszfatidilkolinok fázisváltozási hőmérséklete alacsonyabb, mint a foszfatidiletanolaminoké (II. táblázat) és ez a fejcsoport sajátos térszerkezeti és töltésbeli különbözőségeire vezethető vissza (31, 43). Azt a tényt, hogy egy zsírsav olvadáspontja annál alacsonyabb, minél rövidebb vagy minél telítetlenebb a lánca, már régen ismerik. A II. táblázat egyben a zsírsavlánc hatását is mutatja a fázisváltozási hőmérsékletre. A szteroidok adagolására általában növekszik a természetes és mesterséges membránok fázisváltozási hőmérséklete, ha azok eleve már fluid állapotban vannak (5, 37). Ilyen tekintetben az állati szervezetben előforduló koleszterol és a növényi szervezetekben előforduló stigma-, szito- és kampesterol azonos módon viselkednek (32).

II. táblázat

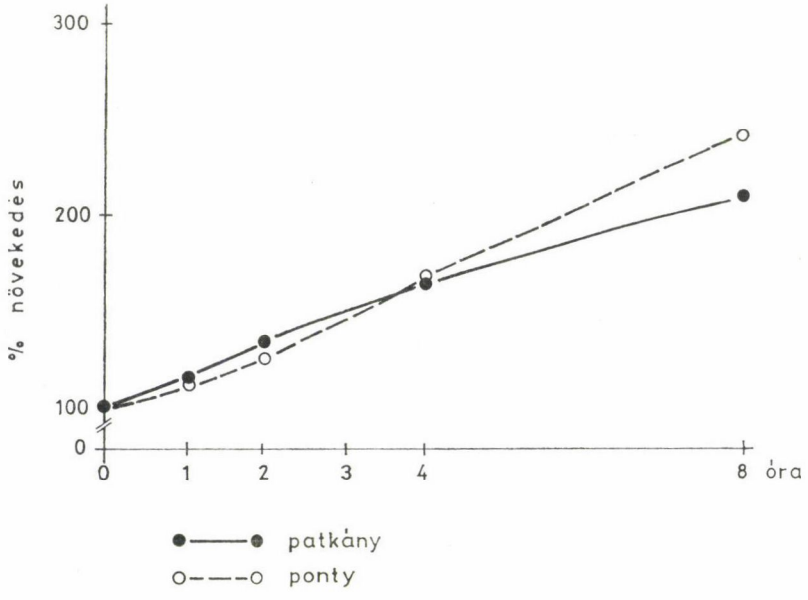
Szintetikus foszfolipidek fázisváltozási hőmérsékletei

Foszfolipid	T_C	Foszfolipid	T_C
18 : 0/18 : 0 PC	+58	18 : 0/18 : 0 PE	+89
16 : 0/16 : 0 PC	+41	16 : 0/16 : 0 PE	+65
14 : 0/14 : 0 PC	+24	—	
12 : 0/12 : 0 PC	0	—	
18 : 0/18 : 1 PC	+ 3	—	
18 : 1/18 : 1 PC	−20	18 : 1/18 : 1 PE	+42

PC = foszfatidilkolin, PE = foszfatidiletanolamin.

A membrán fluiditásának önszabályozása

A legtöbb prokariota és eukariota szervezet a zsírsavösszetétel megváltoztatásával válaszol a környezet hőmérsékletének változásaira. Általában vagy a zsírsavak telítetlenségi fokát növelik, vagy pedig a lánchosszát csökkentik, ha csökken a hőmérséklet. Bizonyos baktériumoknál kimutatták, hogy ilyenkor egy zsírsavdehidrogenáz indukálódik, amely a palmitinsavat a megfelelő monoen zsírsavvá alakítja (43). Eukariótákban, különösen a magasabb rendű szervezetekben, a dehidrogenázok indukciós ideje több óra, így csak nagy késéssel tudná követni ez a rendszer a hőmérséklet ingadozásait. Elsősorban a *Tetrahymana pyriformison* végzett kísérletekből tudjuk, hogy a telített zsírsavak telítetlen zsírsavakká történő dehidrogénezésének mértéke többek között a membrán fluiditásától függ (55). Különböző perturbensek segítségével változtatták a membránok fizikai állapotát, melyet a palmitinsav CoA dehidrogenáz aktivitásának megfelelő változása kísért (35,55). Az 1. ábra mutatja, hogy lényegében hasonló a helyzet gerincesek esetében is, beleértve a meleg vérű állatokat is. Kísérleteinkben hal (ponty) és patkány májszeleteket 5 °C, ill. 15 °C-on inkubáltunk és mértük az izolált mikroszomák sztearinsav CoA dehidrogenáz aktivitását. Kitűnt, hogy az alacsony hőmérsékleten történő inkubáció előrehaladtával az olajsav képződésének mértéke arányosan növekszik. Ezt úgy értelmezzük, hogy az inkubáció hőmérsékletén az egyébként +8 °C, ill. 18 °C-on



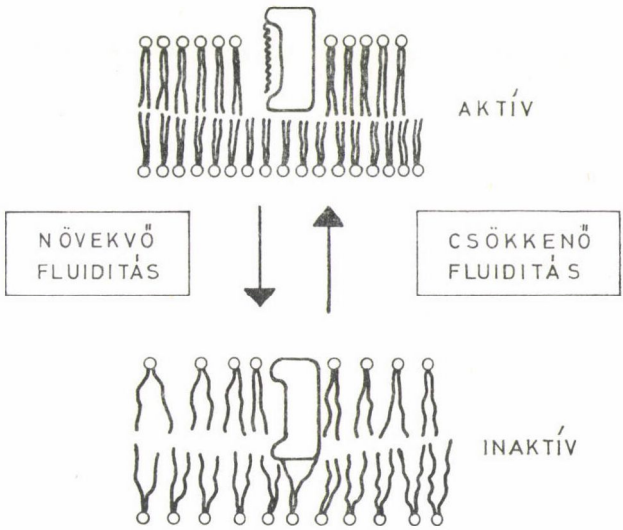
1. ábra. Máj sztearinsav CoA dehidrogenáz aktiválódása hőmérséklet csökkentés hatására. Patkány és hal máj szeleteket 15 °C-on ill. 5 °C-on inkubáltunk különböző ideig, majd meghatározott idők elteltével mikroszomákat készítettünk és mértük az enzim aktivitását 15 °C-on

III. táblázat

Benzilalkohol hatása patkánymáj mikroszóma készítmény sztearinsav CoA dehidrogenáz aktivitására

Benzilalkohol (mM)	Relatív aktivitás
0	100
10	90
25	78
50	60

tranzicionáló membránok (I. táblázat) fokozatosan merevebbé váltak, aminek következtében az enzim aktivitása módosult. Hasonló értelmű választ kapni akkor is, ha patkánymáj mikroszóma készítmény fizikai állapotát kémiai perturbensekkel (benzilalkohol) módosítjuk. A benzilalkohol fluidizáló hatását a sztearinsav CoA dehidrogenáz aktivitásának csökkenése kísérte (III. táblázat). Nagyon valószínű tehát, hogy a membránok fizikai állapotának zsírsavak segítségével történő szabályozásában e szerkezetek tranzicionális állapota fontos szerepet játszik. Jelenlegi elképzeléseink szerint a dehidrogenáz a lipidkörnyezet fluiditásától függő mértékben merül el a membránban és így változó mértékben férhető csak hozzá a szubsztrát számára. Természetesen az enzimfehérje térszerkezete is módosulhat a vertikális irányú mozgás következtében, hiszen egyszer egy inkább vizes, máskor pedig egy inkább hidrofob régióban tartózkodik. A 2. ábra sematikusan ábrázolja ezt a hipotézist.



2. ábra. Lehetséges kapcsolat a membrán rendezettsége és a zsírsavdehidrogenáz aktivitása között

A növények nem fotoszintetizáló szöveteiben a sejtnedv O_2 telítettsége határozza meg a dehidrogénezés mértékét. Alacsonyabb hőmérsékleteken több O_2 van oldva a szövetekben és így a dehidrogénezés intenzívebb (15).

Számos esetben azt is megfigyelték, hogy bizonyos sejtek képesek membránjaik fluiditásának izoterm körülmények között történő szabályozására is. Fibroblaszt tenyészetek membránjainak fluiditása állandó maradt függetlenül attól, hogy a táptalaj milyen foszfolipid fejcsoport prekurzort tartalmazott. Ezek a sejtek a kolin fejcsoport fluidizáló hatását a foszfatidilkolin zsírsavláncai telítettségi fokának növelésével, az etanolamin membránmerevítő hatását pedig a zsírsavláncok telítetlenségi fokának növelésével védték ki (47, 48). Hasonló jelenség növények esetében is megfigyelhető. WARRING és munkatársai (59) etanolamin adagolásával paradicsomlevelekben növelte a foszfatidyl-etanolamin szintjét, amit olajsav felhalmozódása követett. Saját kísérleteinkben a foszfatidilkolin szintjét növeltük búza csíranövényekben. E foszfolipid szintjének emelkedésével párhuzamosan csökkent a foszfolipidekben a telítetlen zsírsavak aránya. Ez a membrán hidrofob övének nagyfokú rendeződését vonta maga után (20).

Hőmérsékletadaptáció növényi sejtekben

A hidegérzékeny növények membránjai 10—12 °C körül mutatnak fázisváltozást (43). Ez az a hőmérsékleti érték, mely alatt e növények kisebb-nagyobb károsodást szenvednek. Különböző hidegérzékenységű Passiflora fajok hidegtűrése és az izolált foszfolipidek fázisváltozási hőmérséklete között pozitív korrelációt tudtak kimutatni (39) és ez lényegében a két jelenség közötti oki kapcsolatra is utal.

A fagytűrés mértéke és a membránok fizikai állapota közötti pozitív kapcsolatra utalnak különböző fagyállóságú búzaféléken végzett vizsgálataink. Ismeretes, hogy a fagytűrés kialakulása egy ún. edzési folyamat során történik.

IV. táblázat

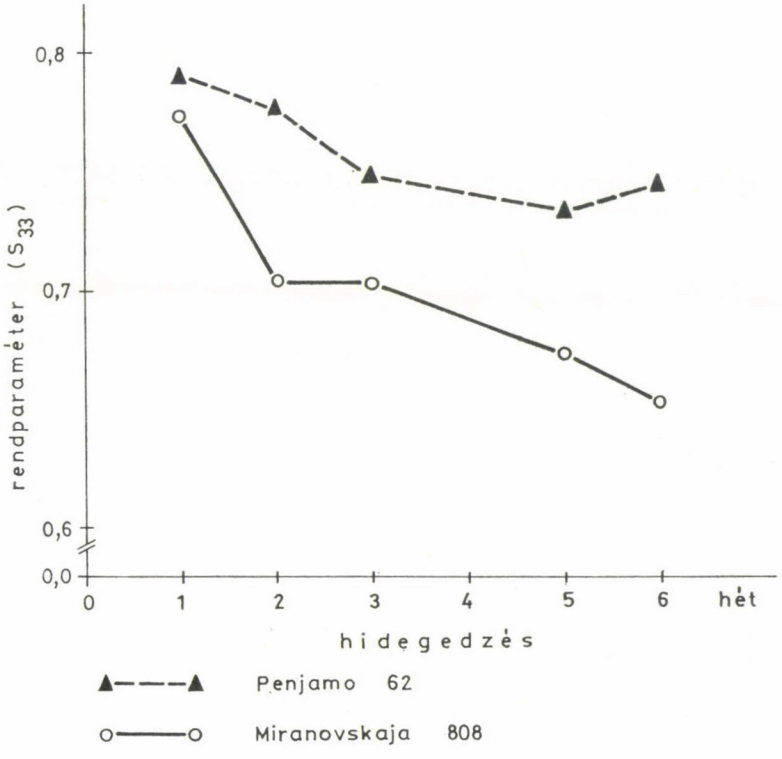
Különböző fagytűrésű edzetlen és edzett búzafajták foszfolipidjeinek fázisváltozási hőmérsékletei

Búzafajta	Fázisváltozási hőmérséklet		Túlélés —15 °C-on %
	edzetlen	edzett	
Miranovszkaja 808	8,0	—0,2	82
Bezosztaja	9,2	2,2	82
Kavkaz	9,6	4,2	77
Fertődi	13,0	5,0	57
Bánkúti	12,6	4,8	53
Száva	10,2	6,2	17

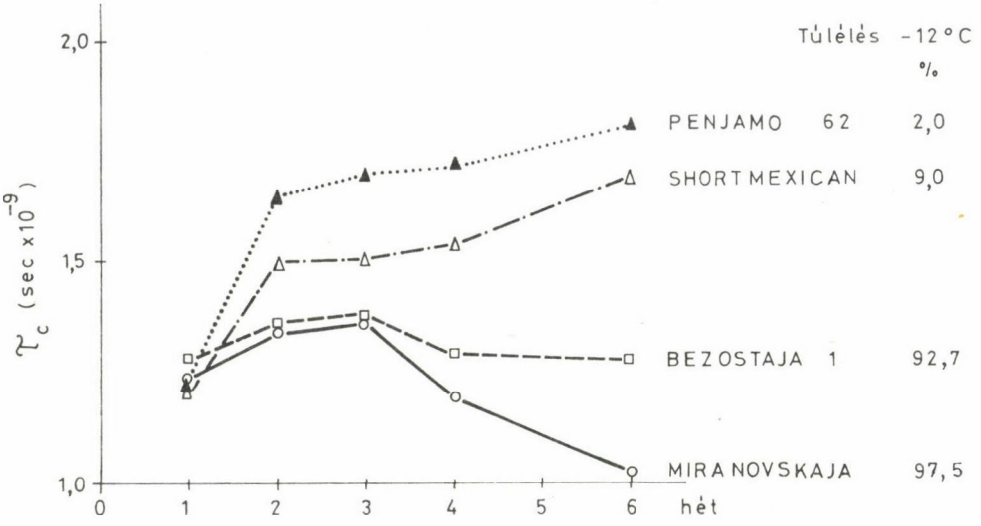
A méréseket elektron spin rezonaci spektroszkopiás technikával végeztük 16-doxyl sztearinsav spinjelölő segítségével.

Ennek a folyamatnak a során akár természetes, akár mesterséges körülmények között, a környezeti hőmérséklet és a megvilágítás mértéke fokozatosan csökken (19). Különböző fagytűrésű, de nem edzett búzafélékből izolált foszfolipidek fázisváltozási hőmérséklete közel azonos értéket mutatott (8—12 °C) és megközelítőleg 12—14 °C-szal volt a tenyésztési hőmérséklet (22 °C) alatt (IV. táblázat). Az edzési folyamat hatására azonban a fázisváltozási hőmérséklet értékek szétváltak; a legfagyérzékenyebb fajták foszfolipidjeinek fázisátalakulási hőmérséklete alig csökkent, viszont a fagyállóbb fajtáké a fagytűrésük mértékének arányában fokozatosan csökkent. A legalacsonyabb értéket a vizsgált legfagyállóbb fajta érte el.

Ez a jelenség természetesen izolált membránok esetében is tanulmányozható. A fagyállóság két szélső esetét képviselő Penjamo 62 és Miranovszkaja 808 búzafajtákból izolált kloroplasztiszok lipidjeinek rendezettségi állapota az edzési folyamat során eltérő módon alakult (3. ábra) és az edzési folyamat végére követte az anyanövény fagytűrésének mértékében megfigyelhető elrendeződést (58).



3. ábra. Kloroplasztisz lipidek rendezettségi állapotának változása a hidegedzés során, egy fagyérzékeny és egy fagytűrő búzafajtában



4. ábra. Protoplaszt plazmalemma fluiditásának változása a hidegedzés során különböző fagytűrésű búzafajtákban. Csíranövényeket hidegedzésnek vetettük alá, az edzés különböző fázisaiban leveleikből protoplasztokat készítettünk. A plazmalemmába spin jelölt zsírsavat jutattunk és mértük a zsírsav rotációs korrelációs állandóját

Lényegében hasonló képet kapni akkor is, ha izolált protoplasztok plazmalemmájának fizikai állapotváltozását vizsgáljuk a hidegedzés során. A 4. ábra mutatja, hogy a rossz fagytűrő búzafajtákban a membránok mikroviszkozitása az edzés során fokozatosan növekszik. Ez valószínűleg a természetes öregedési folyamatokra vezethető vissza, ennek a folyamatnak a során ui. fokozatosan növekszik a membránok rendezettsége. A jó fagytűrő fajtákban azonban ez a természetes öregedési folyamat bizonyos környezeti körülmények hatására megfordul és a plazmalemma fokozatosan csökkenti mikroviszkozitását. Az edzési folyamat végére ismét a legfagyállóbb fajtának lett a legfluidabb a plazmamembránja (57).

Kapcsolat a lipidösszetétel és a hideg, ill. fagytűrés mértéke között

a) Zsírsavösszetétel

A fenti meggondolások alapján a membránok hidrofób övében kell a probléma megoldására keresni a választ. A rendelkezésre álló adatok többsége azt látszik igazolni, hogy a zsírsavak telítetlenségi fokának a hőmérsékletcsökkenésével párhuzamos növekedése (46, 58, 60, 64) egymagában nem magyarázza a növények hideg-, ill. a fagytűrésének kialakulását. WILSON (63) víz stressz-

V. Táblázat

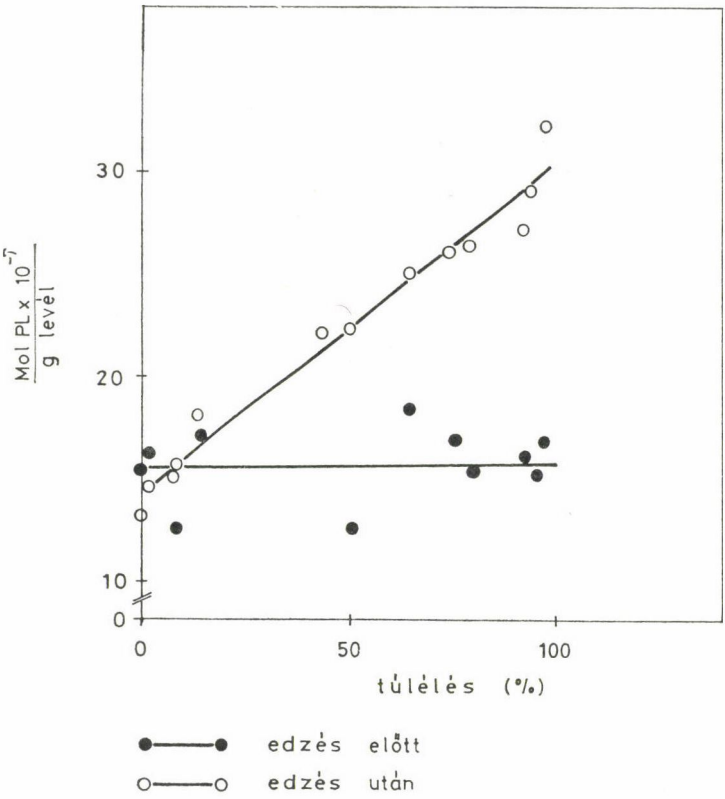
Tisztított foszfolipidek és kloroplasztiszok zsírsavösszetétele edzetlen és edzett búzafajtákban

Búzafajta	Kezelés	Zsírsav						Telített / Telítetlen
		16 : 0	16 : 1	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	
Miranovszkaja 808 Foszfolipid	edzetlen	23,05	7,07	0,73	4,27	19,02	45,85	0,31
	edzett	18,71	5,95	1,13	2,83	19,28	52,09	0,24
Penjamo 62 Foszfolipid	edzetlen	22,85	6,65	0,54	3,08	17,17	49,70	0,30
	edzett	22,25	2,82	1,25	2,72	22,79	59,59	0,30
Miranovszkaja 808 Kloroplasztisz	edzetlen	16,6	4,1	2,4	4,3	7,0	65,4	0,23
	edzett	15,3	4,7	1,3	4,4	12,2	62,1	0,20
Penjamo 62 Kloroplasztisz	edzetlen	17,4	4,6	2,1	5,4	7,2	63,1	0,24
	edzett	18,0	7,4	2,7	7,9	10,4	53,7	0,26

nek alávetett bab növényekben is tudott hidegtűrést indukálni, noha ezeknek a növényeknek a foszfolipidjeiben, ellentétben a hideg edzettekkel, nem is növekedett a telítetlenség mértéke. WILLEMOT (61) ugyancsak sikeresen indukált víz stressz alkalmazásával a zsírsavösszetétel megváltoztatása nélkül fagytűrést búzában. PATTERSON a már említett vizsgálataiban (39) szintén azt bizonyította, hogy Passiflora fajok foszfolipidjeinek zsírsavösszetétele közel azonos volt, noha lényeges különbségek voltak hidegtűrésük mértéke és foszfolipidjeik fázisváltozási hőmérséklete között. Sem a különböző fagyállóságú búzafélékből izolált foszfolipidek, sem a tisztított kloroplasztiszok zsírsavösszetétele első ránézésre nem tükrözi a fagyállóságukban észlelt különbségeket (V. táblázat). Figyelembe véve azonban a telített/telítetlen zsírsav hányados értékeit (V. táblázat) nyilvánvaló a zsírsavösszetétel szintjén fellépő fluidizálódási tendencia a fagyálló búzafajták esetében. A zsírsavak telítetlenségi fokának hőmérsékletcsökkenésével kapcsolatos növekedése így valószínűleg nem egy nem specifikus válasz eredménye lehet, mint az HARRIS és JAMES (15) megfigyeléséből következne. Ha ui. a zsírsavdeszaturazok aktivitása (és ennek következtében a telítetlen zsírsavak szintje) a szövetek oxigén telítettségének mértékével volna arányos, a telített/telítetlen zsírsav hányados értékei közel azonosnak kellett volna lenniök. A telítetlenségi fok mértéke a fagyálló Miranovszkaja 808 búzaféle leveleinek foszfolipidjeiben aktív adaptációs folyamat eredménye lehet, mely esetleg összehasonlítható a patkány és hal mikroszóma sztearinsav CoA aktivitásában az inkubációs hőmérséklet csökkentésekor fellépő növekedésével.

b) Foszfolipidek mennyisége és összetétele

Döntő jelentőségű lehet az alacsony hőmérsékletek sikeres túléléséhez a membránfelület nagysága, amelyen a megfelelő életfolyamatok lejátszódnak. Vonzónak látszik feltételezni, hogy a fennmaradáshoz a fluiditás fenntartása mellett megfelelően megnövelt membránfelület is szükséges. Kimutatták, hogy



5. ábra. Összefüggés a foszfolipidek mennyisége és a fagyállás mértéke között búzákban

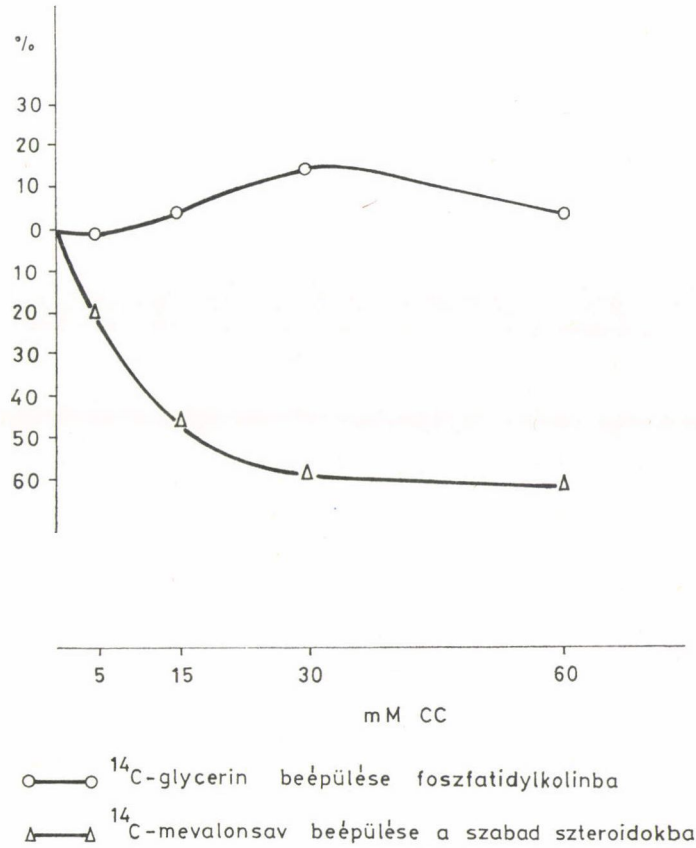
bizonyos fafélék kéregsejtjeiben a fagyállás nagymérvű növekedését nagyfokú membránfelhalmozódás kísérte (32, 33). Membránfelhalmozódás figyelhető meg több mezőgazdasági haszonnövény levelében is (18, 27, 49, 51), valamint hidegedzett és víz stressznek alávetett bab leveleiben (62, 63). A fagyállás mértéke és az edzés során bekövetkező membránfelhalmozódás között pozitív korrelációt tudtunk kimutatni különböző fagyállóságú búzafélék leveleiben (5. ábra), ami szintén egy ok okozati összefüggésre utalhat.

A foszfolipid tartalomban megmutatkozó quantitatív különbségeket a foszfolipidek poláros fejcsoportjának összetételében, jól értelmezhető eltérések kísérték. Ezeknek az eltéréseknek a lényege az, hogy a fagyállás mértékével párhuzamosan növekedett a búzákban a foszfatidilkolin aránya, elsősorban a foszfatidiletanolamin terhére. Így pl. az igen fagyérzékeny Penjamo 62-ben a foszfatidilkolin az összes foszfolipideknek mindössze 20,5%-át tette ki, míg a fagyálló Miranovszkaja 808-ban ez az érték 32% volt (19). Foszfatidilkolin hőmérsékletcsökkenésével kapcsolatos felhalmozódását több más esetben is megfigyelték, beleértve a hidegedzett, de egyébként hidegérzékeny babot (63) is. A foszfatidilkolin hőmérsékletcsökkenésével párhuzamos felhalmozódására

feltételezzük, hogy bizonyos stressz helyzetekben valamilyen hatásra a megfelelő prekurzor (kolin) képződése felgyorsul és ennek egyik mérhető eredménye az említett foszfolipid felhalmozódása. A másik megnyilatkozási módja a növekedés lelassulása, amit minden hidegedzésnek kitett növénynél megfigyeltek és a hidegedzés egyik fokozatának tartanak (27). Ez utóbbi hatás a molekulában jelenlevő trimetilammonium ($N^+)CH_3/_3$) csoporttal hozható összefüggésbe és a növekedést szabályozó gibberellinsavak bioszintézisének gátlásán keresztül realizálódik (6).

c) Szteroid/foszfolipid arányok

Minthogy a trimetilammonium tartalmú vegyületek (beleértve a mezőgazdasági gyakorlatban használatos növekedés csökkentő hatású anyagokat is) a gibberellinsavak bioszintézisét egy meglehetősen korai fázisban gátolják



6. ábra. Foszfatidilkolin és szteroid bioszintézisének befolyásolása trimetilammonium fejcsoportot tartalmazó aminoalkohollal. Az inkubálás körülményeit a VI. táblázat lábjegyzete írja le. Az inkubációs medium azonban abszcizinsav helyett kolin kloridot tartalmazott

(6, 10), ugyanezen anyagok egyben a növényi szeroidok képződésére is kihatnak. Így ilyen vegyületek stressz helyzetekben való felhalmozódása fokozott foszfatidilkolin akkumuláció mellett csökkentheti a szteroidok szintjét. A feltevés helyességének ellenőrzésére búza leveleket inkubáltunk különböző koncentrációjú kolin klorid jelenlétében és mértük a ^{14}C-glycerin foszfatidilkolinba és ^{14}C mevalonsav növényi szteroidokba való beépülésének mértékét. A 6. ábra mutatja, hogy a foszfatidilkolin képződésének fokozódását a szteroidok képződésének csökkenése kísérte. A kísérletből nyilvánvalóan következik az is, hogy az újonnan képződött membránokban a szteroidok foszfolipidekre vonatkoztatott mennyisége fokozatosan csökkent. A korábbiakban már utaltunk arra, hogy a membránok fluiditása jelentékeny mértékben függ a jelenlevő szteroidok mennyiségétől, ill. a foszfolipidekhez viszonyított arányuktól. Nyilvánvaló tehát, hogy a kísérleti körülmények között az újonnan képződő membránok fokozatosan fluidabbá váltak.

A szteroid/foszfolipid hányados értéke a fagyálló búzafajták, a hidegérzékeny bab és kukoricafélék leveleiben a hidegedzés során egyaránt csökkent. Ezzel szemben a fagyérzékeny Penjamo 62 búzafélében ez a hányados növekedett. Figyelembe véve azt, hogy ugyanebben a búzában a telített/telítetlen zsírsavhányados is növekedett, az előbbi változásokat mindenféleképpen egy adaptációs válasznak kell tekinteni. Nagy általánosságban mondhatjuk, hogy mind a hideg, mind a fagytűrés kialakulásának a különböző membránstruktúrák megfelelő összetételének, ill. fázisállapotának kialakítása az egyik előfeltétele.

A hideg- és fagyállóság lehetséges hormonális szabályozása

Nincsenek adataink arra nézve, hogy trimetilammonium tartalmú vegyület felhalmozódna az edzési folyamatok során, csak azt tudjuk, hogy foszforilkolin a növényi sejtnedv szervesanyag-tartalmának egy jelentékeny hányadát teszi ki (31). Eléggé elfogadott azonban, hogy stressz helyzetekben — beleértve a hőmérsékleti stresszt is — abszcizinsav (ABA) halmozódik fel számos növény levelében (10, 13, 14, 18, 23). További bizonyíték, hogy ABA adagolása hideg- és fagytűrést indukált számos növényben (4, 25, 45, 46). A hormonnak ez a hatása nem magyarázható a membránok fizikai állapotára gyakorolt közvetlen hatásával. Nem tudták kimutatni ui., hogy ABA valamilyen mértékben befolyásolta volna szintetikus foszfolipid membránok rendezettségi állapotát (39). Feltételezhetően a hormon közvetve vagy közvetlenül a lipidanyagcsere folyamatokat befolyásolja. Ezek a változások végül is a membránok lipidösszetételében, ill. fázisállapotában realizálódnak. A VI. táblázatban bemutatott kísérletben bab, búza, és kukorica leveleiből kivágott korongokat inkubáltunk jelzett mevalonsav, ill. jelzett kolin klorid jelenlétében és mértük az izolált szabad szteroidok, ill. foszfatidilkolin radioaktivitását. Mindkét vegyületcsoport képződésének mértéke az alkalmazott hormonkoncent-

VI. táblázat

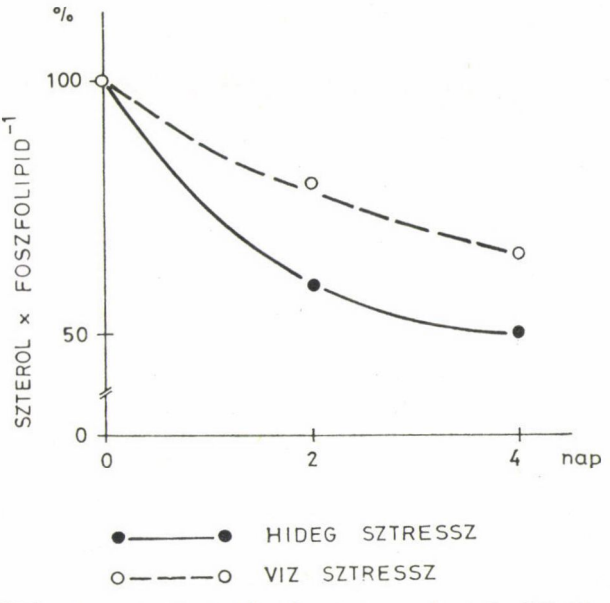
Abszcizinsav hatása szteroidok és foszfatidilkolin képződésére

Levélkorongokat olyan kálium-foszfát pufferban inkubáltunk szobahőn, mely változó mennyiségű abszcizinsavat és vagy ^{14}C-mevalonsavat (sp. a. 47 μCi$\times\mu$Mol^{-1}, 5 · 10^5 dpm) vagy ^{14}C-kolin kloridot (sp. a. 49,5 μCi$\times\mu$Mol^{-1}, 5 · 10^5 dpm) is tartalmazott. St = szabad szterin, PC = foszfatidilkolin.

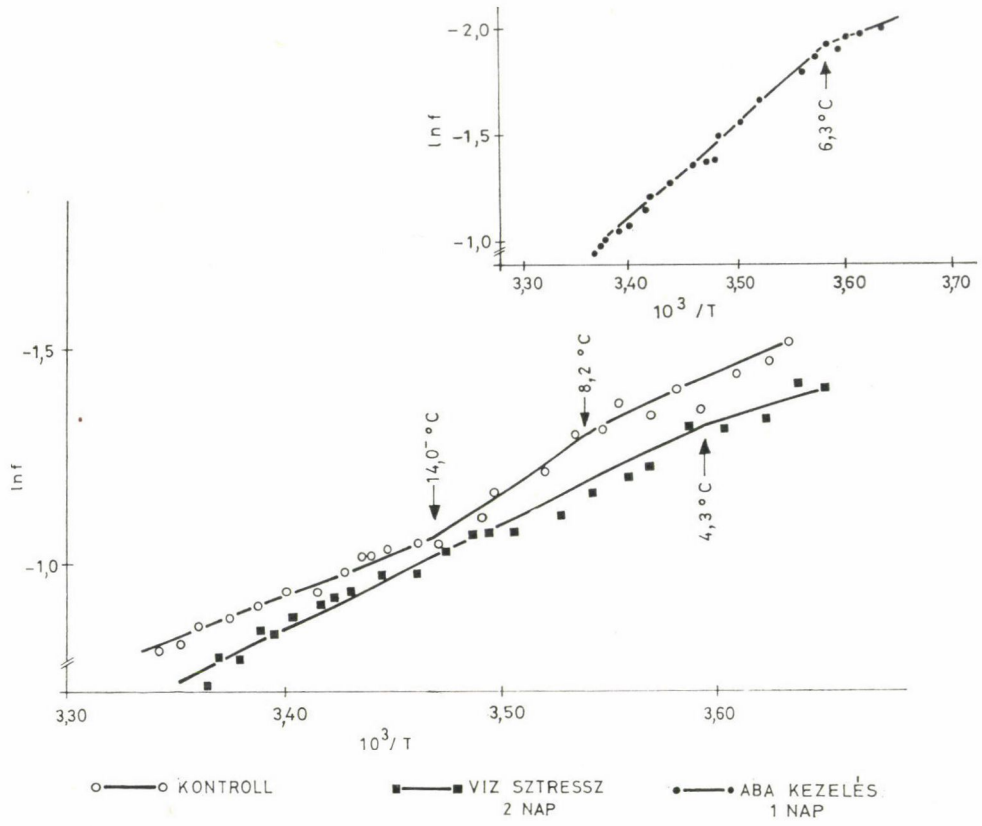
Faj	Bab			Kukorica			Búza		
Komponens	St	PC	St/PC	St	PC	St/PC	St	PC	St/PC
	pmol / korong			pmol / korong			pmol / 50 mg		
ABA (M)									
0	31,88	5,03	6,33	12,50	4,62	2,70	7,39	23,0	0,32
10^{-7}	22,93	5,68	4,03	8,30	6,47	1,28	6,00	39,9	0,15
10^{-6}	22,79	6,56	3,47	6,79	7,02	0,96	5,36	46,7	0,11
10^{-5}	21,54	6,70	3,21	4,77	8,00	0,59	3,46	49,1	0,04
10^{-4}	17,81	8,46	2,10	2,65	8,80	0,30	—	—	—

ráció függvénye volt: a szteroidok képződését a hormon növekvő koncentrációi gátolták, a foszfatidilkolin képződését pedig serkentették. A számított szterol/foszfatidilkolin hányados értékei arra utalnak, hogy a membrán fluiditásának mértéke részben az intracelluláris ABA szint függvénye lehet.

A hormon intracelluláris szintje és a membránok lipidösszetétele közötti kapcsolat további tisztázása céljából, fiatal babnövényeket hideg stressznek vetettünk alá úgy, hogy 22 °C-on nevelt példányokat több napra 5 °C-ra



7. ábra. Hidegstressz hatása bablevél szabad szterin és foszfolipid tartalmára



8. ábra. Vízstressz, ill. abszcizinsav hatása a membránok fázisállapotára bab levelében

helyeztünk. Mértük a levelekben az összfoszfolipid és az összszterol szintet és meghatároztuk a szterol/foszfolipid hányadost. Bablevelek hidegedzését általában 12 °C körül végzik, ez a kísérlet egy erőltetett hidegedzésnek tekinthető. E folyamat során a levelekben fokozatosan emelkedett a foszfolipidek mennyisége. Ez a megfigyelés lényegében megegyezik WILSON (63) eredményeivel. Ő a 12 °C-on edzett bablevelekben figyelt meg membránfelhalmozódást. Ezzel párhuzamosan saját kísérleteinkben csökkent a szteroidok mennyisége és a két folyamat együttes eredményeképpen a szteroid/foszfolipid hányados értéke (7. ábra). Vízstressznek kitett bablevelekben szintén csökkent ennek a hányadosnak az értéke (7. ábra). Ismeretes, hogy ezek a növények sokkal hideg/fagytűrőbbek. Többszörösen bizonyított tény az is, hogy a vízstressz során az abszcizinsav szintje többszörösére emelkedik.

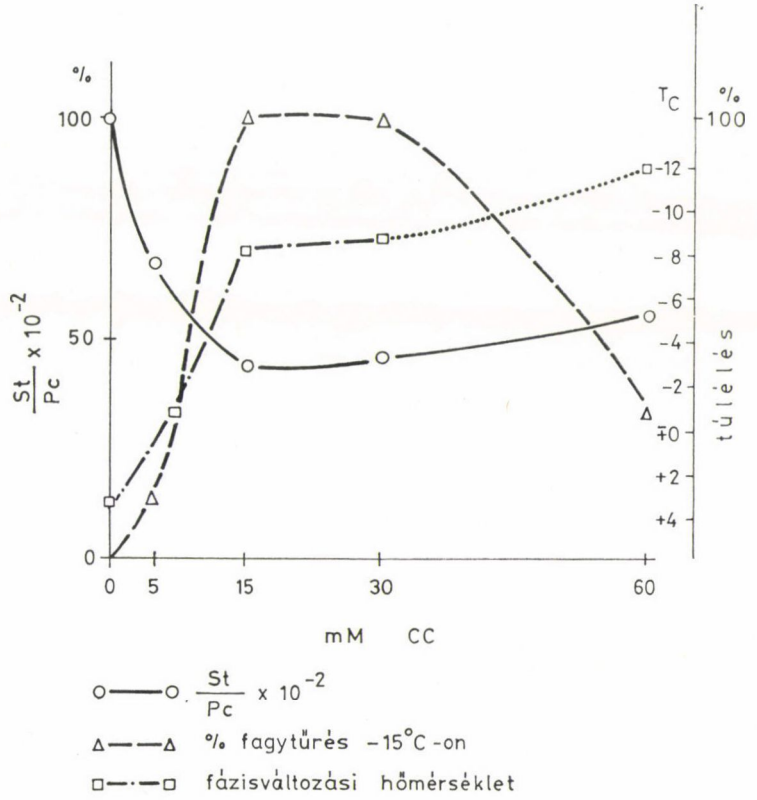
Mint említettük, a szterol/foszfolipid hányados csökkenése fluidabb membránok képződésére utal. Így ez a tény magyarázatot adhat a sztresszelt növények fokozódott hidegtűrésére (10, 29). További alátámasztását adják ennek a feltevésnek azok a kísérleteink, amelyekben vízstressznek alávetett, ill.

ABA-val permetezett levelek membránjainak fizikai állapotát vizsgáltuk TEMPO spin jelölő in vivo körülmények között, a membránokba való beépítésével (14).

A 8. ábrán láthatjuk, hogy a kezeletlen levelek membránjai 14 °C körül kezdenek fázisszeparációt mutatni és ez a folyamat 8 °C körül fejeződik be. A vízstressznek kitett levelekben a vártnak megfelelően csökkent a fázisszeparáció alsó hőmérséklete. Ugyanez a helyzet a hormonnal kezelt levelek esetében is (l. inszert). Így nagyon valószínű, hogy mind a levelek hormonális egyensúlya, mind pedig membránjaik fizikai állapota fontos szerepet játszik a hideg/fagytűrés kialakulásában és hogy ez a két folyamat egymással kapcsolatban lehet.

Fagyállás indukálása membránmódosítással

Ha a membránok fizikai állapota, ill. foszfolipidjeik összetétele és a szteroid/foszfolipid hányados értéke valóban befolyásolja a növények fagytűrését, akkor ezt megfelelő kísérleti elrendezésben demonstrálni is lehet. Növé-



9. ábra. Kapcsolat a membránok lipidösszetétele, fázisváltozási hőmérséklete és a levelek fagytűrésének mértéke között egy búzafajtában (Miranovszkaja 808)

nyi membránok foszfolipid összetételét korábban bizonyos aminoalkoholok segítségével másoknak már sikerült módosítaniuk (59). Mi búzanövényeket olyan vízkultúrákban neveltünk, mely kolin kloridot is tartalmazott. Kimutattuk, hogy a foszfatidilkolin szintje a levelekben aránylag széles koncentráció tartományban arányos volt a prekurzor tenyésztési mediumban való koncentrációjával (20). A 9. ábra azt mutatja, hogy a foszfatidilkolin szintjének emelkedésével párhuzamosan csökkent a szterol/foszfatidilkolin hányados értéke, ill. a membránok fázisszeparációjának alsó hőmérsékleti tartománya, vi. ezek a szerkezetek fokozatosan fluidabbá váltak. Ezzel egyidejűleg a levelekben nagymértékű fagyállás fejlődött ki. Fontos megemlíteni, hogy ezeket a leveleket előzőleg nem tettük ki hideg edzésnek. Más szóval a membránok összetételének megfelelő módosításával edzetlen növényekben olyan mértékű fagytűrést tudtunk létrehozni, amelyre egyébként csak a hidegedzési folyamatok során tehetnek szert. Más növények membránjainak hasonló módosítása (szőlő, bab, uborka, paprika) hasonló eredményekre vezetett. Megfelelő kísérletek után elképzelhető, hogy számos növény levelében in vivo körülmények között olyan membránmódosításokat lehetséges létrehozni, amelyek végül is pl. a tavaszi fagykárok redukcióját eredményezhetik.

Természetesen tudatában vagyunk annak, hogy a fagyállás ilyen szinten való megközelítése egy túlságos leegyszerűsítése egy igen komplex folyamatnak. Most nem térhetünk ki az intra- és intercelluláris víz megfagyásának kérdéseire és arra a stresszre sem, amely a protoplazmát a hőmérséklet-csökkenéssel kapcsolatos deszikálódás során éri. Megjegyezzük azonban, hogy a sótűrő növények általában jobb hidegtűrők is, valamint azt, hogy bizonyos foszfolipidek fejcsoportjának prekurzorai (kolin), ill. annak egyes származékai (betain) a növényekben természetes ozmotikumként viselkedhetnek, de egyúttal csökkenthetik az intracelluláris szabad víz fagyáspontját is.

IRODALOM

1. Abbas, C. A., Card, G. L.: Biochim. Biophys. Acta **602,** 469—476 (1980).
2. Balwanth, S., Farkas, T., Horváth, L. I.: Kézirat
3. Borochov, A., Halvey, A. H. Borochov, H., Shinitzky M.: Plant Physiol. **61,** 812—815 (1978).
4. Boussiba, G., Rikin, A., Richmond, A. E.: Plant Physiol. **56,** 337—339 (1975).
5. Brockerhoff, H.: Lipids **9,** 645—650 (1975).
6. Cathey, H. M.: Annu. Rev. Plant. Physiol. **15,** 271—302 (1964).
7. Cossins, A. R.: Biochim. Biophys. Acta **470,** 395—411 (1977).
8. Cossins, A. R., Kent, J., Prosser, C. L.: Biochim. Biophys. Acta **599,** 341—358 (1980).
9. Daie, J., Campbell, W. E.: Plant. Physiol. **67,** 26—29 (1981).
10. Dennis, D. T., Kuiper, C. D., West, C. A.: Plant Physiol. **40,** 948—952 (1965).
11. Dickens, B., Thompson, G. A.: Biochim. Biophys. Acta **664,** 211—218 (1981).
12. Eze, J. M. D., Dumproff, E. B., Thompson, J. E.: Physiol. Plant **51,** 418—422 (1981).
13. Fey, R. L., Workmann, M., Marcellos, M., Burke, M.: Plant Physiol. **63,** 1220—1222 (1979).
14. Furtado, D. Williams, W. P., Brain, A. P. R., Quinn, P. J.: Biochim. Biophys. Acta **555,** 352—357

15. HARRIS, P., JAMES, A. T.: Biochem. J. **112,** 325—330 (1969).
16. HENSON, I. E., QUARRIE, S. A.: Z. Pflanzenphysiol. **101,** 431—438 (1981).
17. HIRON, R. W. P., WRIGHT, S. T. C.: J. Exp. Bot. **24,** 769—781 (1973).
18. HORVÁTH, I., VIGH, L., BELEA, A., FARKAS, T.: Physiol. Plant **49,** 117—120 (1980).
19. HORVÁTH, I., VIGH, L., FARKAS, T.: Planta **151,** 103—108 (1981).
20. HORVÁTH, I., VIGH, L., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I., DUDITS, D.: Planta, 153, 476—480 (1981).
21. HORVÁTH, I., VIGH, L., ONDRIAS, C., FARKAS, T.: Kézirat
22. HOAD, G. V.: Planta **132,** 287—290 (1978).
23. HUAG, L., LORCH, S. K., SMITH, G. G., HUAG, A.: FEBS Lett. **43,** 1—5 (1974).
24. IRVING, R. M., LAMPEHAR, F. O.: Plant. Physiol. **43,** 9—13 (1968).
25. JANOFF, A. S., GUDTE, S., MCCROATHY, E. J.: Biochim. Biophys. Acta **598,** 641—669 (1980).
26. KACZPERSKA-PALACZ, A.: Acta Horticulturae **81,** 23—35 (1978).
27. KUIPER, P. J. C.: Plant. Physiol. **45,** 684—686 (1970).
28. LEVITT, J.: Responses of Plants to Environmental Stress. Acad. Press. Ny. Y. (1972).
29. LYONS, J. M.: Annu. Rev. Plant. Physiol. **24,** 445—466 (1973).
30. MAIZEL, J. K., BENSON, A. A., TOLBERT, N. E.: Plant Physiol. **31,** 407—408 (1956).
31. MCKERSIE, B. D., THOMPSON, J. E.: Plant Physiol. **61,** 639—643 (1978).
32. MCKERSIE, B. D., THOMPSON, J. E.: Physiol. Plant. **63,** 802—805 (1979).
33. MICHAELSON, D. M., HORWITZ, A. F., KLEIN, M. P.: Biochemistry **13,** 2605—2612 (1974).
34. NANDINI-KISHORE, S. G., KITAJIMA, S. G., THOMPSON, G. A.: Biochim. Biophys. Acta **471,** 157—161 (1977).
35. NEMECZ, GY., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I.: Arch. Biochim. Biophys. **207,** 256—263
36. NOZAWA, A. R., IIDA, H., FUKUSHIMA, H., OKHI, K., OHNISHI, S.: Biochim. Biophys. Acta **367,** 134—147 (1974).
37. OLDFIELD, E., CHAPMAN, D.: FEBS Lett. **23,** 285—297 (1972).
38. PARUPS, E. V., MILLER, E. V.: Physiol. Plant. **42,** 415—419 (1978).
39. PATTERSON, B. D., KERNICK, J. R., RAISON, J. K.: Phytochemistry **17,** 1089—1092 (1979).
40. PHILLIPS, M. C., FINER, E. G., HAUSER, M.: Biochim. Biophys. Acta **290,** 397—402 (1972).
41. PIKE, C. S., BERRY, J. A.: Plant Physiol. **66,** 238—241 (1980).
42. QUINT, O. F., FULCO, A. J.: Biol. Chem. **248,** 6885—6895 (1973).
43. RAISON, J. K.: Symposia of the Society of Experimental Biology. XXVII. Rate Control of Biological Processes. (1973).
44. RIKIN, A., RICHMOND, A. E.: Physiol. Plant. **38,** 95—97 (1976).
45. RIKIN, A., ASTOMOND, D., GITLER, C.: Plant. Cell. Physiol. **20,** 1537—1546 (1979).
46. ROCHE, De La, I. A.: Acta Horticulturae **81,** 84—89 (1978).
47. SCHROEDER, F., PERLMUTTER, D. F., GLASOR, M. and VAGELOS, P. R.: J. Biol. Chem. **251,** 5016—5026
48. SCHROEDER, F.: Biochim. Biophys. Acta **511,** 356—376 (1978).
49. SIKORSKA, E., KACZPERSKA-PALACZ, A.: Physiol. Plant. **47,** 144—150 (1979).
50. SIKORSKA, E., ONDRIAS, C., FARKAS, T.: Acta Biol. Acad. Sci. hung. 32, 267—274 (1981).
51. SIMONOVITCH, H. D., RHEME, B., POMEROY, K., LAPAGE, M.: Cryobiology **5,** 202—225 (1968).
52. SINENSKY, H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **71,** 522—525 (1974).
53. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: Science Ny. Y. **175,** 720—731 (1972).
54. SINGH, J., De la ROCHE, SIMINOVITCH, D.: Nature **257,** 669—670 (1975).
55. TOMPSON, G. A.: Jr. in Low Temperature Stress in Crop Plants. Acad. Press. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco (1977).
56. TSUKAMOTO, Y., KEKI, T., MITSUI, T., ONO, T. A., MURATA, N.: Biochim. Biophys. Acta **602,** 673—675 (1980).
57. VIGH, L. HORVÁTH, I., HORVÁTH, L. I., DUDITS, D., FARKAS, T.: FEBS Lett. **107,** 291—294 (1979).
58. VIGH, L., HORVÁTH, I., FARKAS, T., HORVÁTH, L. I., BELEA, A.: Phytochemistry **18,** 787—789 (1979).
59. WARRING, A. J., BREIDENBACH, R. W., LYONS, J. M.: Biochim. Biophys. Acta **471,** 157—161 (1976).
60. WILLEMOT, C., HOPE, H., WILLIAMS, R., MICHAUD, R.: Cryobiology **14,** 87—93 (1977).
61. WILLEMOT, C. PELLETIER, L.: Can. J. Plant Sci. **59,** 639—643 (1979).
62. WILSON, J. M., CRAWFORD, R. M. M.: New Phytol. **73,** 805—820 (1974).
63. WILSON, J. M.: New Phytol. **76,** 257—270 (1976).
64. WILSON, R. F., RINNE, R. W.: Plant Physiol. **57,** 270—273 (1976).
65. YOSHIDA, S., SAKAI, A.: Plant. Cell. Physiol. **14,** 653—359 (1973).

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

NITROGÉNKÖTÉS A BALATON, VÍZTÁROLÓK ÉS HALASTAVAK ÜLEDÉKÉBEN

OLÁH JÁNOS, M. A. ABDEL MONEIM és TÓTH LÁSZLÓ*

Haltenyésztési Kutató Intézet, Szarvas
*Vízgazdálkodási Tudományos Kutató Intézet, Budapest

A szénkötéssel összehasonlítva a nitrogénkötésről keveset tudunk. Az olcsó, gyors és érzékeny acetilénredukciós módszer bevezetése után, a hetvenes években kilenc tóban vizsgálták részletesen a vízoszlop nitrogénkötését (GRANHALL és LUNDGREN 1971, KEIRN és BREZONIK 1971, HORNE és VINER 1971, HORNE és GOLDMAN 1972, TORREY és LEE 1976, SARALOV 1978, OLÁH és mtsai 1979, EL SAMRA és OLÁH 1979). Az eredményekből megállapítható, hogy a vízoszlopban, biológiai úton megkötött nitrogén jelentős mértékben hozzájárul a tavak nitrogén mérlegéhez. Egyes tavakban elérheti a teljes külső nitrogén terhelés felét. Nyilvánvaló, hogy a tápanyagdúsulással felgyorsuló vízminőségromlás megállítása és a tórekonstrukciós munkák tervezése, valamint az aquakultúra szempontjából e mennyiségileg is fontos biológiai folyamattal számolnunk kell.

A tavak nitrogén mérlegében a biológiai nitrogénkötés nagyságának a becslésénél eddig csupán a vízoszlopban megkötött nitrogén mennyiségét vették számításba, holott a rendelkezésre álló kevés számú adat szerint a nitrogénkötés az üledékben is jelentős lehet (SUGAHARA et al. 1971, KEIRN és BREZONIK 1971, SARALOV és DAUKSTA 1978). Elfogadható becslést lehetővé tevő évszakos vizsgálatokat csupán SARALOV (1978) végzett a Ribinszki-víztárolón. Becslése szerint a víztároló üledékében megkötött nitrogén mennyisége 1973-ban kevéssel meghaladta, 1974-ben pedig megközelítette az üledék fölötti vízoszlopban megkötött nitrogén mennyiségét. Ezek az adatok tehát azt jelzik, hogy a vízoszlopban és az üledékben együttesen megkötött nitrogén mennyisége egyes tavakban elérheti a különböző szennyező forrásokból eredő külső terhelés teljes mennyiségét is.

A vízminőségvédelem és tórekonstrukció gyakorlata számára megdöbbentő eredmények felhasználását az operatív beavatkozások tervezésénél, az adatok kevés száma nehezíti. Üledék nitrogénkötés mérésénél kérdéses az eddig alkalmazott módszerek megbízhatósága is. Jelen munkánkban leírjuk az üledék nitrogénkötés méréséhez kifejlesztett gyors és megbízható acetilénredukciós módszert, amely az in situ körülmények maximális megtartásán alapul. Ellenőrző kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az alkalmazott módszerrel valóban a

tóüledékben, in situ folyó nitrogénkötés mennyiségét mérjük. A nitrogénkötés nagysága mellett mértük az üledék felső 20—25 cm-es rétegében, a nitrogénkötés és a befolyásoló tényezők vertikális eloszlását is.

Tavak és módszerek

Ekoszisztéma típusok

A vizsgálatokat négy sekély tavi ekoszisztéma típus üledékével végeztük, e tavak szerkezetével és működésével kapcsolatos komplex kutatási program keretében (OLÁH 1980). Mind a négy sekélytavi típus a hipereutróf tavak közé sorolható és a tápanyagterhelés szerint a következő sorrendben növekvő gradiens mentén helyezkednek el (1. táblázat).

I. Keszthelyi-medence (Balaton). A külső szerves és szervetlen tápanyagterhelésnek leginkább kitett medence, az elmúlt tizenöt év során gyorsan eutrofizálódott. A medence jelenlegi állapotában a sekély, hipertróf ekoszisztémák jellegzetes tüneteit mutatja (OLÁH 1975, HERODEK 1977). A kedvezőbb vízminőségi állapot visszaállítására számos restaurációs kezelési szintű eljárás alkalmazásának lehetősége felmerült. A leghatékonyabbak kiválasztása, időzítése és nagyságrendje alternatív elemzés és kísérleti próbák alatt áll. Üledékeltávolítás, makrofita aratás, a Kisbalaton természetes mocsárvilágának visszaállítása a befolyó víz szűrése céljából, növényevő halak betelepítése. A vízi környezetvédelem szempontjából e típusú rendszerben folyó anyag és energia forgalom, jelen esetben az üledék nitrogénkötésének vizsgálata a legsürgetőbb. A medence népgazdasági jelentősége, valamint a javított módszerünkkel mért igen jelentős nitrogénkötés indokolták, hogy a vertikális eloszlás törvényszerűségeinek a vizsgálatát erre a víztípusra koncentráltuk.

II. Körös-holtág víztároló. Kisebb-nagyobb vízfolyásainkon egymás után épülnek különböző célt szolgáló víztárolók. A Körös Kákafoki-holtág víztároló sokcélú: belvíz fogadás, öntözés, hal-kacsa tenyésztés. A szabályozott árteres folyók mentén a holtágak számos típusa képviseli a levágott kanyarszakaszo-

1. táblázat

A vizsgált tavak

	I.	II.	III.	IV.
Terület, h	3200	42	0,14	0,14
Átlagos mélység, m	2	2,5	1	1
Vízcsere	360	10	120	120
Szerves-C terhelés, g m^{-2} $év^{-1}$	50	77	100	500
Halsűrűség, ha^{-1}	120	1800	7000	5000
Szűrő hal, ha^{-1}	2—4	110	2500	4000
Bentosz evő hal, ha^{-1}	80	200	4000	1000
Halprodukció, kg ha^{-1}	67	130	4300	2500

kat, lehetőséget nyújtva többek között olcsó és hatékony aquakultúrás kezelésre. Az egyszerű kultúra a kacsa és a hal megfelelő népesítésén és a kacsa takarmányozásán alapul. A költséges mesterséges kacsatáp nem hasznosított része, a kacsatrágya a legjelentősebb allochton szervesanyag és tápanyag forrás. A természetes vizek aquakultúrás hasznosításának ez a legmagasabb szintje.

III. Polikultúrás halastó. A kínai és indiai pontyok gyors világméretű terjedése kitűnő lehetőséget teremt a mesterséges haltenyésztő agroekoszisztémák ekológiai hatékonyságának növelésére. Ma a trópusokon, de a mérsékelt égövben is a polikultúrás termeléstechnológia bizonyul a leggazdaságosabb aquakultúrának. A gondosan és aprólékosan kifejlesztett, 2—8 halfajt magába foglaló népesítési szerkezetek nagy táplálkozási nyomást fejtenek ki a plankton és bentosz társulásokra, miközben csaknem teljességgel hasznosítják a halastó teljes természetes tápanyagkészletét. Az állandóan magas elsődleges termelést a gyakori és optimális dózisú műtrágyázási technológia biztosítja. Olcsó, alacsony fehérjetartalmú gabonafélék kiegészítő takarmányozása tovább emeli a halhozamot, jóval a természetes produkció fölé. A 4300 kg ha^{-1} haltermelésből a természetes hozam csupán 1300 kg ha^{-1} körüli. A nem teljesértékű, alacsony fehérjetartalmú takarmány nagyon nagy hányada csak közvetve hasznosul, miután kihasználatlanul megy át a halállomány bélcsatornáján és belép a halastó anyag- és energiaforgalmába.

IV. Hígtrágyás halastó. Az energia-, fehérje- és környezetkrízis feloldásának egyik lehetséges alternatívája a lokálisan hozzáférhető, megújítható és legtöbbször szennyező forrásként jelentkező energiaforrások gazdaságos felhasználása, a globális szervesanyag-termelés nagyobb hányadát jelentő szerves hulladékok visszaforgatása. A fejlett országok iparszerű hústermelési rendszereiben óriási mennyiségben keletkező hígtrágya visszaforgatása többnyire megoldatlan. Magyarországon a hígtrágyák eleresztésével évente mintegy 150 ezer tonna szervesanyag, gyakorlatilag kukorica kárba vész és ráadásul természeti környezetünkben többnyire szennyező forrásként jelentkezik. A hígtrágya visszaforgatásának egyik legolcsóbb és leghatékonyabb formája a haltenyésztés. A hal rendkívül energiatakarékos fehérje termelése biológiai tulajdonságainak köszönhető. Ehhez adódik, hogy a hal élőközege a víz igen alkalmas a hígtrágya fogadására és haltáplálékká való átalakítására. A hígtrágyás halastóban az elsődleges termeléshez adódik a naponta beadagolt jelentős mennyiségű szervesanyag, amely a baktériumokon keresztül haltáplálékként jelentkezik. A tenyésztési szezonban bevitt mintegy 500 g m^{-2} szerves szén megközelíti a tóban elsődlegesen megtermelt szervesanyag mennyiségét. Az általunk kidolgozott sertés hígtrágyás technológia a szűrő táplálkozású kínai nagy pontyokra épül és a szennyvíz-oxidációs halastóhoz hasonlóan a közönséges pontynak csak másodlagos szerepe van. Az aljzaton táplálkozó ponty a vízüledékhatár állandó felkavarásával biztosítja a megfelelő redox viszonyokat a rendszer hatékony működéséhez.

Módszerek

A bakteriológiai vizsgálatokhoz az üledékmintát Hargrave mintavevővel vettük. A Keszthelyi-medencében mintavevővel a kutatóhajó fedélzetére felhozott érintetlen, 25 × 25 × 30 cm-es üledékhasábról a vizet szifonnal leeresztettük és sterilizált, 5 cm átmérőjű üveghengerrel, e folyamatot többször megismételve 5—10 részmintát vettünk. A rétegvizsgálatokhoz az üveghengerekből az üledékhurkát fokozatosan kinyomtuk és 5—10 részminta megfelelő rétegeit keveréssel sterilizált üvegedényben homogenizáltuk. Az aerób nitrogénkötő baktériumok mennyiségi meghatározására széles spektrumú, több szénforrás keverékét tartalmazó tápoldatot, az anaerób Clostridium típusú nitrogénkötő baktériumok számlálására pedig a klasszikus Winogradsky-féle táptalaj, aszkorbinsavval és élesztőkivonattal gazdagított változatát használtuk (Rodina 1972). Az üledék intersticiális vizében a különböző nitrogén formák vertikális elterjedésének meghatározásához az üledék vizet Reeburgh (1967) szerint készített üledékpréssel, nitrogén atmoszférában nyertük ki. Az intersticiális vízben az NH_4—N koncentrációt indofenolos módszerrel (Scheiner 1976, Verdouw és mtsai 1978), az NO_2—N és NO_3—N mennyiségét pedig Gries-Ilosvay reagenssel és a kadmium redukciós módszerrel mértük, Strickland és Parsons (1968) eljárást alkalmazva. A redox és pH gradienst a Hargrave mintavevővel fedélzetre hozott üledékhasábba fokozatosan beszúrt sima platina elektróddal mértük kalomel elektróddal szemben, illetve kombinált üvegelektróddal. Az értékek leolvasását 5 mV-nál kisebb drift mellett végeztük. Az üledék nitrogénkötésének méréséhez korábban használt módszerünket (Oláh és mtsai 1979) a hibaforrások kiküszöbölése céljából a következők szerint fejlesztettük tovább.

Módszer fejlesztés

Kémiai vagy biológiai redukció ?

Említettük, hogy a biológiai úton megkötött nitrogén gáz mennyiségének becslésére tavi üledékekben alig végeztek méréseket. A vízoszloppal összehasonlítva ugyanis az in vitro mérési módszerek általános hibái fokozott mértékben csökkentették a becsléshez felhasználható mérési adatok megbízhatóságát. Az acetilénredukciós módszer ökológiai alkalmazása során hamarosan felmerült a kérdés, hogy az acetilén redukciójáért valóban a nitrogenáz enzim a felelős, vagy esetleg a vízben, de különösen az üledékben jelenlevő redukált anyagok is részt vesznek a folyamatban. E kérdések tisztázása a redukált, szervesanyagban gazdag tavi üledékek vizsgálatánál különösen indokoltak voltak. Brooks és mtsai (1971), valamint Keirn és Brezonik (1971) sokoldalúan bizonyították, hogy az üledékhez adott acetilénből az etilénképződés valóban biológiai úton megy végbe.

A háromszoros bizonyítási eljárást a Keszthelyi-medence üledékével megismételve megállapítható, hogy az acetilén redukciója a sekély tavak kisebb szervesanyag tartalmú üledékeiben is döntően biológiai folyamatok, közelebbről a nitrogenáz enzim működésének az eredménye.

1. Különböző cukrok hozzáadását követő rövid inkubációs idő alatt (0,5—4 óra) az üledék nitrogénkötő mikrobiális populációitól függően szelektíven nő az acetilénredukció. A Keszthelyi-medence felső centiméteres üledékzónájából származó, homogenizált minta acetilénredukáló képessége egyértelműen növekedett 10^{-3}—10^{-1} M végkoncentrációjú glükóz és szukróz hozzáadása hatására. Hasonló koncentrációjú acetát egy kísérletben serkentő, két két kísérletben gátló hatást váltot ki. BROOKS és mtsai (1971), KEIRN és BREZONIK (1971) egyértelmű stimuláló hatást csak szukróz hozzáadáskor kapott. A glükóz, acetát és butirát hol serkentő, hol gátló hatást váltott ki. MARSHO és mtsai (1975) a Chesapeake-öböl mocsaras üledékével dolgozva csak a szukrózra kapott egyértelmű pozitív hatást, a glükózra nem. PEARSON és TAYLOR (1978) szennyezett csatorna üledék esetében, hosszú, 24 órás előinkubálás után 2,5 10^{-3} M végkoncentráció mellett gyakorlatilag minden vizsgált cukorra meglepően nagy acetilénredukció növekedést kapott. Eredményeik szerint, ami alig hihető, ugyanezen üledékmintákban a hosszú inkubálás ellenére sem növekedett a baktériumok száma. Mindezen adatok azt sugallják, hogy az acetilénredukció növekedéséért a vizsgált üledékekben, a megfelelő szén forrásra kiéhezett nitrogénkötő baktériumpopulációk a felelősek.

2. Az abiotikus acetilénredukció feltételezett lehetőségét kizárták az 1,5%-os triklórecetsavval vagy a 6,4 g dm^3-es végkoncentrációjú higanykloriddal mérgezett üledékek negatív eredményei. A Keszthelyi-medence és a Körösholtág víztározó üledékekből vett mintákban a mérgezés után nem volt mérhető acetilénredukció. Természetesen a nem kellően tiszta acetilénben jelenlevő etilén, megfelelő vakpróbák és korrekciók nélkül az eredményeket meghamisítja.

3. Az acetilénredukció enzimatikus jellegét és azt, hogy a redukciót valóban a nitrogenáz enzim végzi a tavi üledékekhez hasonló rendkívül heterogén mintákban is, közvetlenül is ellenőriztük. Amikor a Keszthelyi-medence üledékéhez adott különböző koncentrációjú acetilén mellett keletkezett etilént a mintához adott acetilénkoncentrációkkal összefüggésben ábrázoltuk, a Michelis-Menten model tipikus enzim vagy telítődési kinetikáját kaptuk. A hélium atmoszférában minden acetilén koncentrációnál több etilén képződött, mint nitrogén atmoszférában. Az eredmények Lineweaver-Burk ábrázolása egyértelműen mutatta az etilén képződés nitrogén gáz által kiváltott kompetitív enzim gátlását.

Enzimtelítés

Miután bebizonyosodott, hogy az acetilén redukciója etilénné az üledékben is biológiai úton történik, a következőkben azt vizsgáltuk, milyen feltételek mellett telíti a mintához adott acetilén mint modellszubsztrát az üledék nitrogénkötő helyeinek enzimkészletét. Bár az acetilén vízben lényegesen jobban oldódik az etilénnél az üledékvizsgálatnál nagyobb hibát eredményezhet, hogy a reakcióedény gázterébe bevitt acetilén nem telíti megfelelő gyorsasággal a teljes üledékmintát és az üledékben képződő végtermék, az etilén lassú diffúziója következtében a mennyiségi kinyerés pontatlan. E módszertani problémák tisztázására három kísérletsorozatot végeztünk a Körös-holtág víztározó felső 8 cm-es üledékrétegével. Mindhárom kísérletsorozatban a mérőedénybe 5 mm-től 50 mm-ig növeltük az üledékminta rétegvastagságát. A gondosan homogenizált, ugyanazon üledékkel egyszerre feltöltött mérőedényekkel az első sorozatban rázás nélkül végeztük el az acetilénredukció mérést, a második sorozatban az inkubálás után 60 másodpercig erőteljesen ráztuk az üledéket tartalmazó mérőedényt, a harmadik sorozatban a rázást az inkubálás megkezdése előtt és után is elvégeztük (2. táblázat). Az 1 cm^3-re számított acetilénredukció a rázás nélküli kontrollhoz viszonyítva az inkubálás utáni rázás hatására egyértelműen növekedett a 10 mm-nél vastagabb üledékrétegeket tartalmazó mintákban. Ha az üledéket az inkubálás előtt és után is ráztuk az acetilénredukció tovább növekedett és egységnyi üledékmennyiségre vonatkoztatva lényegében azonos volt minden rétegvastagságnál Az inkubálás előtti rázás hatására az üledék fölötti gáztérbe befecskendezett acetilén gyorsan telítette a teljes üledéket, biztosítva ezzel az üledék enzimkészletének gyors telítődését a modellszubsztráttal. Az inkubálás utáni rázás lehetővé teszi az üledékben képződött és ott túltelítődő etilén gáz pontos mennyiségi kinyerését. Az acetilén gyors oldódása és az etilén pontos kinyerése tehát egy perces kézi rázással kielégítően megoldható. Rázás nélkül egy napos inkubációs időt hasz-

2. táblázat

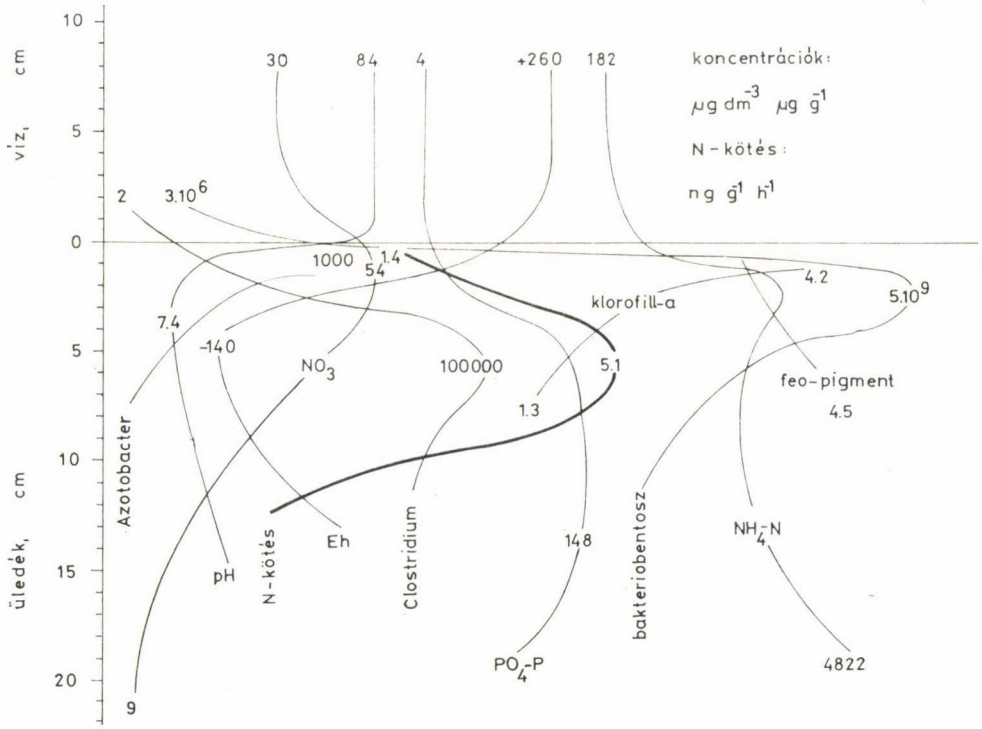
Az acetilénredukció függése az üledékréteg vastagságától in vitro inkubálás során, A = ng N cm^{-3} h^{-1}, B = ng N reakcióedény^{-1} h^{-1} Körös-holtág víztároló felső 8 cm üledék homogenizálva 1980. március 10., reakcióedény térfogata: 270 ml, inkubációs gázelegy: 85% levegő, 15% C_2H_2, inkubációs idő: 24 óra, 1 perc erőteljes kézi rázás nélkül, inkubálás utáni rázással és inkubálás előtti és utáni rázással

Üledék vastagság mm	Rázás nélkül		Rázás inkubálás után		Rázás inkubálás előtt és után	
	A	B	A	B	A	B
5	5,4	2,7	3,2	1,6	0,0	—
10	6,0	6,0	5,1	5,1	2,1	2,1
20	2,2	4,4	4,3	8,6	—	—
30	1,3	3,9	2,2	6,6	2,4	7,2
40	1,0	4,0	2,0	8,0	2,5	10,0
50	0,8	4,0	1,6	8,0	2,2	11,0

nálva a diffúziós hibaforrások elkerülése érdekében legfejlebb 10 mm-es rétegvastagságú üledékmintával dolgozhatunk. Az inkubációs idő csökkentésével párhuzamosan a rétegvastagságot is csökkenteni kell. 24 órás inkubálásnál megengedhető legnagyobb rétegvastagság rizsföldi talajoknál is 10 mm körüli volt. Ennél vastagabb talajréteggel dolgozva az acetilén már nem érte el a mélyebb rétegek nitrogénkötő helyeit (LEE és WATANABE 1977).

Fiziko-kémiai-biológiai gradiensek megőrzése

Vízben az acetilénredukció mérésekor az acetilén berázás és az etilén kirázás egyszerűen megoldható anélkül, hogy a minta természetes állapotát jelentősen megváltoztatnánk. Jelenleg lényegében ehhez hasonlóan történik az üledékben is az acetilén redukció mérése (SUGAHARA és mtsai 1971, KEIRN és BREZONIK 1971, BROOKS és mtsai 1971, SARALOV 1978), a vízzel ellentétben azonban az üledék 5—10 cm-es vastagságú rétegét homogenizálva alapvetően megváltozik a természetes állapot és a valóságostól eltérő folyamatot mérünk. A vízoszloppal összehasonlítva ugyanis a vízüledékhatáron és az üledék felső 20—30 cm-es zónájában gyakran milliméterenként jelentős mértékben változik a fiziko-kémiai környezet és a bentosz társulást alkotó populációk nagy-



1. ábra. Fiziko-kémiai-biológiai gradiensek és a nitrogénkötés vertikális eloszlása a Keszthelyi-medence vízüledék határán

sága. Mintavételkor és inkubálás előtt az üledékminta alapos rázásával szétromboljuk az in situ természetes állapotban szigorúan meghatározott és elrendezett fiziko-kémiai és biológiai gradienseket és a valóságos aktivitástól lényegesen eltérő választ mérünk. Világosan láttuk ezt a hibaforrást a Keszthelyi-medence esetében, ahol korábban részletesen dolgoztunk a vízüledékhatár különböző gradiensein (OLÁH 1972, 1973, 1975). Ha a vizsgálataink során feltárt és leírt gradiensek trendjeit egyetlen ábrán összesítjük, első ránézésre nehezen áttekinthető, de szigorú törvényszerűségek által meghatározott gradiens elrendeződést kapunk (1. ábra). Ha a felső öt cm-es üledékréteg aktivitását mérjük és az inkubálás előtti rázással a mintát, és a gradienseket gyakorlatilag homogenizáljuk, azonos redox viszonyokat teremtünk a Clostridium és Azotobacter populációk számára, holott a valóságban az alapvetően eltérő fiziológiai típusú populációk csak az üledék szigorúan meghatározott rétegében kötnek jelentős mennyiségű nitrogént. Rázással megváltoztatjuk az üledék intersticiális vízében kialakult éles NH_4—N és más tápanyag gradienst is, amely pedig a nitrogénkötés szempontjából meghatározó lehet. A gradiensek közé felvittük az 1977. augusztus 4-én centiméterenként mért acetilénredukció görbét. A vizsgálat idején az acetilénredukció maximuma egybeesett a Clostridium maximummal és az üledék intersticiális vízében oldott NH_4—N minimummal. További részletezés nélkül javasolható, hogy az inkubálás előtti és utáni rázást igénylő eljárást, lehetőleg csak a nitrogénkötés rétegződésének a vizsgálatára, illetve olyan mérésekre használjuk, amelyekben a kitűzött cél lehetővé teszi a vékony üledékréteg használatát.

Az in situ eljárás és módszer

Jelen munkánkban az üledék nitrogénkötésének vertikális eloszlását a Hargrave mintavevővel vett üledékhurka felszeletésével nyert 10 mm vastagságú rétegből 1 g üledékkel határoztuk meg. A felszíni rétegből vett mintát 0,65 He, 0,2 O_2 és 0,15 atmoszféra C_2H_2 gázfázisban, a mélyebb rétegekből vett mintákat pedig 0,85 He és 0,15 atmoszféra C_2H_2 gázfázisban inkubáltuk. Inkubálás előtt és után az üledékmintát ráztuk. Az inkubálást in situ az üledék felett végeztük.

Vizsgálataink elején, 1977-ben az üledék teljes nitrogénkötését a Keszthelyi-medencében és a polikultúrás halastóban érintetlen üledékhurka módszerünkkel határoztuk meg (OLÁH és mtsai 1979; EL SAMRA és OLÁH 1980), elsősorban az eredeti in situ fiziko-kémiai és biológiai gradiensek megtartására ügyelve. Későbbi az acetilén diffúziójával kapcsolatos kísérleteinkből következik, hogy ezzel a módszerrel az in situ gradienseket megtartottuk ugyan, de a modellszubsztrátként szereplő acetilén csak a felső 1 cm-es üledékréteget telítette, így a mért aktivitás a valóságosnál lényegesen kisebb volt. Tulajdonképpen csak az üledék felső centiméterének az aktivitását mértük (2. táblázat). Az eredeti in situ fiziko-kémiai és biológiai gradiensek megtartása és az acetilén

tökéletes telítése céljából alakítottuk ki az érintetlen üledékhurka perforált műanyaghengerben módszert. A 40 cm hosszú és 5 cm átmérőjű PVC műanyag csövet, alsó 20 cm-es szakaszán 2 cm-enként átlyukasztottuk és jól tömítő teflon dugóval zártuk. A Hargrave mintavevőből kiszúrt, érintetlen üledékhurkát ezeken a lyukakon keresztül injekciós tűvel és fecskendővel gyorsan tudtuk acetilénnel telíteni közvetlenül az inkubálás megkezdésekor. A 2 cm-es üledékrétegekbe 2 ml, acetilénnel telített desztillált vizet (1,6 ml C_2H_2 1 ml vízben) fecskendeztünk be a teflon dugóval lezárt lyukakból kiindulva sugarasan több irányban, egyenletesen szétosztva. Az üledék feletti, előzetesen 0,8 He és 0,2 atmoszféra O_2 keverékkel átmosott gáztérbe egyetlen, teflon dugóval zárt lyukon keresztül 0,15 atmoszféra végkoncentrációjú acetilént fecskendeztünk be. Az így előkészített mérőedényt perlon zsinórral közvetlen az üledékréteg fölé függesztettük fel. Az inkubálás után a mérőedényt erőteljesen ráztuk a képződött etilén pontos mennyiségi visszanyerése céljából. A kevesebb vizet tartalmazó üledékeknél az érintetlen üledékhurka szétrázásához gyakran 20 perces erőteljes kézirázásra volt szükség. A kirázás után az eredeti pozícióba visszarázott üledék fölötti gáztérből mintát vettünk a gázkromatográfiás elemzéshez. A gázkromatográfiás elemzést a korábban leírtak szerint végeztük (Oláh és mtsai 1979). Minden mérésünknél higanykloriddal mérgezett kontrollal is dolgoztunk, amely a mintához hasonló kezelésen esett át, azzal a különbséggel, hogy az acetilén beinjekciózása előtt a teflon dugókon keresztül injekciós tűvel a teljes üledékhurkát mérgeztük. A perforált műanyaghengeres módszerrel az üledékben folyó in situ nitrogénkötés túlnyomó részét megbízhatóan és gyorsan mérhettük, miután rétegvizsgálataink eredményeiből látni fogjuk, hogy a nitrogénkötés az üledék felső 20 cm-es rétegére koncentrálódik.

A Keszthelyi-medencében azonos időpontban mértük a vertikális eloszlást és a perforált műanyaghengeres módszerrel a teljes nitrogénkötést. A felső 20 cm-es üledékréteg 1—2 cm-enkénti vertikális adatainak az átlagának azonosnak kell lenni a perforált műanyaghengeres módszerben erőteljesen össze-

3. táblázat

A perforált műanyaghengeres módszer 20 cm rétegvastagságú üledékének átlagos nitrogénkötése (A) és a vertikális eloszlás vizsgálatban 1—2 cm-enként külön mért értékekből számolt átlagos nitrogénkötés (B) a Keszthelyi medencében

	A	B	A/B
1980. 05. 14.	1,87	2,1	0,89
06. 10.	3,82	1,53	2,4
07. 08.	6,70	2,98	2,2
08. 12.	5,38	1,04	5,1
11. 11.	0,67	0,66	1,01

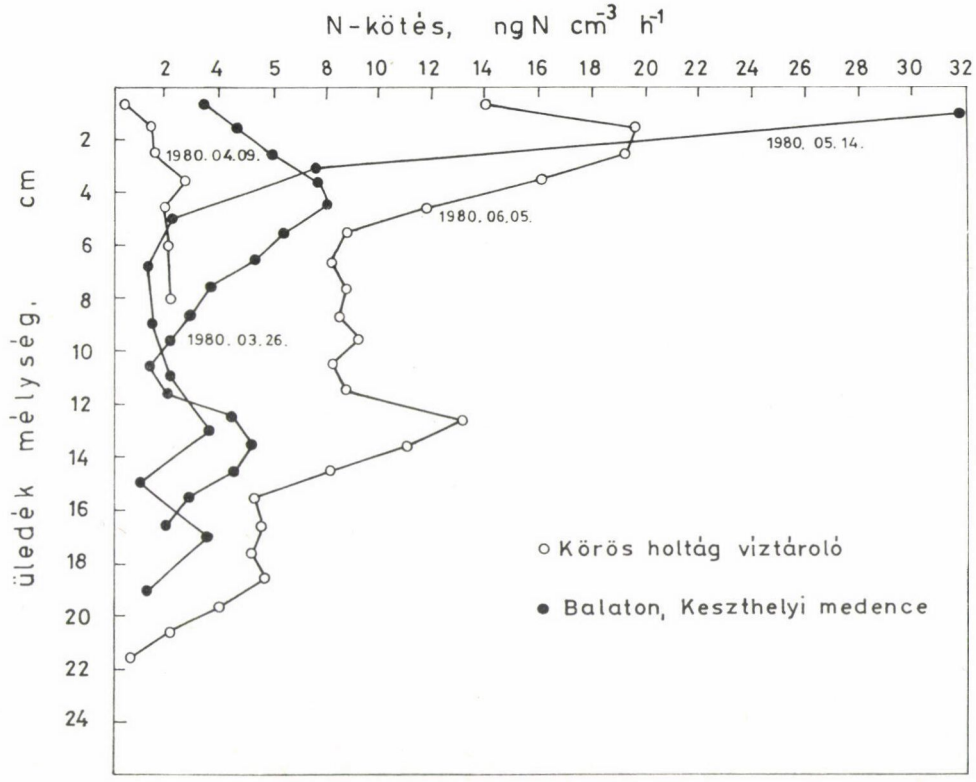
rázott üledékminta nitrogénkötésével. Eredményeink szerint azonban a két módszerrel kapott értékek csak a tavaszi és őszi vizsgálatok során volt azonos vagy nagyon közeli (3. táblázat). Nyáron, igen nagy nitrogénkötés mellett a vertikális értékekből számított átlagos nitrogénkötés lényegesen kisebb volt. 1980. augusztus 12-én 5,1-szer. Valószínűleg az üledékeknél használt hagyományos acetilén telítési eljárás, amikor a modellszubsztrátot az üledék fölötti gáztérbe viszem be, még akkor sem tökéletes, ha az üledék rétegvastagságot 10 mm-re csökkentem, legalábbis nagy nitrogenáz enzimkészlet esetén. Ugyanakkor a perforált műanyaghengeres eljárásunknál a vízzel egyenletesen bevitt acetilén azonnal és gyorsan telíti az üledék teljes enzimkészletét.

Fiziko-kémiai-biológiai gradiensek és a nitrogénkötés vertikális eloszlása az üledékben

Nitrogénkötés

Egységnyi üledékfelület nitrogénkötésének becslésére a perforált műanyaghengeres módszerünkkel kapott mérési eredményeket használjuk. Az alkalmazott eljárással az üledék felső 20—25 cm zónájának átlagos aktivitását mérjük. Felmerült a kérdés, hogy van-e jelentős nitrogénkötés az ennél mélyebb rétegekben. Üledékekben a nitrogénkötés vertikális eloszlását még kevesen vizsgálták, a mikrorétegződést pedig egyáltalán nem. Ez feltehetően a vertikális felvételezés módszertani nehézségeivel és munkaigényességével magyarázható. Brooks és mtsai. (1971) sekély tengerparti üledékben rendszeresen a 2—5 cm-es üledékrétegben mérték a nitrogénkötés maximumát. Az 5 cm-es réteg után gyors csökkenés következett és a felső 2 cm-es zónában nem volt mérhető nitrogénkötés. Keirn és Brezonik (1971) öt floridai tóban mérték a nitrogénkötés rétegződését az üledékben. A tengerparti üledékhez hasonlóan a maximumokat legtöbbször közvetlenül a felszín alatti rétegekben mérték, amely a mélységgel gyorsan csökkent. Saralov és Dauksta (1978) kilenc litván tóban mérte az acetilénredukció vertikális eloszlását az üledékben. A maximum rétegek elhelyezkedése évszakosan változott, nyáron általában az üledékfelszínen, télen pedig a mélyebb, 2—10 cm-es zónában helyezkedett el. A 10 cm-nél mélyebb rétegekben rendszerint kicsi volt a nitrogénkötés.

Sekély víztípusaink közül a Keszthelyi-medencében és a Körös-holtág víztározóban vizsgáltuk az üledékben a nitrogénkötés vertikális eloszlását. Mivel a felsorolt vertikális vizsgálatokban vastag, 5 vagy 10 cm-es üledékréteg homogenizátumok nitrogénkötését mérték, a pontosabb eloszlás tisztázása céljából saját vizsgálatainkban 1 vagy 2,5 cm-es üledékrétegekből nyert homogenizátumok nitrogénkötését mértük. A vertikális eloszlás víztípusok és évszak szerint változott (2. ábra). A Keszthelyi-medencében kora tavasszal a vertikális eloszlás az üledékben lényegében azonos volt az 1. ábrán bemutatott típus-



2. ábra. A nitrogénkötés vertikális eloszlása a Keszthelyi-medence és a Körös-holtág víztározó üledékében

sal. A nitrogénkötés maximuma az üledékfelszín alatti 4 és 5 cm-es mélységű rétegben helyezkedett el. Ezt követően a 11 cm-es rétegig gyorsan csökkent, majd a 13—15 cm-es rétegekben újabb maximumot mértünk. A május 14-i vizsgálat során a vertikális eloszlás változott. A felső 2 cm-es rétegben igen nagy nitrogénkötést mértünk, amely a 4—6 cm-es rétegig nagyon alacsony értékre csökkent. A 4—10 cm-es üledékzónában a kora tavaszinál lényegesen kisebb volt a nitrogénkötés. A második, mélyebb és kisebb maximum most is jelen volt. A Körös-holtág víztározóban az április 9-i vizsgálat alkalmával egy nagyságrenddel kisebb értékeket mértünk, mint a június 5-i vizsgálat során. Legkisebb nitrogenáz enzim aktivitást a felszíni 2 cm-es zónában mértünk. Az aktivitás a felszíntől a 4 cm-es rétegig emelkedett, majd ezt követően azonos volt a mért 8 cm-es rétegig. A június 5-i vertikális eloszlás a Keszthelyi-medencéhez hasonlóan két maximumot mutatott. A mélyebb maximum itt is a 12—14 cm-es üledékzónában helyezkedett el. A felszín közeli maximum a 3—4 cm-es rétegben volt. A mért legmélyebb 22 cm-es üledékrétegben a nitrogénkötés már alacsony volt, kisebb mint 1 ng N h^{-1} egy g száraz üledékre számítva. A

4. táblázat

A nitrogénkötés évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-medence üledékében, ng N $cm^{-3} h^{-1}$

Üledékmélység, cm	1980. 05. 14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
0—2	32,9	11,06	35,16	11,42	4,87
2—4	7,72	6,45	12,38	3,14	3,63
4—6	2,26	3,81	—	4,90	2,59
6—8	1,41	2,69	7,22	2,84	3,02
8—10	1,69	4,96	4,65	2,66	1,27
10—12	2,23	2,40	2,78	0,72	1,39
12—14	3,94	2,98	1,67	0,61	0,49
14—16	1,01	2,41	—	0,73	0,39
16—18	3,76	1,13	—	0,67	0,18
18—20	1,47	—	1,20	0,26	0,16
20—22	—	1,56	—	—	—
22—24	—	0,50	—	—	—
24—26	—	0,62	—	—	—
26—28	—	1,07	—	—	—
28—30	—	0,66	—	—	—

nitrogénkötés részletesebb évszakos vertikális eloszlás vizsgálata a Keszthelyi-medencében azt mutatja, hogy a melegvízű évszakokban a nitrogénkötés maximuma az üledék felső 2 cm-es rétegében van (4. táblázat). A mélyebb üledékrétegekben gyorsan csökken a nitrogénkötés, de kisebb-nagyobb felszín alatti maximumok is kialakulhatnak. A felszín alatti maximumok vertikális elhelyezkedése azonban a havonkénti vizsgálatok során jelentős mértékben változott. A felszín alatti maximum május 14-én a 12—14 cm-es, június 10-én a 8—10 cm-es rétegben volt. Július, augusztus és október hónapokban csak a felszínen volt maximum, felszín alatti maximumok nem alakultak ki. Az eddigi vizsgálatokból kiderül, hogy a tavi üledékekben a nitrogénkötés döntő többsége a felső 20 cm-es üledékzónára koncentrálódik. Ennél mélyebb rétegekben az aktivitás ritkán haladja meg a 0,5—1 ng N $cm^{-3} h^{-1}$ értéket. A felső 20 cm üledékréteg nitrogénkötését mérő, perforált műanyagbengeres eljárásunkkal tehát az egységnyi üledékfelület teljes nitrogénkötése jól becsülhető. Az üledékek nitrogénkötésének összehasonlításánál a részletes rétegvizsgálatok nélküli adatokat minden esetben az üledék felső 20 cm-es zónájára számítottuk.

pH

1980-ban, a Keszthelyi-medence üledékében rétegenként vizsgáltuk a nitrogénkötést befolyásolható fiziko-kémiai környezetet és a nitrogénkötésért felelős mikroorganizmusok mennyiségi eloszlását. A jól pufferolt, meglehetősen állandó pH értékkel jellemzett nyíltvíz az elmúlt évtizedben a Keszthelyi-medencében drámai változáson esett át. Jelenleg a pH erőteljes napi ritmust mutat, az elsődleges termeléstől függően a napszakos változás a vízoszlopban

5. táblázat

A pH évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-öböl intersticiális vizében

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05.14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
Iszap feletti víz	7,05	7,51	7,34	7,71	7,45	7,82
0—2,5	7,15	7,38	7,28	7,55	7,72	7,73
2,5—5,0	7,45	7,38	7,45	7,52	7,70	7,83
5,0—7,5	7,67	7,34	7,38	7,92	7,59	7,59
7,5—10,0	7,51	7,44	7,78	7,95	7,91	7,88
10,0—12,5	7,52	7,37	7,76	7,61	7,95	7,76
12,5—15,0	7,55	7,55	7,71	7,72	8,20	7,89
15,0—17,5	7,65	7,71	7,82	7,82	8,18	7,78
17,5—20,0	7,67	7,74	7,83	7,95	8,02	7,98

már 8,2—9,1 közötti tartományban mozog. A napszakos változás a trofogén rétegben nagyobb és az aljzati vízrétegekhez közelítve csökken (OLÁH és mtsai. 1980). Jelen vizsgálatunkban használt módszerrel napszakos ritmust az üledékben már nem is tudtunk kimutatni. Az üledékrétegek évszakos pH vizsgálata azt mutatja, hogy a vízoszloppal összehasonlítva az üledék kevésbé lúgos (5. táblázat). Ismeretes, hogy a vízoszlopban a pH ősztől fokozatosan csökken tavaszig (ENTZ 1949—1950). Ez a változás az üledékre is érvényes. Az üledékfelszín kora tavaszi 7,15-ös pH értéke őszre 7,82-re növekedett. A jégolvadás utáni, kora tavaszi értékekhez képest, nyáron és ősszel még az üledék mélyebb rétegeiben is lúgosodik a környezet. Az esetek többségében a vízüledékhatár kevésbé lúgos, mint a mélyebb rétegek, feltehetően az erőteljesebb légzés következtében. A vizsgált üledékrétegekben a felszíni rétegen kívül az 5—7,5 cm-es réteg mutatott jelentős pH változást. Látni fogjuk, hogy ez az üledékréteg a többi vizsgált paraméter alapján is jelentős élettevékenységet mutat.

Redox potenciál

A vízüledékhatár és a mélyebb üledékrétegek 1980. évi évszakos redox potenciál vizsgálata jelentős változásra utal (6. táblázat). A hetvenes évek elején a vízüledékhatáron sohasem sikerült negatív redox potenciált mérnünk (OLÁH 1971, 1975), ugyanakkor jelen vizsgálatunkban, a melegvízű évszakokban a vízüledékhatáron a redox potenciál mindig negatív volt. Márciusban a vízüledékhatár, pontosabban a felső egy cm-es üledék redox potenciálja 65 mV volt és az első negatív értékeket csak a 4 cm mélységű üledékrétegben mértük. Májusra a felső egy cm-es üledékréteg már negatív volt, de még a legredukáltabb 13 cm-es rétegben is csak —84 mV értéket mértünk. A legmelegebb hónapokban a mélyebb rétegek redox potenciálja ennél lényegesen negatívabb volt, augusztusban a 17 cm-es rétegben elérte a —220 mV-ot. Júniusban és augusztusban az üledékfelszín is —100 mV körüli értéket mutatott. Októberre

6. táblázat

A redoxpotenciál (E_h) évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-öböl intersticiális vizében, mV

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05. 14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
1	65	−7	−95	−34	−81	15
2	15	−3	−108	−75	−89	—
3	0	−18	−122	−92	−102	−115
4	−45	−31	−140	−96	−109	—
5	−55	−34	−158	−103	−118	−208
6	−105	−56	−153	−108	−118	—
7	—	−55	−160	−122	−135	−230
8	—	−29	−170	−127	−137	—
9	—	−41	−157	−88	−132	−245
10	—	−46	−164	−110	−131	—
11	—	−51	−185	−155	−130	−275
12	—	−65	−175	−125	−144	—
13	—	−84	−185	−135	−145	−295
14	—	—	−185	−145	−135	—
15	—	—	—	−145	−180	−315
16	—	—	—	−155	−170	—
17	—	—	—	—	−220	−345

az üledékfelszín újra pozitív lett, de az oxidált üledékfelszín alatt erőteljes redukált környezet alakult ki, a 17 cm-es üledékrétegben −345 mV-ot mértünk. Az alacsonyabb hőmérséklet mellett a redukált anyagcseretermékek felhalmozódása dominált az eloxidálással szemben.

Oldott szerves-N

Az alacsonyabb vízhőmérséklet mellett a szervesanyagok lebontásának lelassulását bizonyítja az üledék intersticiális vizében oldott szerves-N évszakos eloszlása is (7. táblázat). Kora tavasszal, a jég elolvadása után az üledék in-

7. táblázat

Az oldott szerves-N évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-öböl intersticiális vizében, mg dm^{-3}

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05. 14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
Iszap feletti víz	1,62	0,01	0,307	1,521	0,10	1,41
0—2,5	—	2,60	0,21	4,89	3,35	6,109
2,5—5,0	14,30	1,40	1,20	3,37	2,76	6,124
5,0—7,5	12,96	3,71	0,10	4,16	0,98	2,525
7,5—10,0	10,73	2,25	4,98	2,01	0,71	5,038
10,0—12,5	8,16	4,10	3,14	1,39	2,95	0,195
12,5—15,0	7,01	3,20	3,55	1,05	3,05	0,828
15,0—17,5	8,06	1,50	3,91	0,04	3,80	1.321
17,5—20,0	7,33	1,90	2,70	0,04	3,29	1,880

tersticiális vizében feltűnően magas oldott szerves nitrogén koncentrációt mértünk. A 2,5—5 cm-es üledékrétegben az oldott szerves-N koncentráció 14,3 mg dm^{-3} volt. A feltehetően magasabb koncentrációjú üledékfelszín mintát méréstechnikai hiba következtében nem mérhettük. A mélységgel a szerves-N koncentráció gyorsan csökkent, de még a 17,5—20 cm-es üledékréteg intersticiális vízében is 7,33 mg dm^{-3} értéket mértünk. A téli hónapokban felhalmozódott oldott szerves-N május hónapban, a vízhőmérséklet gyors emelkedésével nagyon gyorsan elhasználódott, és egész nyáron alacsony szinten maradt. A pH környezethez hasonlóan az 5—7,5 cm-es rétegben változtak a legszembetűnőbben az értékek. Az üledékfelszín intersticiális vízében a legalacsonyabb szerves-N koncentrációt júniusban mértünk, amikor a téli felhalmozódás hatása már régen eltűnt, de a napi szervesanyag termelés maximuma még nem alakult ki. A vízhőmérséklet csökkenésével, októberre emelkedni kezdett az intersticiális víz szerves-N tartalma. Az emelkedés azonban még csak az üledék felső 10 cm-én észlelhető. A márciusi értékből látható, hogy az emelkedés tovább folytatódik és tél végére az alsóbb üledékrétegek oldott szerves-N készlete is megnő.

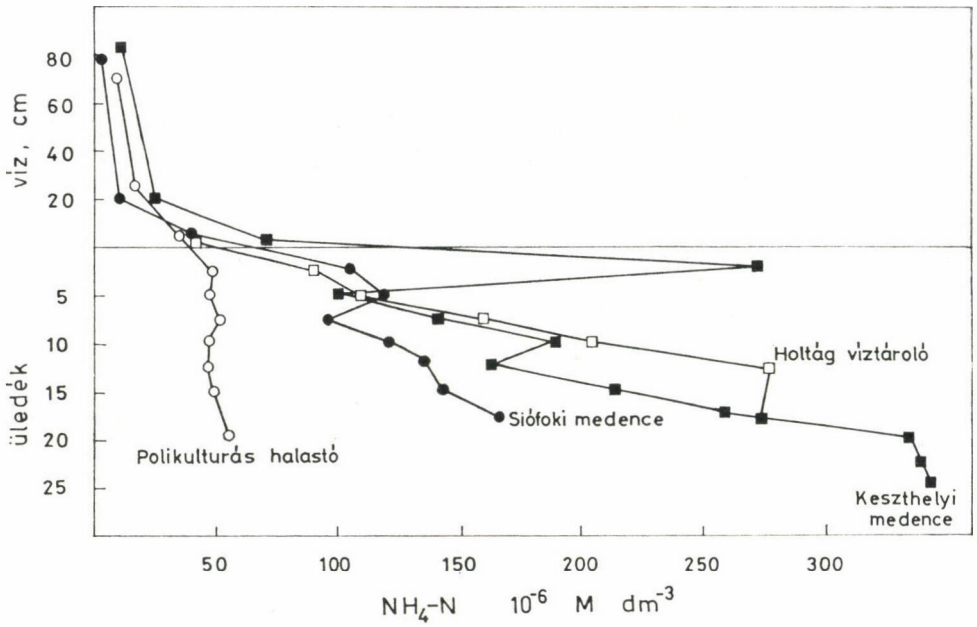
NH_4—N

Az üledék intersticiális vizében oldott szerves-N évszakos eloszlásához hasonlóan az NH_4—N koncentráció is a kora tavaszi hónapban volt a legmagasabb (8. táblázat). Az előbbivel ellentétben azonban az intersticiális vízben szabadon oldott ammónium ion egész évben igen nagy koncentrációban jelen volt, és ez a nitrogénkötés szempontjából különös jelentőséggel bír. Az üledékrétegek redox környezetéből következik, hogy az ammónium ion vertikális eloszlása a Keszthelyi-medencében már nem az oxidált üledékekre jellemző lefutású. A jelentős vastagságú oxidált üledékfelszínnel jellemzett üledékekben az ammónium ion koncentrációja a felszíntől lefelé haladva nő (Oláh 1975). Jelen vizsgálat alapján megállapítható, hogy ez az elterjedési típus már

8. táblázat

Az NH_4-N évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-öböl intersticiális vizében, mg dm^{-3}

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05. 14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
Iszap feletti víz	0,30	4,21	1,21	3,23	5,60	2,541
0—2,5	6,80	4,85	0,21	2,61	2,34	5,211
2,5—5,0	6,25	4,50	6,65	2,62	1,78	4,225
5,0—7,5	7,54	4,54	6,02	3,25	4,26	4,016
7,5—10,0	6,02	4,30	5,85	4,62	4,08	3,96
10,0—12,5	4,34	4,10	5,61	4,11	4,80	2,02
12,5—15,0	4,24	3,90	4,15	4,45	4,94	2,682
15,0—17,5	3,94	4,05	3,81	4,61	4,02	2,621
17,5—20,0	4,02	4,15	3,25	4,11	3,70	2,811



3. ábra. A tóvízben és az üledék intersticiális vizében oldott NH_4—N gradiensek a Keszthelyi medence, Siófoki medence, Körös-holtág víztározó és polikulturás halastó vízüledék határán

nem jellemzi többé minden évszakban a Keszthelyi-medence üledékét. Kora tavasszal a legmagasabb NH_4—N koncentráció az 5—7,5 cm-es rétegben volt, de a fölötte levő üledékrétegek értékei sem voltak lényegesen kisebbek. Májusban legtöbb ammóniumot az üledékfelszínen mértünk és lefele haladva alig csökkent a koncentrációja. Még közvetlenül az üledék feletti vízrétegben is hasonló koncentráció volt. Júniusban az üledék felső 2,5 cm-es rétegében feltűnően lecsökkent az ammónium ion koncentráció, legmagasabb a 2,5—5 cm-es rétegben volt és ezt követően fokozatosan csökkent egészen a vizsgált 20 cm-es rétegig. Júliusban szintén az üledékfelszínen volt a legkevesebb ammónium és fokozatosan növekedett a 7,5—10 cm-es rétegig, majd nagyjából azonos maradt. Kis eltéréssel hasonló típusú volt az augusztusi vertikális eloszlás is. Mindebből megállapítható, hogy a legmelegebb nyári hónapokban, erőteljes oxigén termelés mellett a vízoszlophoz közeli üledékrétegek ammónium ion tartalma kisebb, mint a mélyebb üledékrétegeké. Októberben megfordul a helyzet. Legtöbb ammóniumot a legfelső üledékrétegben mértünk és az értékek lefelé haladva csökkentek. Végeredményben ez az állapot stabilizálódik a tél folyamán és megmarad egészen a jégolvadásig, sőt, amint láttuk, még májusban is a legfelső üledékrétegben mértünk legtöbb ammóniát. Összehasonlító vizsgálatunk során legkevesebb intersticiális ammóniumot a polikultúrás halastó, legtöbbet pedig a Keszthelyi-medence üledékében mértünk (3. ábra).

NO_3 és NO_2

Az oldott szerves-N, de még az NH_4—N koncentrációhoz viszonyítva is az üledékben elenyésző az NO_3—N mennyisége (9. táblázat). A redox potenciál vertikális eloszlásából következően legtöbb nitrát ion a felső üledékrétegekben várható. Méréseink ezt egyértelműen bizonyították. Minden évszakban a felső üledékrétegekben mértünk legmagasabb nitrát koncentrációt. Kora tavasszal, amikor a redox profil a legpozitívabb volt, mértük a legmagasabb nitrát koncentrációt az üledékfelszínen. A vizsgálatok többségénél a nitrát koncentráció az üledékmélységgel párhuzamosan csökkent, de kis koncentrációt még a legmélyebb rétegben is találtunk. Októberben, a —345 mV redox potenciál mellett 39 $\mu g\ dm^{-3}$ nitrát koncentrációt mértünk. Az üledék intersticiális vizében az előbbi nitrogénformákhoz képest az NO_2—N mennyisége kicsi (10. táblázat). A hidegvízű évszakokban a nitrit ion mennyisége általában az üledékfelszínen volt a legnagyobb, szemben a legmelegebb nyári hónapokkal, amikor a felső 2,5 cm-es üledékrétegben kisebb értékeket mértünk. Maximumokat

9. táblázat

Az NO_3-N évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-öböl intersticiális vizében, $\mu g\ dm^{-3}$

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05. 14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
Iszap feletti víz	5	100	25	56	56	20
0—2,5	300	170	150	60	160	150
2,5—5,0	140	80	220	60	70	92
5,0 7,5	100	80	170	70	80	40
7,5—10,0	30	60	140	60	50	80
10,0—12,5	30	30	110	50	80	70
12,5—15,0	30	60	150	20	50	72
15,0—17,5	30	50	60	30	80	39

10. táblázat

Az NO_2-N évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-öböl intersticiális vizében, $\mu g\ dm^{-3}$

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05. 14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
Iszap feletti víz	16	32	5	2	34	18
0—2,5	25	45	5	5	6	16
2,5—5,0	2	5	7	14	4	17
5,0—7,5	11	5	5	5	5	5
7,5—10,0	1	5	18	6	1	6
10,0—12,5	1	11	15	5	7	8
12,5—15,0	5	4	10	6	3	22
15,0—17,5	2	3	4	5	11	5
17,5—20,0	1	7	1	9	5	35

mértünk még kora tavasszal az 5—7,5 cm-es, májusban a 10—12,5 cm-es, júniusban a 7,5—15 cm-es, júliusban a 2,5—5 cm-es, augusztusban a 15—17,5 cm-es, októberben pedig a 12,5—15 és 17,5—20 cm-es rétegekben.

Azotobacter és Clostridium

A több szénforrást tartalmazó, széles spektrumú táptalajon számolt Azotobacter típusú aerób nitrogénkötő baktériumok a Keszthelyi-medencében nem játszanak jelentős mennyiségi szerepet a nitrogénkötésben (11. táblázat). 1980-ban az 50 cm-es vízrétegben csupán egy alkalommal találtunk Azotobactert. Mivel az előzetes mérések szerint mennyiségük az üledékben sem jelentős, a részletes rétegvizsgálatot nem is végeztük el, csupán az üledékfelszín és az 5—8 cm-es üledékréteg Azotobacter populáció nagyságát mértük. Az évszakos vizsgálati eredmények szerint a hideg vízű évszakokban az üledékfelszín és a mélyebb üledékréteg között nem találtunk különbséget. Mindkét üledékrétegben 100 körül volt az Azotobacter sejtek száma. Júliusban az üledékfelszínen megnőtt a populáció, elérte az 1000 sejtet egy g üledékben. Ugyanekkor a mélyebb, 5—8 cm-es üledékrétegben csak 10 sejtet találtunk. Az üledékfelszín és a mélyebb üledékréteg közötti különbség még júliusban is megmaradt. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy az üledékben folyó nitrogénkötésért nem az Azotobacter populációk a felelősek, még az oxidált üledékfelszínen is csak kis mértékben járulnak hozzá a teljes nitrogénkötéshez.

A Clostridium típusú anaerób nitrogénkötő baktériumok évszakos vertikális eloszlásvizsgálata azt mutatja, hogy az üledék nitrogénkötését döntően ezek a baktérium populációk végzik. Látni fogjuk azonban, hogy teljes mértékben még a Clostridium fajokkal sem magyarázható a nitrogénkötés mért vertikális eloszlása. Kora tavasszal az üledékfelszínen és a mélyebb, 5—8 cm-es üledékrétegben is 10^4 sejtet találtunk egy üledékben. Ugyanekkor közvetlenül az üledékréteg feletti vízrétegben is magas volt a Clostridiumok száma. Májusban nem változott jelentős mértékben a helyzet, csupán az üledék feletti vízrétegben és a mélyebb üledékrétegben csökkentek egy nagyságrenddel az értékek. Júniusra az üledék feletti vízrétegben tovább csökkent a Clostridium szám, az üledékfelszínen viszont 10^5-re emelkedett és a mélyebb

11. táblázat

Azobacter típusú aerob N-kötő baktériumok évszakos eloszlása az üledékfelszínen és az 5—8 cm-es üledékmélységben. MPN sejt cm^{-3} víz, sejt g^{-1} üledék

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05. 14.	06. 10.	07. 08.	08. 12.	10. 10.
Víz 50 cm	0	0	0	0	0	1
Iszapfelszín	100	100	1000	100	100	100
Iszap 5—8 cm	100	100	10	10	100	100

12. táblázat

Clostridium típusú anaerob N-kötő baktériumok évszakos vertikális eloszlása a Keszthelyi-öböl intersticiális vizében, MPN sejt cm^{-3} víz, g^{-1} üledék

Üledékmélység, cm	1980. 03. 26.	05. 14.	06. 10.	07. 08.	08.12.	10. 10.
Víz 50 cm	10^3	10^2	10^1	10^0	10^2	10^2
Iszap 0—1	10^4	10^4	10^5	10^6	10^5	10^4
1—2	—	—	10^3	—	10^5	—
2—3	—	—	10^3	—	10^4	—
3—4	—	—	10^4	—	10^4	—
4—5	—	—	10^5	—	10^4	—
5—8	10^4	10^3	10^4	10^4	10^4	10^4
8—11	—	—	10^2	—	10^4	—
11—14	—	—	10^3	—	10^3	—
14—17	—	—	10^3	—	10^4	—
17—20	—	—	10^3	—	10^3	—

rétegekben csökkent, majd a 4—5 cm-es üledékrétegben újra emelkedett 10^5-ig. Júliusban az üledék feletti vízrétegben nem volt kimutatható Clostridium, ugyanakkor a felszíni üledékben ekkor mértük a legmagasabb értéket, 10^6 egy g üledékben. A nitrogénkötés évszakos vizsgálata során is ekkor mértük a legnagyobb értéket, ugyanebben az üledékrétegben (4. táblázat). Augusztusban az üledék feletti vízrétegben újra megjelennek a Clostridium sejtek és a felső üledékrétegekben továbbra is magasak az értékek és a mélyebb rétegek felé haladva csökkennek. Októberben a kora tavaszi eloszlást találtuk. Az üledékfelszínen és a mélyebb üledékrétegekben is 10^4 populációs nagyságot mértünk. Ha részletesen összevetjük a nitrogénkötés és a Clostridium típusú baktériumok vertikális elterjedését (4. és 12. táblázatok) a nitrogénkötést csupán a Clostridiumok vertikális elterjedésével nem tudjuk minden esetben megmagyarázni. A mélyebb rétegekben mért nitrogénkötési maximumokért esetenként feltehetően a szulfátredukáló baktériumok a felelősek. Az üledékfelszínen májusban, viszonylag kis Clostridium populációk mellett mért igen nagy nitrogénkötésben valószínűleg a hidrogén és a metánoxidáló baktériumok is részt vettek.

Nitrogénkötést befolyásoló tényezők

Szervesanyag

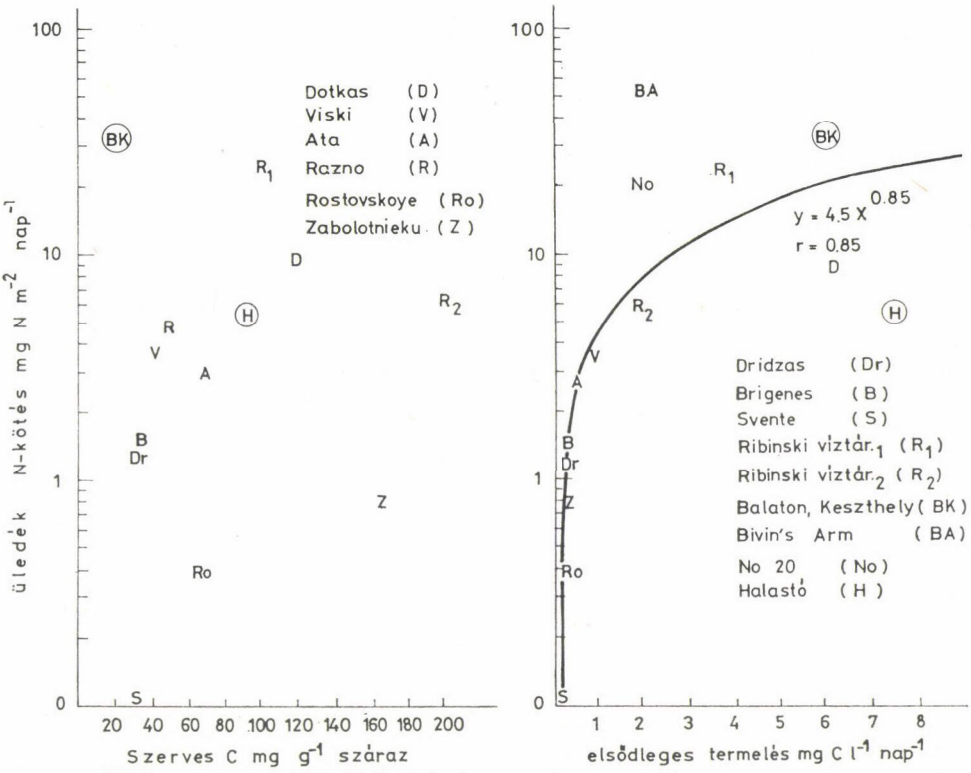
A nagy nitrogénkötéssel jellemezhető rögzült társulások a vizek fényzónáiban élnek, ahol a nitrogénkötéshez az energiát és redukált anyagot közvetlenül a fotoszintézis primér folyamatai szolgáltatják. A sötét, fény nélküli zónában található tavi üledékekben a nitrogénkötést elsősorban kemoorganotróf és kisebb mértékben kemolitotróf baktériumok végzik igen kis hatékonysággal. Mulder és Brotonegoro (1974) szerint a *Clostridium pasterianum* obligát

anaerób szervezet 1 g cukor felhasználásával 10 mg nitrogént képes megkötni. Ugyanez a szám a *Klebsiella pneumoniae* fakultatív anaerób szervezetnél 5, az Azotobacter obligát aerób baktériumcsoportnál alacsony oxigéntartalom mellett 46, magas oxigéntartalom mellett 10—20, a *Mycobacterium flavum*nál pedig csak 3—6. A *Rhodospirillum rubrum* bíbor színű fotoorganotróf baktérium szervesanyag hasznosítása sem sokkal jobb. 1 g piruvát felhasználásával 32 mg nitrogént képes megkötni (SCHICK 1971). A rendkívül energiaigényes nitrogénkötési folyamat nagyságrendjét tehát a sekély tavak üledékében és általában a vizek sötét, fény nélküli régióiban elsősorban a rendelkezésre álló szervesanyag mennyisége határozza meg. A tavi üledékek szervesanyag-tartalma és nitrogénkötése közötti összefüggés leírása céljából összegyűjtöttük az eddig közölt adatokat és saját vizsgálataink eredményeit (13. táblázat). Változatos tavakat képviselő 15 tó üledékének szervesanyag-tartalma és nitrogénkötése között kilenc gyakori összefüggés típus számítógépes próbája semmiféle szignifikáns összefüggést nem mutatott (4. ábra). A várt összefüggés hiányát az üledékek szervesanyag-tartalma közötti minőségi különbségekben kell keresnünk. A használt módszerekkel mért szervesanyag-tartalomból ugyanis nem következtethetünk azok minőségére, holott a nitrogénkötés nagyságát nyilvánvalóan csak a ténylegesen hasznosítható, felvehető szervesanyag mennyisége határozza meg. A Zabolotnieku-tó nagy szervesanyag-tartalmú üledékében a humifikálódott, tovább már lassan bomló, fosszilizálódott szervesanyag dominál, érthetően alacsony nitrogénkötéssel. A Ribinszki-víztároló magas szervesanyag-tartalmú tőzeges üledékében is kisebb a nitrogénkötés, mint a

13. táblázat

Üledék nitrogénkötés (felső 20 cm), üledék szerves-C és plankton elsődleges termelés sekély és rétegzett tavakban

Tó	Mélység m	Üledék N-kötés mg N m^{-2}nap^{-1}	Üledék szerves-C mg g^{-1} száraz	Elsődleges termelés mg C l^{-1} nap^{-1} felszín	Szerző
Dotkas, Litvánia	3	9,6	120	6,1	SARALOV és DAUKSTA 1978
Viski, Litvánia	8	3,9	43	1,0	SARALOV és DAUKSTA 1978
Ata, Litvánia	4	3,0	70	0,6	SARALOV és DAUKSTA 1978
Razmo, Litvánia	10	4,8	50	—	SARALOV és DAUKSTA 1978
Rostovskoye, Litvánia	7	0,4	66	0,3	SARALOV és DAUKSTA 1978
Zabolotnieku, Litvánia	16	0,8	166	0,3	SARALOV és DAUKSTA 1978
Dridzas, Litvánia	20	1,3	33	0,2	SARALOV és DAUKSTA 1978
Brigenes, Litvánia	16	1,5	36	0,2	SARALOV és DAUKSTA 1978
Svente, Litvánia	20	0,1	36	0,01	SARALOV és DAUKSTA 1978
Ribinski-víztároló$_1$	8	25,3	100	3,5	SARALOV 1978
Ribinszki-víztároló$_2$	3	6,3	200	2,0	SARALOV 1978
Bivin's Arm, Florida	1,5	56,1	—	1,8	KEIRN és BREZONIK 1971
No 20, Florida	3,4	21,1	—	1,8	KEIRN és BREZONIK 1971
Balaton, Keszthely	2,5	321,	20	6,0	jelen vizsgálat
Halastó, Szarvas	1	5,8	90	8,0	jelen vizsgálat

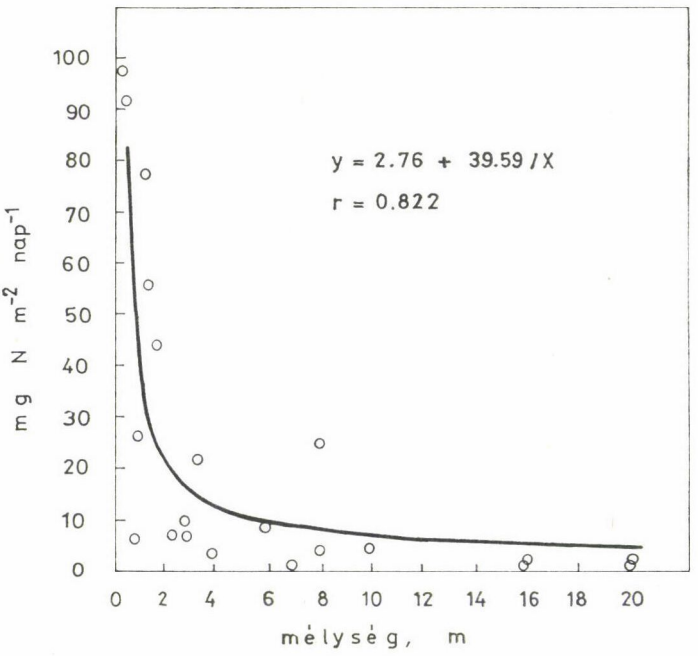


4. ábra. Összefüggés üledék nitrogénkötés és üledék szerves-C, valamint üledék nitrogénkötés és planktonikus elsődleges termelés között

planktonikus eredetű kevesebb szervesanyagot tartalmazókban. Meglepően szoros összefüggést találtunk ugyanezen tavak elsődleges termelése és üledékének nitrogénkötése között ($r = 0{,}85$). A hatvány típusú összefüggés szerint ($y = 4{,}5\ x^{0{,}85}$) az üledék feletti vízoszlopban naponta megtermelt szervesanyag növekedésével ugrásszerűen nő az üledék nitrogénkötése. A növekedési ütem csak egészen magas elsődleges termelés mellett kezd csökkenni. A sekély, nagy kiterjedésű, vízmozgással gyakran felkavart Keszthelyi-medence üledéke jellemezhető az eddig vizsgált tavak között a leghatékonyabb nitrogénkötéssel, más szóval az adott szervesanyag-tartalom mellett a legnagyobb nitrogénkötéssel. A magas napi szervesanyag-termeléshez viszonyítva már kisebb a hatékonyság. Mindez azt bizonyítja, hogy a vízüledékhatáron az állandó oxigén utánpótlás következtében, a különböző baktérium populációk között rendkívül éles versengés folyik, a vízoszlopban naponta termelődő és üledékre jutó szervesanyagért. Hasonló következtetésre jutottunk a Balaton vízüledékhatárát jellemző magas hőmérséklet, nagy $CaCO_3$ tartalom és állandó oxigén telítettség hatásának kísérletes vizsgálatával (Oláh 1971). Az üledékben rendelkezésre álló szervesanyag mennyiségét és minőségét tükrözi az üledék nitro-

génkötése és az üledék fölötti vízoszlop kiterjedése, azaz a vízmélység között talált elég szoros összefüggés (5. ábra). Az irodalomból összegyűjtött és az általunk vizsgált 21 tó adatai azt sugallják, hogy a tómélység növekedésével csökken az üledék nitrogénkötése. A sekély tavak üledékében tehát általában nagyobb nitrogénkötés várható. A tómélységgel való összefüggést azonban közvetettnek kell tekintenünk. A közvetlenül ható tényező ebben az esetben is az üledékre naponta lehulló szervesanyag mennyisége. A sekély tavak szervesanyag-termelése ugyanis általában nagyobb a mély tavakénál és a vízoszlopból az üledékre ülepedő szervesanyag aránya, a planktoneső is csökken a mélységgel a Hargrave-féle összefüggés szerint (HARGRAVE 1973, 1974). Ezek az összefüggések még akkor is meghatározók az üledék szervesanyag ellátásában, ha tudjuk, hogy a sekély és gyakran felkavarodó tavakra csak módosítással érvényesek (OLÁH 1978).

A módszer fejlesztése során a Keszthelyi-medencében elvégzett cukorhozzáadási kísérletek szerint, különböző cukrok eltérő módon befolyásolták a nitrogénkötést. A glükóz és acetát önálló és ammónia hozzáadásával kombinált hatását 1980. május 6-án vizsgáltuk a Körös-holtág víztározó üledékével. A hozzáadás azonnali hatását vizsgáltuk, 4 órás inkubálás során. Az üledékfelszínről származó mintát a hozzáadás után 0,65 He, 0,20 O_2 és 0,15 C_2H_2 atmoszféra gázkeverékben, az 5—7 cm üledékmélységből származó mintát pedig hozzáadás után 0,85 He és 0,15 C_2H_2 atmoszféra gázkeverékben inkubáltuk.



5. ábra. Összefüggés az üledék nitrogénkötés és a tómélység között

14. táblázat

Ammónia, glükóz és acetát hatása az üledék nitrogénkötésre a Körös-holtág víztározóban, ng N $g^{-1}h^{-1}$

	Üledékfelszín (felső 1 cm)	Felszín alatti üledék (5—7 cm)
Kontroll	0,40	0,87
3 mg l^{-1} NH_4Cl—N	0,74	1,85
30 mg l^{-1} NH_4Cl—N	0,51	0,91
6 mM glükóz	0,95	0,76
6 mM acetát	0,33	0,95
3 mg l^{-1} NH_4Cl—N + 6 mM glükóz	1,55	3,05
30 mg l^{-1} NH_4Cl—N + 6 mM glükóz	0,65	2,60

A mintát inkubálás előtt és után is ráztuk. Az üledékfelszínről származó mintában a glukóz-hozzáadás hatására a kontrollhoz képest közel 150 százalékkal nőtt a nitrogénkötés (14. táblázat). Acetát-hozzáadás valamelyest csökkentette a nitrogénkötést. Az 5—7 cm mélységből származó mintában a nitrogénkötés a glükóz és acetát-hozzáadásra fordított választ adott, bár a gátló és serkentő hatás is kicsi volt. Ha a glükóz mellett az üledéket ammóniummal is gazdagítottuk a nitrogénkötés az üledékfelszíni és az 5—7 cm mélységből származó mintában is több mint háromszorosára növekedett a rövid négy órás inkubálás során. A glükóz és az ammónium erőteljes, együttes serkentő hatását nem ismerjük.

Ammónia

Ammónium-hozzáadás hatására a nitrogénkötés közel duplázódott mind a felszínről, mind pedig az 5—7 cm mélységből gyűjtött üledékmintákban (14. táblázat). Nagy végkoncentrációjú ammónium, 30 mg l^{-1} hozzáadásra ugyanakkor a nitrogénkötés a kontrollhoz képest alig változott. 1979. július 25-én és 1980. június 10-én a Keszthelyi-medencében vizsgáltuk az üledékhez adott ammónium rövid idejű hatását a nitrogénkötésre. A 4 órás inkubálás alatt 30 mg NH_4Cl végkoncentráció mellett szignifikáns gátló hatást nem mértünk. Üledékekben az ammónium és nitrát ionok nitrogénkötésre kifejtett hatását kísérletesen nem vizsgálták. PATRIGUIN és KEDDY (1978) 33 mocsári növény gyökérzónájában mérte a nitrogénkötést és ezzel párhuzamosan hasonló üledékmélységből vákumcsöves eljárással vett pórusvízben az ammónium ion koncentrációt. Azokban az üledékekben, ahol az ammónium koncentráció a 42 μg l^{-1}-t nem haladta meg, a nitrogénkötés többszöröse volt a 462 μg-ot vagy ennél többet tartalmazókénak. Sajnos a vizsgált Nova Scotia tengerparti mocsári üledékeknél a két érték között nem volt adat, így a jelentős gátló hatást okozó ammónia koncentrációt csak az irodalmi adatokkal összevetve

becsülhették a mért két érték közötti 140 és 350 μg-os tartományban. WATANABE és CABRERA (1979) kísérletesen vizsgálták több mM-os ammóniumklorid oldatok hatását a rizs gyökérzónájának nitrogénkötésére. A használt legkisebb, 4,6 mg l^{-1}-es koncentráció már gátló hatású volt, ugyanakkor figyelemre méltó, hogy a nitrogénkötés még 10—50 mM-os ammóniumklorid több napos hatása után is jelentős mértékű volt. Rizsföldek vizében élő Azolla-Anabaena társulás nitrogénkötését hat napos előinkubálás után, az alkalmazott 10 mM ammónium 30%-kal, a 10 mM nitrát pedig 68%-kal csökkentette (HOLST és YOPP 1979). DICKER és SMITH (1980) sós mocsári Spartina üledék nitrogénkötésénél az ammónium hatásban évszakos változást találtak. Kora nyáron az ammónia-hozzáadás nem eredményezett csökkenést a nitrogénkötésben, ugyanakkor késő nyáron és kora ősszel 2×10^{-2} M ammóniumklorid 5 napos hatására 85—95%-kal csökkent a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva a nitrogénkötés. 2×10^{-2} M káliumnitrát minden vizsgált évszakban majdnem teljes gátlást eredményezett. A nitrát gátlás annak a kompetíciónak az eredményeként jön létre, amely a nitrát redukció és nitrogénkötés között folyik a rendelkezésre álló redukáló szubsztrátért (elektronok) és energiáért (ATP). A Körös-holtág víztározó és Keszthelyi-medence üledékének nitrogénkötését tehát rövid ideig tartó ammónia hatás nem gátolta, sőt esetenként serkentette. Az előbbi jó összhangban van azzal az általános, sokoldalúan bizonyított megállapítással, hogy az ammónia a nitrogenáz enzim működését nem befolyásolja, hosszan tartó hatásra viszont gátolja a nitrogenáz enzim szintézist. BROOKS és mtsai. (1971), valamint KEIRN és BREZONIK (1971) a tápanyagokban rendszerint gazdag tavi üledékekben mért magas ammóniatartalom és nitrogénkötés együttes előfordulását azzal magyarázták, hogy az üledékekben mért ammónia nagyobb hányada a formált frakcióban, adszorbeált formában van jelen és így a baktériumok számára nehezen hasznosítható. Vizsgálataik óta végbement módszertani fejlődés, az intersticiális víz kinyerésére alkalmas üledékprés eljárás lehetővé tette az üledékben valóban oldott formában jelenlévő ammónium pontos meghatározását. Láttuk, hogy a Keszthelyi-medence, a Siófoki-medence, a Körös-holtág víztároló és a polikultúrás halastó üledékében is bőséges oldott ammónium ion található. Legkevesebb ammóniumot az egy méter vízmélységű, halak által felkavart polikultúrás halastó üledékében, legtöbbet pedig a Keszthelyi-medence üledékében mértünk. A halastó intersticiális vizében oldott, közel 1 mg l^{-1}-es koncentrációjú ammónium is bőséges szervetlen nitrogénforrást jelent a baktériumok számára, nem beszélve a Keszthelyi-öbölben mért több mg l^{-1}-es értékekről. A sok ammóniumot tartalmazó üledékek nagy nitrogénkötését tehát nem magyarázhatjuk a szervetlen nitrogén hozzáférhetetlenségével. Számunkra továbbra is kérdéses, miért van gyakran igen jelentős nitrogénkötés állandóan nagy mennyiségű és könnyen felvehető formában jelenlevő ammóniát tartalmazó üledékekben. Mi az ökológiai jelentősége, magyarázata ennek az energiapazarló és mennyiségileg figyelemre méltó

folyamatnak? Feltételezzük, hogy az oxigénben mindig szűkös és „elektronban" mindig gazdag üledékekben élő Clostridium, Desulfovibrio vagy más típusú obligát anaerób nitrogénkötő baktériumok számára a nitrogéngáz nemcsak tápanyagként, hanem elektron akceptorként is szolgál?

Hőmérséklet

A könnyen hasznosítható szervesanyag mennyisége mellett az üledékek nitrogénkötésének évszakos alakulását alapvetően a hőmérséklet határozza meg. Télen a Ribinszki-víztároló üledékének nitrogénkötése laboratóriumi, 25 °C-os inkubálásnál hat-hétszer nagyobb volt, mint a párhuzamos in situ 2 °C-nál, elérve a tavaszi periódus maximumát (SARALOV 1978). Szennyezett csatorna üledékében a glükóz nitrogénkötést stimuláló hatása in situ 5 °C mellett nem jelentkezett. A párhuzamos laboratóriumi inkubálás 25 °C-on, a kontrollhoz képest több nagyságrenddel növelte a nitrogénkötést glükóz hozzáadásra (PEARSON és TAYLOR 1978). A Körös-holtág víztározó üledékének jég alatti, in situ hőmérséklet mellett mért nitrogénkötése 1,8 mg m^{-2} nap^{-1} volt, ugyanakkor laboratóriumi, 25 °C-os inkubálásnál 7,2 mg m^{-2} nap^{-1}.

Többváltozós regresszió-elemzés

A Keszthelyi-medence üledékrétegeiben 1980. május 14. és november 10. között végzett mérések eredményeit felhasználva többváltozós regresszió-elemzést végeztünk a nitrogénkötés mint függőváltozó és az üledékmélység, pH,

15. táblázat

Többváltozós regresszió-elemzés a nitrogénkötés mint függőváltozó és az üledékmélység, pH, E_h, oldott szerves-N, NH_4—N és NO_3—N között. A Keszthelyi-medence üledékrétegeiben, 1980. május 14. és november 10 között végzett mérések. Többváltozós korrelációs koefficiens, 0,6647

Tényező	Varianciaelemzés			
	SQ	FG	MQ	F
Összes	2326,3	30		
Regresszió	1027,7	6	171,2	3,17
Hiba	1298,6	24	54,1	

Változók	Regressziós változók		
	Koefficiens	Szórás	*t*
Konstans x	28,675		
Üledékmélység	—0,818	0,419	1,95
NH_4—H	—1,209	1,061	1,14
Redox	0,025	0,024	1,04
Oldott szerves N	0,402	0,921	0,44
NO_3—N	4,482	10,786	0,42
pH	—1,019	7,920	0,13

E_h, oldott szerves-N, NH_4—N és NO_3—N mint független változók között (15. táblázat). A vizsgált változók közül a nitrogénkötéssel legszorosabb kapcsolatot az üledékmélység, az ammónium ion koncentráció és a redox potenciál mutatott. A vizsgált periódusban, üledékrétegekben és értéktartományokban az oldott szerves-N, NO_3—N és pH gyakorlatilag alig befolyásolta a nitrogénkötést. A hat változós regresszió-elemzés korrelációs koefficense (0,6647) jelzi, hogy a regressziós elemzésből fontos paraméterek kimaradtak. Ha a nitrogénkötésért felelős mikroorganizmusok mennyiségét is az elemzéshez csatoljuk, feltehetően tovább javult volna a korrelációs koefficiens. Részletes Clostridium rétegvizsgálatot azonban csak két alkalommal végeztünk (12. táblázat) és azt is láttuk, hogy a Clostridium és Azotobacter típusú baktériumok számlálásával egyedül nem magyarázható minden esetben a nitrogénkötés vertikális elterjedése. A különböző üledékrétegek nitrogénkötéséért felelős mikroorganizmusok in situ mennyiségi viszonyait még kevéssé ismerjük.

Üledék nitrogénkötés jelentősége a nitrogén-háztartásban

Évszakos eloszlás

A mérsékelt égöv vizeiben a nitrogénkötés szabályos, évszakos eloszlással jellemezhető ritmusban folyik. A sokféle rögzült társulás nitrogénkötésének évszakos eloszlása, az élőhely fiziko-kémiai tulajdonságaitól, a szervesanyag ellátás típusától és a nitrogénkötő társulás összetételétől függően változatos. HORNE és CARMIGGELT (1975) egy kaliforniai sziklás patak Nostoc állományában a vizsgált patakszakasztól függően áprilisban és májusban mért jelentős nitrogénkötést. A Nostoc kolóniák júniusban eltűntek a patakból, valószínűleg tápanyaghiány következtében. Egy angliai szennyezett csatorna betonfalán a levegő víz határon kialakult Rivulária fonalszőnyeg nitrogénkötése júniusban és júliusban volt a legnagyobb, egybeesve a legalacsonyabb nitráttartalommal (PEARSON és TAYLOR 1978). New York államban, egy sekély édes vízi tó *Myriophyllum spicatum* epifita társulásában a Gloeotrichia kolóniák és feltehetően Rhodopseudomonas fotoszintetizáló baktériumok hínár szárazanyaghoz viszonyított nitrogénkötése a hőmérséklet emelkedésével ugrásszerűen növekedett május elején, majd mintegy a felére csökkent a nyári hónapokban. Ősszel fokozatosan tovább csökkent, és télen jég alatt nem volt mérhető nitrogenáz aktivitás. A hatékony elsődleges szervesanyag termelő C_4-es *Spartina alterniflora* sósmocsári növény szárához rögzült epifita társulás nitrogénkötése a fentiekhez hasonlóan egész nyáron állandó volt (GREEN és EDMISTEN 1974). A *Spartina alterniflora* gyökérzónájának nitrogénkötése is közel egyenletes volt egész nyáron (PATRIQUIN és MCCLUNG 1978). Feltehetően a szár- és a gyökérzónához kötődő nitrogénkötés összefügg a hatékony fotoszintetizáló növény szervesanyag-ürítésével. Tavi üledékekben a nitrogénkötés évszakos eloszlását csak a Ribinszki-víztárolóban vizsgálták részletesen (SARALOV 1978). A két-

16. táblázat

A nitrogénkötés évszakos eloszlása a négy vizsgált sekélytavi ekoszisztéma típus üledékében, mg $m^{-2}nap^{-1}$

	Március	Április	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember	Október	November
1.	5,42		11,2	22,9	40,9	32,2	18,6	4,2	3,8
2.	7,6	46 83	15,1	17,3	25,8	49,1	10,2		2,1
3.			1,2		3,4		5,8		
4.	2,8		3,1 2,2	0,7 0,7	1,0	1,9	3,8	4,1	

hetenkénti mérések egy tavaszi és egy őszi maximumot mutattak, mind a tőzeges, mind pedig az iszapos üledékű vízterületen. A szerző szerint az őszi maximumot a plankton tömeges pusztulása és leülepedése idézi elő. Szeptemberben a vízhőmérséklet gyors csökkenésével párhuzamosan csökkent az üledék nitrogénkötése, majd a tavaszi felmelegedés előidézte a második maximumot.

Az általunk vizsgált négy sekélytavi ekoszisztéma típusban a nitrogénkötés évszakos eloszlását egy négyzetméteres üledékfelületre számítva hasonlítjuk össze (16. táblázat). A Keszthelyi-medencében az üledék nitrogénkötése márciustól kezdve fokozatosan növekedett júliusig, majd ismét fokozatosan csökkent novemberig. A hidegvízi periódusra tehát jelentősen lecsökkent a nitrogénkötés. A Körös-holtág víztározóban a hidegvízi periódusban hasonlóan kicsi a nitrogénkötés, de a Keszthelyi-medencétől eltérően a legnagyobb aktivitást, 83 mg N m^{-2} nap^{-1}, áprilisban mértük. Ezt követően csökkent a nitrogénkötés, majd augusztusban újra megnőtt és a vízhőmérséklet csökkenésével, ősszel csökkenni kezdett. Polikultúrás halastóban kevés időpontban mértük az üledék nitrogénkötését, a három mérési pont a tenyésztési évszakban növekvő nitrogénkötést mutat, bár még a szeptemberben mért maximum is lényegesen kisebb, mint az előbbi két sekélyvízi ekoszisztémában. A hígtrágyás halastóban a tavaszi maximum után csökkent a nitrogénkötés és nyári hónapokban végig alacsony maradt, majd októberre kialakult a második évi maximum.

Tavi üledékek nitrogénkötésének nagyságrendje

Mivel tavi üledékekben a nitrogénkötés évszakos alakulását még kevesen mérték, adataink összehasonlítása érdekében, a nagyságrend érzékeltetésére a különböző tavakban mért maximális értékeket napi nitrogénkötésre számítottuk át egy négyzetméteres és 20 cm vastag üledékfelületre vonatkoztatva (17. táblázat). Feltüntettük a méréseknél használt gázösszetételt, mivel az jelentős mértékben befolyásolhatja az eredményeket. A tavi üledékekben mért legnagyobb nitrogénkötés megközelíti a 100 mg N m^{-2}-es naponkénti értéket. Fel-

17. táblázat

Nitrogénkötés sekély és rétegezett tavak üledékében (felső 20 cm)

Tó	Mélység m Z	N-kötés mg N $m^{-2}nap^{-1}$	Módszer (gázfázis, %)	Szerző
Kis sekély tó, Japán	0,5	90,7	Ar 70, 02 20, C2H2 10	SUGAHARA et al. 1971
Moss Lee, Florida	6,0	8,4	He 85, C2H2 15, vagy Ar 64,9 02 20, C2H2 15, CO2 0,04	KEIRN és BREZONIK 1971
Orange, Florida	1,8	44,6	He 85, C2H2 15, vagy Ar 64,9 02 20, C2H2 15, CO2 0,04	KEIRN és BREZONIK 1971
Bivin's Arm, Florida	1,5	56,1	He 85, C2H2 15, vagy Ar 64,9 02 20, C2H2 15, CO2 0,04	KEIRN és BREZONIK 1971
Kanapaha, Florida	—	98,4	He 85, C2H2 15, vagy Ar 64,9 02 20, C2H2 15, CO2 0,04	9EIRN és BREZONIK 1971
Apopka, Florida	—	79,9	He 85, C2H2 15, vagy Ar 64,9 02 20, C2H2 15, CO2 0,04	KEIRN és BREZONIK 1971
Alice, Florida	0,9	5,6	He 85, C2H2 15, vagy Ar 64,9 02 20, C2H2 15, CO2 0,04	KEIRN és BREZONIK 1971
NO 20, Florida	3,4	21,1	He 85, C2H2 15, vagy Ar 64,9 02 20, C2H2 15, CO2 0,04	KEIRN és BREZONIK 1971
Ribinszki víztároló$_1$	8	25,3	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	SARALOV 1978
Ribinszki-víztároló$_2$	3	6,3	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2 C2H2 10	SARALOV 1978
Dotkas, Litvánia	3	9,6	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	SARALOV és DAUKSTA 1978
Viski, Litvánia	8	3,9	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	SARALOV és DAUKSTA 1978
Ata, Litvánia	4	3,0	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	SARALOV és DAUKSTA 1978
Razmo, Litvánia	10	4,8	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	SARALOV és DAUKSTA 1978
Rostovskoje, Litvánia	7	0,4	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	SARALOV 1978

Zabolotnieku, Litvánia	16	0,8	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	Saralov és Dauksta 1978
Dridzas, Litvánia	20	1,3	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	Saralov és Dauksta 1978
Brigenes, Litvánia	16	1,5	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	Saralov és Dauksta 1978
Svente, Litvánia	20	0,5	Ar 90, C2H2 10, vagy Ar 70 02 20, C2H2 10	Saralov és Dauksta 1978
Balaton, Keszthely	2,5	6,8	levegő 85, C2H2 15	Oláh és mtsai 1979
Halastó, Szarvas	1	26,2	levegő 85, C2H2 15	el Samra és Oláh 1979
Balaton, Keszthely	2,5	40,2	in situ	jelen vizsgálat
Körös-holtág víztározó	3	83	in situ	jelen vizsgálat
Polikultúrás halastó	1	5,8	in situ	jelen vizsgálat
Hígtrágyás halastó	1	4,1	in situ	jelen vizsgálat

tűnő, hogy a floridai tavakban lényegesen nagyobb acetilénredukciót mértek, mint a litván tavakban. A litván tavakban mért legalacsonyabb értékek 1 mg N m^{-2} nap^{-1} alatt vannak. Ezek a tavak azonban lápos területen fekszenek és az üledékben igen magas a nehezen hasznosítható, humifikált szervesanyag aránya. A floridai tavak üledékében mért nagy nitrogénkötés a használt in vitro módszer miatt valószínűleg túlbecsült, még akkor is, ha számításainkat a mért maximális értékekre alapoztuk. A rendkívül energiaigényes nitrogénkötéshez ugyanis csak korlátozott ideig áll rendelkezésre a négyzetméterként naponta 100 mg nitrogén megkötéséhez szükséges szervesanyag. Ha a tóban naponta megtermelt szervesanyag teljes egészében az üledék nitrogénkötésére fordítódna, a különböző nitrogénkötő baktériumok szervesanyag-hasznosítási együtthatóiból kiindulva, a 100 mg-os nitrogénkötést is csak az elsődleges termelés elméleti felső határa körüli fotoszintézis volna képes folyamatosan ellátni energiával. Jelen vizsgálatainkban, a perforált műanyaghengeres, in situ módszerrel kapott eredmények ugyanakkor azt mutatják, hogy a természetes mikrobiális közösségben a nitrogénkötő baktériumok közvetlenül vagy közvetve más baktérium populációkra épülve a kísérletesen kapott eredményeknél sokkal takarékosabban hasznosítják a rendelkezésre álló energiakészletet. Ezt figyelembe véve is a legmagasabb nitrogénkötési érték, amit a Körös-holtág víztározóban kora tavasszal mértünk, csak a kacsás-halas hasznosítású belvíztározó igen jelentős allochton szervesanyag-ellátásával magyarázható (1. táblázat).

Éves nitrogénkötés tavi üledékekben és más rögzült társulásokban

A nitrogénkötés évszakos eloszlása ismeretében becsülhető az egész évben megkötött nitrogén mennyisége (18. táblázat). 1980-ban a Keszthelyi-medence üledékében megkötött nitrogén mennyisége, 4,7 g m^{-2}, megközelíti a fölötte

18. táblázat

Havonként és egy év alatt megkötött nitrogén mennyisége a négy vizsgált sekély vízi ekoszisztéma típus üledékében, mg m^{-2}

Periódus	1	2	3	4
Január	118	236	—	—
Február	106	212	—	—
Március	168	236	—	86
Április	162	2018	36	84
Május	347	468	37	96
Június	687	519	36	21
Július	1246	799	105	31
Augusztus	998	1522	105	58
Szeptember	558	306	174	114
Október	130	65	—	127
November	114	63	—	—
December	118	65	—	—
Január—december	4752	6509	493	617

19. táblázat

Szilárd aljzaton élő vízitársulások nitrogénkötése

Ekoszisztéma	N-kötés g N $m^{-2}év^{-1}$	Domináló szervezet
Árapályos sziklás tengerpart, Nagy-Britannia (STEWART 1970)	2,5	Calothrix scopulorum
Sekély tengeri üledék, California (BROOKS et al. 1971)	0,4	Clostridium
Epifita társulás pelágikus Sargassumon (CARPENTER 1972)	0.004	Dichothrix fucicola
Epifita társulás sekély tengeriparti makrofitákon, trópus (GOERING és PARKER 1971)	109,5	Calothrix
Tengeri angiospermák rhizoszférája (PATRIQUIN és KNOWLES 1972)	10—40	baktériumok
Thalassia gyökér, üledékkel (MCROY et al. 1973)	0,001	baktériumok
Epifita társulás tengerparti Codiumon (HEAD és CARPENTER 1975)	0,9	Azotobacter
Árapályos tengerparti üledék, Skócia (HERBERT 1975)	35	?
Hideg hegyi patak, Florida (HORNE és CARMIGGELT 1975)	0,04—0,36	Nostoc
Korallzátony (MAGUE és HOLM-HANSEN 1975)	40	?
Árapályos korallzátony, trópus (WIEBE et al. 1975)	65,7	Calothrix crustacea
Szennyezett korallzátony, Hawaii (HANSON és GUNDERSEN 1976)	0,6	heterotróf baktériumok
Fjord anaerób üledék, Skócia (HARTAIG és STANLEY 1978)	8,1	baktériumok
Spartina alterniflora állomány (PATRIQUIN és MCCLUNG 1978)	11,5	baktériumok
Szennyezett csatorna üledék, Nagy-Britannia (PEARSON és TAYLOR 1978)	0,4	baktériumok
Ribinszki-víztározó üledék (SARALOV 1978)	0,4	baktériumok
Keszthelyi-öböl (Balaton) (jelen vizsgálat)	4,7	baktériumok
Körös-holtág víztároló (jelen vizsgálat)	6,5	Clostridium
Polikultúrás halastó (jelen vizsgálat)	0,4	baktériumok
Hígtrágyás halastó (jelen vizsgálat)	0,6	baktériumok

levő vízoszlopban megkötött nitrogén mennyiségét (7,1 g m^{-2}, OLÁH és mtsai. 1980). Végeredményben a Keszthelyi-medence eredményei megegyeznek az egyetlen eddig vizsgált rendszer, a Ribinszki-víztároló adataival, ahol az üledékben megkötött nitrogén közel azonos volt a vízoszlopban megkötött nitrogénnel (SARALOV 1978). A Körös-holtág víztárolóban az üledék 6,5 g m^{-2}-es évi nitrogénkötése lényegesen meghaladja a vízoszlop nitrogénkötését is (OLÁH és mtsai. 1980). A polikultúrás és a hígtrágyás halastóban az üledék nitrogénkötése a tenyésztési évszakban fél gramm körüli egy négyzetméteren. A két halastó típus üledékében megkötött nitrogén mennyisége azonos a Ribinszki-víztároló üledékében megkötött mennyiséggel (18. táblázat). Sajnos az álta-

lunk vizsgált négy sekély tavi típus mellett csupán a Ribinszki-víztároló üledékének éves nitrogénkötését ismerjük. Ha a tavi üledékek nitrogénkötését más szilárd aljzaton élő vízitársulásokéval hasonlítjuk össze a tavi üledékekre eddig mért legnagyobb értéket, a Körös-holtág víztároló 6,5 g m^{-2} $év^{-1}$ értékét jóval meghaladó nitrogénkötés több rögzült társulás típusnál is előfordul (19. táblázat). Ezek a társulások azonban napfény által megvilágított zónákban alakulnak ki és a nitrogénkötést fotoszintetizáló kékalgák végzik a fotoszintézis primér folyamataiban termelődő redukáló szubsztrát és energia rovására. Több szerző is igen magas értéket mért jól átvilágított korallzátonyokon, ahol a nitrogénkötést a Calothrix genuszhoz tartozó kékalgák végzik. Vízi ekoszisztémákban az eddig legnagyobb nitrogénkötési értéket, 109,5 g N m^{-2} $év^{-1}$ GOERING és PARKER (1972) mérték trópuson, sekély tengerparti, gyökerező makrofita állomány epifita társulásában. A domináló nitrogénkötő szervezet itt is egy Calothrix faj volt. Tengerparti angiospermák rhizoszférájában PATRIQUIN és KNOWLES (1972) feltűnően nagy bakteriális nitrogénkötést mért. MCROY és mtsai. (1973) szerint a nagy értéket módszertani hibák eredményezték. Saját vizsgálataikban több nagyságrenddel kisebb értéket mértek a Thalassia gyökérzónájában. A Clostridium vagy Azotobacter baktérium populációkkal jellemzett társulásokban becsült éves nitrogénkötés általában 1 g alatt van négyzetméterenként (BROOKS és mtsai 1971, HEAD és CARPENTER 1975, PEARSON és TAYLOR 1978, SARALOV 1978). Láttuk, hogy a Keszthelyi-medencében és a Körös-holtág víztárolóban az üledék nitrogénkötése jelentősen meghaladja ezt az értéket. Hasonló nagyságrendet csak egy anaerób fjord üledékben mértek Skóciában (HARTVIG és STANLEY 1978). Sekély tavak gyakran nagykiterjedésű parti zónájában a makrofita állományhoz valamilyen formában kapcsolódó nitrogénkötés is jelentős lehet az egész tó nitrogénháztartásában. Hínárfélék gyökérzónájából is izolálták a *Spirillum lipoferum* mikroaerofil, általában gyökérzónában élő nitrogénkötő baktériumot, amely az oxigént és a szervesanyagot döntően a növénytől kapja. A skót Loch Leven-tóban tömegesen tenyésző *Potamogeton filiformis* gyökérzónájában e szervezet nitrogénkötése megközelítette az 1 μg N-t óránként, 1 g száraz gyökérre számolva (SYLVESTER-BRADLEY 1976). New York államban, a Cayuta sekély tó nagykiterjedésű *Myriophyllum spicatum* állományában a növényzeten élő epifitatársulás nitrogénkötése évente elérte a 12,5 μg N-t 1 mg növényre számolva. Az epifitatársulásban a nitrogénkötést elsősorban a Gloeotrichia kékalga és a Rhodopseudomonas fotoszintetizáló baktérium végezte (FINKE és SEELEY 1978).

Következtetések

1. Tavi üledékek nitrogénkötését célzó módszer fejlesztésünk során bizonyítottuk, hogy az acetilén redukciót az üledékekben is biológiai, enzimatikus folyamatok, közelebbről a nitrogenáz enzim végzi. Az üledékminta gyors ace-

tilén telítése és a keletkezett etilén mennyiségi visszanyerése céljából, a mintát inkubálás előtt és után is rázni kell. A minta inkubálás előtti rázásával azonban szétrombolódnak a vízüledékhatáron in situ állapotban szigorúan meghatározott és elrendezett fiziko-kémiai-biológiai gradiensek és a valóságos aktivitástól lényegesen eltérő választ mérünk.

2. Az eredeti in situ fiziko-kémiai-biológiai gradiensek megtartása és az acetilén tökéletes telítése céljából alakítottuk ki az érintetlen üledékhurka perforált műanyaghengerben módszert. 40 cm hosszú és 5 cm átmérőjű PVC műanyag csövet alsó 20 cm-es szakaszán 2 cm-enként átlyukasztottuk és jól tömítő teflon dugóval zártuk. A teflon dugókon keresztül telítettük a teljes üledéket acetilénnel. In situ inkubálás után az egész üledékhurkát alaposan összeráztuk a keletkezet etilén mennyiségi kinyerésére.

3. A Körös-holtág víztárolóban a nitrogénkötés vertikális eloszlása az üledékben különbözött a Keszthelyi-medencében mért eloszlástól. A víztárolóban a maximum az üledékfelszín alatt helyezkedett el. A Keszthelyi-medencében a meleg vízi évszakokban a nitrogénkötés maximuma az üledék felső 2 cm-es rétegében alakult ki. A felszíni maximum mellett, hónaptól függően különböző üledékmélységben, egy második, kisebb maximumot is mértünk.

4. A vízoszloppal összehasonlítva az üledék kevéssé lúgos. Az üledékfelszín kora tavaszi 7,15-ös pH értéke őszre 7,82-re növekedett. Az esetek többségében a vízüledékhatár pH értéke kisebb, mint a mélyebb rétegeké, feltehetően az erőteljesebb légzés következtében.

5. A Keszthelyi-medencében a hetvenes évek elején a vízüledékhatáron sohasem sikerült negatív redox potenciált mérnünk. Jelen vizsgálatunkban, a meleg vízi évszakokban a vízüledékhatáron a redox potenciál mindig negatív volt. Ősz felé a mélyebb rétegek redox potenciálja csökkent egészen −345 mV-ig. Az alacsonyabb vízhőmérséklet mellett a redukált anyagcseretermékek felhalmozódása dominált az eloxidálással szemben.

6. Kora tavasszal, jégolvadás után, az üledék intersticiális vizében feltűnően magas oldott szerves-N koncentrációt mértünk, 14,3 mg dm^{-3}. A víz felmelegedésével, május hónapban, a télen felhalmozódott oldott szerves-N gyorsan elhasználódott. A vízhőmérséklet csökkenésével, októberben növekedni kezdett az intersticiális víz oldott szerves-N tartalma.

7. Összehasonlító vizsgálatunk során legkevesebb intersticiális NH_4—N-t a polikultúrás halastó, legtöbbet pedig a Keszthelyi-medence üledékében mértünk, ahol a szabadon oldott ammónium ion egész évben igen nagy koncentrációban volt jelen és ez a nitrogénkötés szempontjából különös jelentőséggel bír.

8. Az Azotobacter típusú aerób nitrogénkötő baktériumok a Keszthelyi-medence üledékében nem játszanak mennyiségileg fontos szerepet a nitrogénkötésben. Csupán júniusban, az üledékfelszínen számoltunk 1000 sejtet egy g üledékben. Ugyanekkor a mélyebb, 5—8 cm-es üledékrétegben csak 10 sejtet találtunk egy g üledékben. Az üledék nitrogénkötésében a Keszthelyi-medencé-

ben döntően a Clostridium típusú anaerób nitrogénkötő baktériumok vesznek részt. Mennyiségük a felszíni üledékrétegben, júliusban elérte a 10^6 sejtet egy g üledékben. A nitrogénkötés évszakos vizsgálata során is ekkor mértük a legmagasabb értéket. A mélyebb rétegekben mért nitrogénkötési maximumokért esetenként feltehetően a szulfátredukáló baktériumok a felelősek. Az üledékfelszínen májusban, viszonylag kis Clostridium populációk mellett mért igen nagy nitrogénkötésben valószínűleg a hidrogén és metán oxidáló baktériumok is részt vettek.

9. Változatos tavakat képviselő 15 tó üledékének szervesanyag-tartalma és nitrogénkötése között kilenc gyakori összefüggés típus számítógépes próbája semmiféle szignifikáns összefüggést nem mutatott. Meglepően szoros összefüggést találtunk ugyanezen tavak elsődleges termelése és üledékének nitrogénkötése között ($r = 0{,}85$). A hatvány típusú összefüggés szerint ($y = 4{,}5 \times 0{,}85$) az üledék feletti vízoszlopban naponta megtermelt szervesanyag növekedésével ugrásszerűen nő az üledék nitrogénkötése. Az üledékre lehulló szervesanyag fontosságát tükrözi az üledék nitrogénkötése és az üledék feletti vízoszlop kiterjedése, azaz a vízmélység között talált elég szoros összefüggés ($r = 0.82$). Glükóz hozzáadás azonnali hatásaként a Körös-holtág víztárolóban jelentősen nőtt az üledék nitrogénkötése.

10. Korábbi ismeretanyaggal összhangban ammónia rövid idejű hatására az üledék nitrogénkötése nem csökkent, esetenként növekedett. Tavi üledékeknél az ammónia-hozzáadás hatását még nem vizsgálták, más rögzült társulásokban, azonban gyakran nagy végkoncentrációjú ammónia sem gátolta a nitrogénkötést. A Keszthelyi-medence üledékében igen nagy nitrogénkötést mértünk 4—5 mg dm^{-3}-es intersticiális ammónium nitrogén mellett. Kérdéses miért van gyakran igen jelentős nitrogénkötés állandóan nagy mennyiségű és könnyen felvehető formában jelenlevő ammóniát tartalmazó üledékekben.

11. Többváltozós regresszió elemzés szerint a Keszthelyi-medence üledékrétegeiben a nitrogénkötés legszorosabb kapcsolatot az üledékmélységgel, az ammónium ion koncentrációval és a redox potenciállal mutatott. A hat változós regressziós elemzés korrelációs koefficiense (0,6647) jelzi, hogy az elemzésből fontos paraméterek kimaradtak, például a nitrogénkötésért felelős mikroorganizmusok mennyiségi eloszlása.

12. A Keszthelyi-medencében az üledék nitrogénkötése márciustól júliusig növekedett, majd csökkenni kezdett. A Körös-holtág víztárolóban a hideg vízi periódusban hasonlóan kicsi a nitrogénkötés, de a Keszthelyi-medencétől eltérően a legnagyobb aktivitást, 83 mg m^{-2} nap^{-1}, áprilisban mértük. Ezt követően csökkent a nitrogénkötés, majd augusztusban újra megnőtt és a vízhőmérséklet csökkenésével, ősszel csökkenni kezdett. Halastavakban az üledék nitrogénkötése a tavaszi kisebb maximum után lecsökkent, majd a tenyésztési periódus végén újra emelkedett.

13. Tavi üledékekben eddig és jelen vizsgálatainkban mért nitrogénkötés összehasonlítása azt mutatja, hogy a mért legnagyobb nitrogénkötés megközelíti a 100 mg N m^{-2} nap^{-1} értéket. A rendkívül energiaigényes folyamathoz azonban csak korlátozott ideig áll rendelkezésre, a négyzetméterenként naponta 100 mg nitrogén megkötéséhez szükséges energia. A legmagasabb nitrogénkötési érték, amit a Körös-holtág víztárolóban kora tavasszal mértünk, csak a kacsás-halas hasznosítású belvíztároló igen jelentős allochton szervesanyag-ellátásával magyarázható.

14. 1980-ban a Keszthelyi-medence üledékében megkötött nitrogén mennyisége 4,7 g m^{-2} $év^{-1}$, megközelíti a fölötte levő vízoszlopban megkötött nitrogén mennyiségét (7,1 g m^{-2} $év^{-1}$). A Keszthelyi-medence eredményei megegyeznek az egyetlen eddig vizsgált rendszer, a Ribinszki-víztároló adataival, ahol az üledékben megkötött nitrogén közel azonos volt a vízoszlopban megkötött nitrogénnel. A Körös-holtág víztárolóban az üledék 6,5 g m^{-2}-es évi nitrogénkötése lényegesen meghaladta a vízoszlop nitrogénkötését. Tavi üledékekkel összehasonlítva a napfény által megvilágított zónában élő nitrogénkötő társulásokban az éves nitrogénkötés elérheti a 100 g m^{-2} értéket. Ezekben a társulásokban a nitrogénkötést kékalgák végzik a fotoszintézis primér folyamataiban termelődő szubsztrát és energia rovására.

IRODALOM

Brooks, R. H., Brezonik, P. L., Putnam, H. D., Keirn, M. A.: Nitrogen fixation in an estuarine environment: the Waccasassa on the Florida Gulf coast. Limnol. Oceanogr. **16,** 701—710 (1971).

Carpenter, E. J.: Nitrogen fixation by a blue-green epiphyte on pelagic Sagassum. Science **178,** 1207—1209 (1972).

Dicker, H. J., Smith, D. W.: Physiological Ecology of Acetylene Reduction (Nitrogen Fixation) in a Delaware Salt Marsh. Microb. Ecol. **6,** 161—171 (1980).

Entz, B.: Some physical and chemical conditions of the water of Lake Balaton, investigated from september 1948, to april 1949. (Temperature, transparency, dissolved oxygen, pH and organic substances.) Különlenyomat a Magyar Biológiai Kutatóintézet Évkönyvéből 69—81 (1949—1950).

Finke, L. R., Seeley, H. W. Jr.: Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) by Epiphytes of Freshwater Macrophytes. Applied and Environmental Microbiol. **36,** 129—138 (1978).

Goering, J. J., Parker, P. L.: Nitrogen fixation by epiphytes on sea grasses. Limnol. Oceanogr. **17,** 320—323 (1972).

Granhall, U., Lundgren, A.: Nitrogen fixation in Lake Erken. Limnol. Oceangr. **16,** 711—719 (1971).

Green, F., Edmisten, J.: Seasonality of nitrogen fixation in Gulf Coast salt marshes. p. 113—126. In H. Lieth (ed.), Phenology and seasonality modeling. Springer-Verlag New York, Inc., New York (1974).

Hanson, R. B., Gundersen, K. R.: Bacterial Nitrogen Fixation in Polluted Coral Reef Flat Ecosystem, Kaneohe Bay, Oahu, Hawaiian Islande. Pacific Science **30,** 385—393 (1976).

Hargrave, B. T.: Coupling carbon flow through some pelagic and benthic communities. J. Fish. Res. Board Can. **30,** 1317—1326 (1973).

Hargrave, B. T.: The importance of total and mixed-layer depth in the supply of organic material to bottom communities. Symp. Biol. Hung. **15,** 157—165 (1975).

Hartwig, E. O., Stanley, S. O.: Nitrogen fixation in Atlantic deep-sea and coastal sediments. Deep-Sea Research **25,** 411—417 (1978).

Head, W. D., Carpenter, E. J.: Nitrogen fixation associated with the marine macroalga Codium fragile. Limn. Oceanogr. **20,** 815—823 (1975).

HERBERT, R. A.: Heterotrophic nitrogen fixation in shallow estuarine sediments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **18,** 215—225 (1975).
HERÓDEK, S.: Recent results of phytoplankton research in Lake Balaton. Annal. Biol. Tihany **44,** 181—198 (1977).
HOLST, R. W., YOPP, J. H.: Environmental regulation of nitrogenase and nitrate reductase as systems of nitrogen assimilation in the Azolla mexicana-Anabaena azollae symbiosis. Aquatic Botany. **7,** 369—384 (1979).
HORNE, A. J., VINER, A. B.: Nitrogen fixation and its significance in tropical Lake George, Uganda. Nature **232,** 417—418 (1971).
HORNE, A. J., GOLDMAN, C. R.: Nitrogen fixation in Clear Lake, California. I. Seasonal variation and the role of heterocysts. Limnol. Oceanogr. **17,** 678—693 (1972).
HORNE, A. J., CARMIGGELT, C. J. W.: Algal nitrogen fixation in Californian streams: seasonal cycles. Freshwat. Biol. **5,** 461—470 (1975).
KEIRN, M. A., BREZONIK, P. L.: Nitrogen fixation by bacteria in Lake Mize, florida, and in some lacustrine sediments. Limnol. Oceangr. **16,** 720—731 (1971).
LEE, K. K., WATANABE, I.: Problems of the Acetylene Reduction Technique Applied to Water-Saturated Paddy Soils. Applied and Environm. Microbiol. **34,** 654—660 (1977).
MAGUE, T. H., HOLM-HANSEN, O.: Nitrogen fixation on a coral reef. Phycologia. **14,** 87—92 (1975).
MARSHO, T. V., BURCHARD, R. P., FLEMING, R.: Nitrogen fixation in the Rhode River estuary of Chesapeake Bay. Can. J. Microbiol. **21,** 1348—1356 (1975).
MCROY, C. P., GOERING, J. J., CHANEY, B.: Nitrogen fixation associated with sea grasses. Limnol. Oceanogr. **18,** 998—1001 (1973).
MULDER, E. G., BROTONEGORO, S.: Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria in A. Quispel (ed.) The Biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Company, Amsterdam p. 37—85 (1974).
OLÁH, J.: A Keszthelyi-öbölben időszakonként kialakuló vízvirágzások okairól. Hidrol. Közl. **51,** 455—459 (1971).
OLÁH, J.: Studies on the photosynthetic pigments and their decomposition in the sediment of Lake Balaton and Lake Belső. Annal. Biol. Tihany **39,** 115—121 (1972).
OLÁH, J.: Bacterial gradients at the sediment-water interface of shallow lakes. Annal. Biol. Tihany. **40,** 219—225 (1973).
OLÁH, J.: Metalimnion function in shallow lakes. Symp. Biol. Hung. **15,** 149—155 (1975).
OLÁH, J.: The annual energy budget of Lake Balaton. Arch. Hydrobiol. **81,** 327—338 (1978).
OLÁH, J.: Structural and functional quantification in a series of Hungarian hypertrophic shallow lakes. Development in Hydrobiology, Vol. 2. Hypertrophic Ecosystems ed. by J. Barica and L. R. Mur. p. 191—202 (1980).
OLÁH, J., EL SAMRA, M. I., TÓTH, L.: Nitrogénkötés a Balatonban. Hidrol. Közl. **59,** 51—56 (1979).
OLÁH, J., EL SAMRA, M. I., MONEIM, M. A., TÓTH, L., VÖRÖS, L.: Nitrogénkötés sekély tavakban (1980). (nyomdában)
PATRIQUIN, D. G., KROWLES, R.: Nitrogen fixation in the rhizosphere of marine angiosperms. Mar. Biol. 16, 49—58 (1972).
PATRIQUIN, D. G., KEDDY, C.: Nitrogenase activity (acetylene reduction) in a Nova Scotian salt marsh: its association with angiosperms and the influence of some edaphic factors. Aquatic Botany **4,** 227—244 (1978).
PATRIQUIN, D. G., MCCLUNG, C. R.: Nitrogen Accretion, and the Nature and Possible Significance of N_2 Fixation (Acetylene Reduction) in a Nova Scotian Spartina alterniflora Stand. Mar. Biol. **47,** 227—242 (1978).
PEARSON, H. W., TAYLOR, R.: Nitrogen fixation in a polluted canal system. Ecol. Bull. (Stockholm) **26,** 69—82 (1978).
REEBURGH, W. S.: An improved interstitial water sampler. Limnol. Oceanogr. **12,** 163—165 (1967).
RODINA, A. G.: Methods in aquatic microbiology. University Park Press, Baltimore p. 461 (1972).
EL SAMRA, M. I., OLÁH, J.: Significance of nitrogen fixation in fish ponds. Aquaculture **18,** 367—372 (1979).
САРАЛОВ. А. И.: Фиксация молекулярного азота в рыбинском водохранилище. Гидробиологический журнал. **14,** 5 33—38 (1978).
САРАЛОВ. А. И., ДАУҚШТА. А. С.: Фиксация молекулярного азота в озерах Латвийской ССР **14,** 6 7—14 (1978).
SCHICK, H. J.: Substrate and light dependent fixation of molecular nitrogen in Rhodospirillum rubrum. Arch. Mikrobiol. **75,** 89—101 (1971).

SCHEINER, D.: Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. Water Research **10**, 31—36 (1976).

STEWART, W. D. P.: Algal fixation of atmospheric nitrogen. Plant Soil. **32**, 555—588 (1970).

STRICKLAND, J. D. H., PARSONS, T. R.: A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Bd. Canada Bulletin p. 167 (1968).

SUGAHARA, I., SAVADA, T., KAWAI, A.: Microbiological studies on nitrogen fixation in aquatic environments — VI. On the in situ nitrogen fixation in water regions. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **37**, 1093—1099 (1971).

SYLVESTER-BRADLEY, R.: Isolation of Acetylene-reducing Spirilla from the Roots of Potamogeton filiformis from Loch Leven (Kinross). Journal of General Microbiol. **97**, 129—132 (1976).

TORREY, M. S., LEE, G. F.: Nitrogen fixation in Lake Mendota, Wisconsin. Limnol. Oceanogr. **21**, 365—378 (1976).

VERDOUW, H., ECHTELD, C. J. A., DEKKERS, E. M. J.: Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. Water Research **12**, 399—402 (1978).

WATANABE, I., CABRERA, D. R.: Nitrogen Fixation Associated with the Rice Plant Grown in Water Culture. Applied and Environ. Microbiol **37**, 373—378 (1979).

WIEBE, W. J., JOHANNES, R. E., WEBB, K. L.: Nitrogen Fixation in a Coral Reef Community. Science **188**, 257—259 (1975).

ÖSSZEHASONLÍTÓ FÉNY- ÉS ELEKTRONMIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK NEUROSZEKRÉCIÓS SEJTEKEN

ÁBRAHÁM AMBRUS

Bevezetés

Az állatország legkülönbözőbb csoportjaiba tartozó fajok idegrendszerén végzett anatómiai, hisztológiai és hisztokémiai vizsgálatok maradék nélkül beigazolták, hogy az idegrendszer egyes sejtjei, illetőleg sejttelepei váladékot termelnek. Ezek a sejtek, illetőleg sejtcsoportok ezzel a tevékenységgel a tőlük legtávolabb eső szerveknek a működésére és ezen keresztül az egész szervezet életére döntő befolyást gyakorolnak. A váladéktermelő idegsejtek a neuroszekréciós sejtek és a váladék a neuroszekrétum.

A neuroszekréciós sejtek eredetéhez, szerkezetéhez és működéséhez kapcsolódó újszerű megállapítások sok támadásra, sok vitára és csatára szolgáltattak alkalmat. Ezek a csaták az elmúlt évtizedekben, sőt még a közelmúltban is dúltak, de ma már elcsendesedtek. A neuroszekréció tana diadalmaskodott és az egész állatvilágra vonatkozólag beigazolódott.

Meg kell vallanom, hogy hosszú időn keresztül magam is a legélesebben szemben álltam ezzel a tannal egyszerűen azért, mert ezt sem a magam készítette, sem a másoktól kölcsön kapott preparátumokon nem láttam beigazolva. Egyes idegsejtekben impregnálással láttam argentophil szemecskéket, sőt ilyeneket a neuritek mentén is észleltem, de ezek a dolog lényegéről nem tudtak meggyőzni. Azonban a csíkbogár *(Dytiscus marginalis)* agyán végzett vizsgálataim olyan készítmények birtokába juttattak, amelyek láttára álláspontomat feladtam és azok sorába szegődtem, akik a neuroszekréciót ténynek, az idegrendszer s általában az egész állati élet szempontjából fontosnak, s a kutatásoknak ezen a vonalon való kiterjesztését és elmélyítését hasznosnak és szükségesnek tartják.

Anyag módszerek

A vizsgálatokat a földi giliszta *(Lumbricus terrestris)*, a csíkbogár *(Dytiscus marginalis)*, az éticsiga *(Hélix pomatia)*, a tőponty *(Cyprinus carpio)* és a patkós orrú denevér *(Rhinolophus ferrum equinum)* idegrendszerén végeztük. A földi gilisztának és a csíkbogárnak a garat feletti dúcát, az éticsigának a gastro-intestinalis rendszerét, a pontynak a preopticus magvát, a patkós orrú denevérnek a supraopticus és paravertebralis magvát vizsgáltuk meg.

A vizsgálatok egy részét fénymikroszkóppal, a másikat elektronmikroszkóppal végeztük. A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz festett és impregnált készítményeket használtunk.

A festések egy részét a Gömöri-Bargmann-féle előírás szerint krómhematoxilinnel és pfloxinnal, a másikat paraldehidfukszinnal végeztük. Ma erre a célra a pseudoizocianidot használják, amely fluorescens mikroszkóp alatt a legfinomabb neuroszekréciós granulum töredékeket is megmutatja.

Impregnálásra a következő eljárásokat használtuk. 1. Golgi-féle gyors eljárás, 2. Ramóny Cajal IV-gyel jelzett eljárás, 3. Bielschowsky-féle pyridines eljárás totálisan és metszeteken, 4. Bielschowsky—Gros-féle eljárás, 5. Bielschowsky—Gros—Cauna-féle eljárás és 6. Jabonero-féle ezüstkarbonátos eljárás. A két utóbbit fagyasztott metszeteken végeztük.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz az anyagot 1%-os veronalacetáttal pufferolt ozmiumsavban fixáltuk, a szokásos módon víztelenítettük és araldítba ágyaztuk. Az LKB elektronmikrotommal készített metszeteket Jeol, B. 100, Phylips és Tesla típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A vizsgálatokat Londonban, Budapesten és Szegeden végeztük. Munkálataink során segítségünkre voltak Peter Gould Londonban a Middlesex Hospital Anatómiai Intézetének readere, Szabó Dezső a Központi Orvostudományi Kutató Intézet elektronmikroszkópos laboratóriumának a vezetője és Párducz Árpád a szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetének a kutatója. Mindhármuknak ezúttal is köszönetet mondunk.

Történeti áttekintés

Secernáló idegsejteket DAHLGREEN (1914) látott először cápák caudalis gerincvelejében, de a leírásuk C. C. SPEIDEL (1919, 1922) nevéhez fűződik, aki ezeket a ráják és a csontos halak gerincvelejében is megtalálta. A fürge csele *(Phoxinus laevis)* hipotalamusának a neuroszekréciós aktivitására elsőként E. SCHARRER (1928) mutatott rá. Ugyancsak E. SCHARRERnek (1930, 1933) különböző gerinceseken (csontoshalak, kétéltűek, hüllők emlősök) végzett vizsgálatai teremtették meg az alapokat a neuroszekréció tanának kialakítására. A kétéltűekre vonatkozólag SANZ IBANEZnek (1935) a hüllőkre vonatkozólag KUROTSUnak a vizsgálatai érdemelnek említést. A madarak agyi neuroszekréciójának a kutatása terén STOLZE (1951), WINGSTRAND (1951), BARGMANN és JACOB (1952) tanulmányait kell megemlítenünk. Az emberi hypothalamo-hypophyseos neuroszekréciós komplexumának a leírása E. SCHARRER és GAUPP (1933, 1936) nevéhez fűződik. A hipotalamusz magvak szekréciós tevékenységét POPPI (1930) is feltételezte, de SCHARRER és GAUP állapította meg, hogy a köztiagy magasabb hormonközpont, mint a hipofízis, amennyiben itt termelődnek azok a hormonok, amelyek keletkezési helyének addig a hipofízist tartot-

ták és amiért ezt mestermirigy (master gland) névvel illették. KOPJÁK (1946) nevéhez fűződik annak a megállapítása, hogy a hipofízis hátsó lebenye (agylebeny, neurohipofízis) és a hipotalamusz vegetatív központjai koordinált rendszert képviselnek. Ezzel a megállapítással bebizonyosodott, hogy a hipofízis működését másképpen kell magyarázni, mint ezelőtt. Ugyanis eddig az volt a felfogás, hogy a hipofízis három lebenye több különböző hormont termel és ezek révén uralma alatt tartja az összes belső szekréciós mirigyet és ezeken keresztül az egész szervezetet.

Egyetemi hallgató koromban és jóval ezután is úgy tudtuk, hogy a hipofízis három lebenye közül az első termeli a növekedési hormont, a két gonadotrop hormont (folliculus stimuláló hormon, luteinizáló hormon) a lactotrop hormont, a thyreotrop hormont és az adrenocorticotrop hormont. A középső lebeny termeli az intermedint (melanophor hormon). A hátsó lebeny az úgy nevezett agylebeny vagy ideglebeny termeli a vasopressint, az oxitocint és az antidiuretikus hormont.

A köztiagyon végzett vizsgálatok kiderítették, hogy az oxitocin, a vasopressin és az antidiuretin a köztesagy két magvában a nucleus supraopticusban és a nucleus paraventricularisban termelődik. Ezekben vannak azok az idegsejtcsoportok, illetőleg magvak (nucleus), amelyek apró granulumok formájában termelik addig az agylebenynek tulajdonított három hormont. A magvak idegsejtjeiben termelődő granulumok a neuritekben vándorolnak a hipofízisbe. A neuritek a hipotalamo-hipofízis nyélben (tractus hypothalamohypophyseos) egyesülnek, amely a hátsó lebenybe lép és itt végződik.

A gerinctelenek neuroszekréciós sejtjeinek első kutatói HANSTRÖM (1931, 1934) WEYER (1935) és B. SCHARRER (1937) voltak. Korán mutattak ki neurocrin sejteket a rákok szemnyelében, az Opisthobranchiák, Polychaeták és Oligochaeták központi idegrendszerében. Ma a Cnidariák és Echinodermaták kivételével a gerinctelen állatok valamennyi törzséből ismeretesek szecernáló idegsejtek.

Annak a kimutatása, hogy a rovaragyban neuroszekréciós folyamatok mennek végbe WEYER (1935) nevéhez fűződik, aki a mézelő méh *(Apis mellifica)* protocerebrumából írt le olyan sejteket, amelyek váladékszemecskéket, illetőleg rögöcskéket tartalmaznak, amelyek időnként megmozdulnak és kiürülnek.

A későbbiek során PLUGFELDER (1937, 1952), HANSTRÖM (1940), DAY (1940), SCHARRER B. (1941), VOGT (1942), ARVY és GABE (1950, 1953), DE LERMA (1954), ARVY (1956) vizsgálatai voltak azok, amelyek során beigazolódott, hogy a rovarok osztályában különösen a Pseudoneuroptera, az Orthoptera, a Dermaptera, a Hymenoptera, a Neuroptera, a Diptera, a Lepidoptera, a Rhynchota és a Coleoptera csoportokba tartozó állatok garat feletti és garat alatti dúcában, továbbá a thorakalis és abdominalis dúcokban, neuroszekréciós tevékenységet lehet kimutatni.

Földi giliszta: garat feletti dúc. Fénymikroszkópia

A földi giliszta *(Lumbricus terrestris)* garat feletti dúcának (ganglion supraoesophageum) közvetlenül a köztakaróra következő rétegét unipoláris idegsejtek alkotják. A sejttest körte alakú és a periféria felé lekerekített, a neuropil felé vastag nyúlványba fut ki, amely fokozatosan elvékonyodik és elágazik. A sejtmag kerekded, a testhez viszonyítva nagy és homogén. Impregnált képeken a citoplazmában amorf szemecskék láthatók (1. ábra).

Elektronmikroszkópia

Az idegsejtek között elektronmikroszkóp alatt aránylagosan sok a neuroszekréciós alak. A szekrétum granulumok, amelyek a citoplazmának szinte az egész állományát kitöltik, kisebb-nagyítású képeken kerekdedek és homogének. A nagyságban általában egyeznek, de az is előfordul, hogy kisebb és nagyobb formákat tartalmazó területek váltakoznak egymással. Ugyanez áll a sűrűségre vonatkozólag. Nagyobb nagyítású képeken a kimondottan kerek formák között összenyomott és kissé megnyúlt alakok is előfordulnak (2. ábra). Erős nagyítás mellett nem ritkák azok a formák, amelyeknek homogén centrális állományát jól elkülönült kéreg veszi körül. Ezek az alakok a dense core vezikulumok. Mivel közepes nagyítás mellett nem látszik a kéreg, arra is lehetne gondolni, hogy a granulumok nagyobb része dense core alak, de kisebb számban sima formák is vannak közöttük. Bárhogy is áll a dolog hangsúlyoznunk kell a granulumok sokaságát, amelyhez hasonlót csak a zöldvarangy *(Bufo viridis)* mellékveséjének a bélállományában találtunk.

A citoplazmában nagyon sok az endoplazmatikus retikulum. Úgyszólván az egész citoplazma tele van csomókba rendeződő hosszúkás, táglumenű ciszternákkal. Ezek között nagyon sok a megnyúlt forma, de az egyik végükön lekerekedő, a másikon kihegyesedő alakokból álló csoportok sem tartoznak a ritkaságok közé. Külön kell szólnunk a kisebb-nagyobb vezikulumokról, amelyek egyesével vagy csoportosan mindenütt megtalálhatók. Az endoplazmatikus retikulumok sokasága kapcsolatban állhat a neuroszekrétum granulumok termelődésével.

A mitokondriumok száma nem nagy. Alakjuk sem mondható típusosnak. Pontos szerkezetüket nehéz megállapítani, de mind a hosszmetszetek, mind a keresztmetszetek amellett szólnak, hogy tubuláris formákkal állunk szemben. Ritkán ugyan, de olyan képek is akadnak, amelyek a középen befűződő alakjukkal az osztódással való szaporodás mellett tanúskodnak (3. ábra).

A citoplazmában gyakoriak a hosszúkás, két végükön elvékonyodó elektron dense csíkok és az apró multivezikuláris testek. Nem ritkák a nagy, kerekded homogén vezikulumok, amelyek hol sötétek, hol világosak. Ezeket lipid testeknek tartjuk (4. ábra).

Rendkívül érdekes és a struktúra megismerése szempontjából is felette használható a Golgi-féle komplexum, amely ahogy a következő ábrán látható négy ívszerűleg hajlott csőből áll. A csövek mindegyike három egymásfelé jól elhatárolódó szakaszból tevődik össze. Egyik a kezdő szakasz, amely az ábrának a jobb szélén középen látható. A másik a középső, amely tömör, látszólag egymáshoz simuló gömböcskékből áll. Az utolsó szakasz változó lumenű és kanyargós csőrészlet, amely a vége felé elvékonyodik, majd üres vezikulumban végződik. A csövek kezdő szakasza egy terjedelmes endoplazmatikus ciszterna falához simul, amelyet a csövek látszólag teljesen körülvesznek. Ebből esetleg arra is lehetne következtetni, hogy a csőrendszer kezdeti szakasza és az endoplazmatikus retikulum ciszternája között genetikus kapcsolat lehet (5. ábra).

A sejtmag kerekded, esetenként hosszúkás, kromatinban szegény. A két maghártya jól szembetűnő. A belső vastag és elektron dense, a külső vékony és halvány. A kettő közötti hézag tágas. A magvacska szabálytalan, homogén elektron dense test.

Csíkbogár: garat feletti dúc. Fénymikroszkópia

A csíkbogár *(Dytiscus marginalis)* garat feletti dúcát (ganglion supraoesophageum) kifelé egyrétegű hengerhám határolja. Erre következik befelé az idegsejtréteg, amely unipoláris sejtekből áll (6. ábra). Ebben a rétegben a pars intercerebralis két oldalán, a bevágástól jobbra és balra közvetlenül az agyállományt határoló hám alatt két, nagy sejtekből álló sejtcsoport helyezkedik el. Egyik az egyik oldalon, a másik a másikon. Egy csoportban rendesen 10—15 sejtet találunk. A sejtek hosszúkásak, centrális irányban vastag nyúlványban folytatódnak. A hám felé eső kiszélesedő részük lekerekített. Az egész sejttest körtealakot mutat. A sejtmag nagy, centralis fekvésű és chromatinban szegény. A magvacska kompakt, jól szembetűnő. A citoplazmában kisebb-nagyobb neuroszekrétum granulumok vannak (7. ábra). Ezek kompakt kerekded testek. Alakjuk az ökológiai viszonyoknak és a szervezet mindenkori szükségletének megfelelően változik. Chromhaematoxylin phloxin festés után piros, illetőleg lila színben jelennek meg. Pirosak a praegranulumok, lilák a definitív alakok. Néha az egész sejtcsoport piros, máskor lila, illetőleg a sejtek egy része piros, a másik lila. Elektromos áram, erős fény és tartós sötétség hatására csak piros granulumokat lehet látni a sejtekben (8. ábra).

A szekrétum homogén anyag formájában jelenik meg a citoplazmában és ezt teljesen kitölti. A felaprózódás csak később indul meg és ott, ahol a neurit kilép a sejtből. Sikerült festés után a ferde helyzetű sejtek a környezetből kiemelkednek és a pars intercerebralisban a bevágás közelében neuritjeik mind az egyik, mind a másik oldalon pályává rendeződnek. A pályák egymás mellett haladva a neuropilbe folytatódnak és az agy állománynak a közepe táján kereszteződnek (9. ábra).

A szekrétum szemecskék a sejtekből nem csak a nyúlványokon, illetőleg a pályákon kerülnek az agy állományába. Kísérleti körülmények között, de normális viszonyok között is meg lehet állapítani, hogy a váladékszemecskék a sejthártyának bármelyik részén távozhatnak és valóban távoznak a sejtből. A váladék útjának ez a kettőssége meggyőző bizonyíték arra, hogy a neuroszekrétum egy része magában az agyban használódik fel, míg a másik a pályákon tovább halad a corpus cardiacum és a corpus allatum felé (10. ábra).

A csiborból *(Hydrophilus piceus)* és más bogárfajokból a fenti sejtcsoportok mellett két másik sejtcsoportot írtak le, amelyek a corpus pedunculatumoktól medialisan helyezkednek el. Mi a *Dytiscus marginalis*ból Gömöri-Bargmann szerint festett preparátumokon ilyen neuroszekréciós sejtcsoportokat nem láttunk. Azonban megváltozott a helyzet, amikor a Bouinnal fixált metszetsorozatokat paraldehydfuxinnal festettük. Ezeken a metszeteken jól lehetett látni a sötét vörösre festődő nagy sejteket és ezekben a neuroszekrétum szemecskéket. A szemecskék, illetőleg a csapszerű képződmények a nagy mag közelében a sejt egyik pólusán csoportosulnak, illetőleg kisebb csoportokban a sejtekből kilépnek. Ha a kapott képekből biztos következtetéseket lehet vonni, akkor itt is az a helyzet, hogy a szekrétumszemecskék több helyen hagyják el a sejtek testét, de fő tömegükben a sejtnyúlványokban távoznak.

A neuroszekréciós sejteknek a csíkbogár agyában való előfordulását, ezek helyét, formáját a belőlük kilépő neurit útját és működését az impregnálás útján kapott képek is igazolják. Azonban sem a CAJAL, sem a BIELSCHOWSKY szerint impregnált képeken nem tudtunk meggyőződést szerezni arról, hogy a neuroszekrétum granulumok a pályáknak a neuropil területére eső szakaszán a neuritekben vagy ezek között haladnak a végrehajtó szervek felé.

Elektronmikroszkópia

Hogy a neuroszekréciós sejtek ultrastruktúrájáról, a granulumok keletkezéséről és vándorlásáról bővebb tájékozódást szerezzünk, a medialis neurosecretóricus sejteket elektronmikroszkóp alatt is megvizsgáltuk. Megállapításaink, amelyek alapproblémák boncolgatása szempontjából is hasznot jelentenek a következőkben foglalhatók össze.

A szekréciós sejtek membránja élesen körvonalazott, néhol hullámos lefutású hártya, amelyet az esetek legnagyobb részében jól kivehető glyahártya határol a szomszéd állomány felé. A glyahártyát a glyasejtek nyúlványai alkotják.

A citoplazma homogén állomány. Sok benne a neuroszekréciós granulum és az endoplazmatikus retikulum. Gyakoriak a multivezikuláris testek, kevés a mitokondrium és a Golgi-féle komplexum.

A neuroszekréciós granulumok szétszórtan helyezkednek el a citoplazmában, esetenként csoportokat alkotnak. Az endoplazmatikus retikulum ciszternái

sorbarendeződő csövek, máshol változó lumenű, üregrendszerek. Gyakoriak az elágazó formák és a terjedelmes üres terek (11. ábra).

A mitokondriumok száma kevés. Hosszúkás és vékony testek. Főleg a Golgi komplex szomszédságában nem ritkák az olyan formák, amelyek a transzformálódásnak, illetőleg a degenerációnak a jeleit mutatják.

A Golgi komplexek száma kicsi. Általában az ismert formát és szerkeztet mutatják. Tubulusokból és vezikulumokból állanak. A tubulusok mentén és ezek végén helyezkednek el a vezikulumok. Az utóbbiak formája és mérete ingadozó. Nagyobb részük világos, a faluk jól elhatárolt, de azok a formák sem ritkák, amelyek erős elektrondenzitást mutatnak (12. ábra).

A sejtmag centrális helyzetű, kerekded, néha szabálytalan. A maghártya kettős. A két hártya élesen elkülönül egymástól. A belső élesebb, egyenletes vastagságú, a külső hullámos lefutású, a kettő közötti hézag átmérője változó. A kromatin világos szemecskék és rögöcskék formájában jelentkezik. Néha azonban nagyobb elektron dense tömegeket is lehet látni, amelyek formában és méretben jelentős különbözőségeket mutatnak.

A magvacska semmiféle jellegzetességet nem mutat. Az esetek legnagyobb részében határozatlan, elektron világos csomó. Apró szemecskékből és rögöcskékből tevődik össze (13. ábra).

Éticsiga: gastro-intestinalis rendszer Elektronmikroszkópia

Az éticsiga *(Hélix pomatia)* gastro-intestinalis idegrendszere egész lefutásában tele van neuroszekréciós granulumokkal. Ezek között vannak apró kerekded formák, vannak nagyobb hosszúkás alakok és feltűnő nagyságú eliptikus testek. A kicsi, kerekded formákat a tengelyfonalakban és az idegsejtekben találjuk. Ezek részben az agyidúcsejtekből a nervus intestinalison keresztül jönnek a fali fonadékokba, részben a falidúcsejtekben termelődnek (14. ábra). Az idegrostokban való eloszlásuk nem egyforma. Vannak rostszakaszok, amelyek tele vannak granulumokkal és vannak olyanok, amelyekben egyetlen granulumot sem lehet látni. Természetesen átmeneti formaként akadnak olyan rostdarabok, amelyekben csak egy vagy két granulumot találunk. A jelenség a mindenkori fiziológiás állapotot tükrözi (15. ábra).

A nagyobb, hosszúkás formák között néhol apró megnyúlt deformált töredékek is vannak. Ezek megjelenése a hormon leadással vagy a degenerációval lehet kapcsolatban. Ritkán ugyan, de az is előfordul, hogy két rostszakasz közé egy nagy kerek, homogén test illeszkedik, amely a granulumokkal semmi kapcsolatot sem mutat. Olyanféle test, mint amilyeneket a földi giliszta neuroszekréciós sejtjeiben is láttunk, s amelyet az irodalomban lipidtest néven emlegetnek anélkül, hogy eredetéről és funkciójáról elfogadható magyarázatot adnának. Valószínűleg patológiás elváltozás.

Különlegesek a nagy eliptikus homogén testek, amelyekkel a glyasejtekben és a glyanyúlványokban találkozunk. De máshol is előfordulnak, néha úgy is, hogy vékony nyúlványaikkal egymáshoz kapcsolódnak. Eredetük, szerepük ismeretlen. Képeink tanúsága szerint a glyasejtekben keletkeznek. Glyagranulumoknak nevezzük (16. ábra).

Tőponty: praeoptikus mag
Fénymikroszkópia

A tőponty *(Cyprinus carpio)* neuroszekréciós magvai (nucleus praeopticus) hosszúkás, tömör testek. A harmadik agykamra oldalsó kitűrődésének (recessus lateralis) a két oldala mentén helyezkednek el. Sejtjeik unipoláris idegsejtek. Vannak közöttük kisebbek és nagyobbak. A nagyobbak neuroszekréciós sejtek, amelyek a mag hátoldalán helyezkednek el. Ez a rész a nucleus praeopticus magnocellularis. A ventralis oldala, ahol a kisebb sejtek vannak a nucleus praeopticus parvocellularis.

A neuroszekréciós sejtek alakja változó, úgyszintén a nagysága is. A citoplazma homogén, a sejtmag kerekded, a maghártya élesen szembetűnő. A citoplazma Gömöri-Bargmann szerint sötét kékre festődik, úgyszintén a maghártya is. A citoplazma régi preparátumokon apró szemecskékkel van tele. A neurit széles alappal indul és fokozatosan elvékonyodik. Egynemű szekrétummal van tele, amely a sejtből való kilépése után mindjárt hosszúkás rögökre tagolódik, amelyek egymástól kisebb-nagyobb távolságra követik egymást (17. ábra).

A sejtekben termelődő neuroszekrétumot a tractus praeoptico-hypophyseos szállítja a hipofízis hátsó lebenyébe a neurohipofízisbe. A szekréciós granulumokat az axoplazma áramlása viszi a neurohipofízisbe. A transzport hipofízist, vagyis annak a feltételezését, hogy a neuroszekréciós granulumok intraaxonalisan az axoplazma áramlásával jutnak a hipopfízisbe, BARGMANN és SCHARRER (1951), HOLD és ZETLER (1953), KOBAYASHI és társai (1959), BHARGAVA (1966—1969), JASINSKI és GORBMAN (1966) állítottak fel. Ezek a szerzők állapították meg, hogy a nucleus praeopticusban termelődő neuroszekréciós anyag a hypothalamo-hypophysalis pályán (tractus hypothalamo hypophyseos) jut el a hipofízisbe. Ezek a szerzők mutatták ki, hogyha a hipofízist kioperálják (hypophysisektomia) neuroszekréciós anyag halmozódik fel a proximalis csonkban. PALAY (1945, 1960), HILD (1954), HORSTMAN (1958), CARLISLE (1958) és többen mások elfogadták és támogatták a transzport hipotézist. Ezzel szemben (GREEN és von BREEMEN (1955), DIEPEN és társai (1959), GREEN és MAXWELL (1959), CHRIST (1960, 1962) és DIEPEN (1962) ellene voltak a transzport hipotézisnek. Szerintük a hormonok, ahogy azt a Gömöri pozitív anyag mutatja, nemcsak a nucleus praeopticus neuroszekréciós sejtjeinek pericarionjában termelődnek, hanem képződnek mindenütt, ahol Gömöri-

Bargmann szerint festődő állomány van. FRIDBERG és SAMELSSON (1959) azt észlelte, hogy a fürgecsele *(Leuciscus rutilus)* neurohipofízisének a sejtjeiben a pituicytákban előbb jelenik meg a neuroszekréciós anyag, mint a nucleus praeopticus neuroszekréciós sejtben. Magától értetődik, hogy ez a lelet erősen ellene mond a transzport hipotézisnek. Viszont a transzport hipotézis mellett szól HILD kísérlete (1954), aki experimentálisan igazolta, hogy a tractus hypophyseos neuroszekréciós rostjaiban axoplazma áramlás van, amelyet a patkánynál másodpercenként 100—200 μm-nak talált. Abból, amit a transzport hypotézisre vonatkozólag elmondottunk, általánosságban azt lehet következtetni, hogy neuroszekrétum transzportnak kell lenni és ilyen van is, de nincs elfogadható válasz arra, hogy a nem neuroszekréciós anyag az axonterminalisokból, hogy kerül a véráramba, hol raktározódik, de arra sem tudunk választ adni, hogy a neuroszekréciós granulumokból hogy ürülnek ki a hormonok és mi lesz a hordozó anyagok sorsa.

Patkós orrú denevér: látóideg feletti mag
Fénymikroszkópia

A patkós orrú denevér látóideg feletti magva (nucleus supraopticus) a hipotalamusznak egyik nagysejtes neuroszekréciós magva. A látóidegek kereszteződése (chiasma nervorum opticorum) felett helyezkedik el. Ettől felfelé a harmadik agykamra-oldalfala alatt van a másik nagysejtű neuroszekréciós mag a nucleus paraventricularis. A két nagysejtű magnak a neuritjei a hipofízis nyelébe leszálló idegrostköteget (tractus hypophyseos) alkotják. Az egyesülő két rostköteg közül a vastagabb a nucleus supraopticusból jövő ág (tractus supraoptico-hypophyseos) a gyengébb, a nucleus paraventricularisból eredő ág (tractus paraventricularis).

A patkós orrú denevér látóideg feletti magva hosszúkás test, amely nagy terjedelmű neuroszekréciós sejtekből áll. A sejtek hosszúkásak. Magvuk kerekded, Gömöri-Bargmann-festés után üresnek látszik. A kromatin apró szemecskék formájában jelentkezik. Ezek között sok az üres terület. A sejt egyik elvékonyodó részéből indul ki a vastag neurit, amely tele van neuroszekréciós granulumokkal. A neuritek egymás mellé rendeződnek, az axonokban jól látszanak a neuroszekréciós granulumok. A következő kép arról is meggyőz, hogy a látóideg feletti magban milyen nagy mennyiségben termelődik a neuroszekréciós anyag (18. ábra).

Különleges képződmények a neuroszekréciós rostrendszerek között látható kerekded testek, amelyek feltűnő nagyságuk miatt az axoplazmán kívül maradnak. Cseppszerű képződmények, chromhematoxylinnel erősen festődnek. Szerkezetük és a neuroszekréciós idegrostokhoz való viszonyuk elektronmikroszkópos vizsgálódásokat igényel.

Patkós orrú denevér: paraventricularis mag
Fénymikroszkópia

A patkós orrú denevér *(Rhinolophus ferrum equinum)* paraventricularis magvai (nucleus paraventricularis) a harmadik agykamrának (ventriculus tertius) az oldalfala alatt helyezkednek el. Hosszúkás nagyjából elipszis alakú testek. Szorosan egybekapcsolódnak a környező szövetekkel. Hosszanti tengelyük nagyjából párhuzamos a kamra hossztengelyével. Sejtjeik közepes nagyságú unipoláris testek. Nyúlványuk a kamra üregétől elvezető irányban húzódik. A sejtek annyira közel vannak egymáshoz, hogy fénymikroszkóp alatt a kontaktusra is komolyan lehet gondolni (19. ábra). Ugyanez a helyzet a hajszálerek és a sejtek kapcsolatában is. Sőt vékony és jól festett metszeteken olyan képekben sincsen hiány, amelyek amellett szólnak, hogy a hajszálér magában a citoplazmában helyezkedik el. Erre mutatnak azok a sejtek, amelyek vastag, apró neuroszekréciós granulum gyűrűből állanak, amelynek lumenéből kiütközik a floxinnal élesen festődő hajszálér (20. ábra). Ezen természetesen nem lepődünk meg nagyon, mivel tudomásunk van arról, hogy a *Chauna argus* nevezetű csontos halnak minden neuroszekréciós sejtjét kapilláris fonadék veszi körül. A kapillárisok belépnek a sejt citoplazmájába, a nagy sejttestet darabokra tagolják és szorosan kapcsolódnak a maghoz.

A citoplasmában Gömöri-Bargmann-féle festés után láthatók az apró, egyforma neuroszekréciós granulumok, amelyek az axonokban sorba rendeződnek, és úgy haladnak a neurohipofízis felé. Az axonok mint a neuroszekrétumot tartalmazó axonok esetében mindenütt pályába rendeződnek. Máskor hatalmas tömegekben csoportosulnak a neuroszekréciós sejtek körül (21. ábra).

A neuroszekréciós granulumok keletkezése

Sokat vitatott és ma sem eldöntött kérdés, hogy hol és hogyan keletkeznek a neuroszekrétum granulumok, vagy ahogy mondani szokták, hogy és hol „születnek" ezek a sajátságos és az egész szervezet életére döntő befolyást gyakorló testecskék. A kérdés eldöntésén sokat fáradoztak, de meg kell vallanunk, hogy eddig még senkinek sem sikerült olyan választ adni, amely a maga egészében megnyugtató, illetőleg elfogadható volna.

Azok, akik a neuroszekréciós granulumokat fénymikroszkóppal vizsgálták, a keletkezés módját és menetét igen különböző formában vélték megtalálni. Kurotsu és Kondo (1941) a *Bufo vulgaris japonicus* hipotalamuszának a neuroszekréciós sejtjein végzett vizsgálataik alapján azt állítják, hogy a neuroszekrétum granulumok mitokondriumokból származnak.

Romieu, Stahl és Cotta (1953), akik a vizsgálataikat a macska hipotalamuszának a neuroszekréciós sejtjein végezték, úgy találták, hogy a neuroszekrétum granulumok termelésében a Golgi apparátusnak van fontos szerepe.

SCHARRER E. és BROWN (1961) szerint a neuroszekréciós granulumok a földi giliszta garat feletti dúcában a Golgi-féle készülékben képződnek. Ők a Golgi komplex egyes ciszternáiban elektron dense anyagot és a ciszternák végében elektron dense testecskéket találtak.

BERTA SCHARRER (1963), aki a *Leucophea maderae* corpus cardiacumát vizsgálta, arra a következtetésre jutott, miszerint nemigen lehet kétségbe vonni azt, hogy a Golgi apparátusnak része van a neuroszekréciós granulumok termelésében.

NORMANN (1965), aki a *Calliphora corpus* cardiacumának a szerkezetét tanulmányozta a Golgi komplex ciszternáiban homogén dense anyagot látott, amely azonos a neuroszekréciós granulumokkal. Szerinte a granulumok a Golgi apparátusból erednek, éspedig vagy a széléből, vagy a közepéből. De megjegyzi, hogy a neuroszekréciós granulumoknak a kiformálásában más sejtorganellumnak is része lehet.

HAGADORN, BERN, NISHIOKA (1963), akik egy rhynhobdelloid piócának *(Theromyson rude)* az agyán dolgoztak, megengedik, hogy a Golgi komplexnek szerepe van a neuroszekréciós granulumok kimunkálásában, de azt gondolják, hogy az endoplazmatikus retikulumnak is része van a granulumok termelésében.

Szokatlannak és különlegesnek látszik ORTMAN állítása, amely szerint neuroszekréciós granulumok a sejtmagból származnak. Meg kell vallanom, hogy magam a neuroszekréciós granulumok fejlődésének ezt az útját nem tartom kizártnak, sőt az *Agrolimax agrestis* agyából impregnált metszeteimen bizonyítva látom, hogy az elementáris granulumok képződésének erre az útjára komolyan lehet gondolni. Impregnált készítményeim amellett szólnak, hogy a granulumok fejlődése során a sejtmagban először megjelennek a hosszú, vékony kromoszómák, majd fragmentálódnak és a fragmentumok kerekded granulumokká alakulnak. Végezetül a nagy idegsejtek magva a maga egészében eltűnik, illetőleg granulumokká alakul át, amelyek a mag helyét teljesen kitöltik.

Mi a csíkbogár *(Dytiscus marginalis)* medialis neuroszekréciós sejtjeinek elektronmikroszkópos vizsgálata során olyan képek birokába jutottunk, amelyek arra utalnak, hogy a Golgi komplex vezikulum rendszere genetikai kapcsolatban áll a neuroszekréciós granulumokkal (ÁBRAHÁM 1969). De mivel felvételeinken az endoplazmatikus retikulum ciszternáiban is, hol magánosan, hol többesével neuroszekréciós granulumokat látunk, azt kell mondanunk, hogy a granulumoknak a termelését nem lehet egyetlen citoplazmatikus organellum működésének tulajdonítani. Mi úgy gondoljuk, hogy a neuroszekrétum granulumoknak a termelésében mind a Golgi komplexumnak, mind az endoplazmatikus retikulumnak egyformán része lehet. Sőt az is megengedhetőnek látszik, hogy a megnagyobbodott és strukturálisan transzformálódó mitokondriumoknak is része van a neuroszekréciós granulumok kialakításában.

A neuroszekréciós granulumok vándorlása

A neuroszekréciós granulumokkal kapcsolatosan egy másik probléma is felmerül, amely semmivel sem könnyebb, mint a „születés" és ez a vándorlás. Napjainkban általánosnak mondható az a felfogás, amelynek értelmében a neuroszekréciós granulumok a neurit eredési helyén hagyják el a karyoplazmát. Ezzel szemben a mi képeink, amelyeket a csíkbogár agyából készült festett és impregnált metszetekről fénymikroszkóppal kaptunk, ahogy ezt fentebb már szóvá tettük, azt mutatják, hogy a granulumok több úton hagyják el a neuron testét. Egyik a sejthártyán ad hoc keletkező ruptúra, a másik a neurit s a harmadik a pályák kereszteződési helye, a negyedik az axonterminális. Mind a négy út világos, Gömöri-Bargmann szerint festett készítményeken könnyen felismerhető. Ezek ismeretében a neuroszekrétum intracerebralis szerepe is könnyűszerrel értelmezhető. Van azonban egy homályos pont és ez az, hogy a neuroszekréciós granulumok a neuriteken csúsznak-e tova, vagy az axoplazmában haladnak végszerveik felé. Festett preparátumaink amellett látszanak bizonyságot szolgáltatni, hogy a szekrétum szemecskék egy része a neuritben halad a corpus cardiacumban és a corpus allatumban levő axonterminálisok felé. Ezzel szemben impregnált készítményeink azt mutatják, hogy a granulumok útja a neuritek között vezet a corpus cardiacum és a corpus allatum felé (Ábrahám 1966). Az ellentétet elektronmikroszkópos képeink eliminálták. Ezek azt mutatják, hogy a neuroszekréciós granulumok útja az axoplazmában van (22. ábra). De ha a dolog így áll, akkor találjuk szemben magunkat egy rendkívül nehéz kérdéssel, nevezetesen azzal, hogy mi lesz a sorsa a neuroszekréciós granulumoknak az axonterminálisban. Átlépnek-e az axonterminális membránján vagy szinaptikusan kapcsolódnak a raktározó, végszervek sejtjeihez. A problémával régóta viaskodnak az ügy iránt érdeklődők, de az eredmény egy cseppet sem látszik elfogadhatónak.

Régen azt tartották, hogy a neuroszekréciós rost nem szinaptizál, hanem egy bunkóban végződik, amely a végrehajtó szervben egy hajszálér falához záródik. Ezzel szemben az elektronmikroszkópos vizsgálatok kiderítették, hogy az epitheltestek, amelyek endokrin funkciót végeznek (corpora allata, hypophysis pars intermedia) szinaptikus kapcsolatban állanak a neuroszekréciós axonterminálisokkal. Melyik felfogás felel meg a valóságos viszonyoknak, azt nehéz megállapítani. Ezért mi, mivel a reális helyzetet szeretnők tudni, mind a kettőt bonckés alá vesszük.

Ha az elsőt nézzük, önként felvetődik a kérdés, mi lesz azokkal a neuroszekréciós granulumokkal, amelyek abban a bizonyos bunkóban vannak. Tegyük fel ugyanis, hogy a granulum anyagában levő hormon diluálódik és exocitozis formájában átmegy az axolemmán, de mi lesz a granulum anyagával és ha ez megmarad, ahogy mondják akkor, mi lesz a következő granulu-

mokkal, amelyek később érkeznek a bunkóba. De a szinaptikus kapcsolatot is nehéz megmagyarázni, ha arra szeretnénk választ kapni, hogy milyen kapcsolatban állanak egymással a neuroszekréciós granulumok és a szinaptikus vezikulumok. Mind a kettő állandóan termelődik és mind a kettő állandóan elhasználódik. A neuroszekréciós granulumból hormon ürül az axonterminálisba, a szinaptikus vezikulumból acetilkolin távozik a posztszinaptikus membránra. Mi történik a neuroszekréciós granulummal, amely hormonját leadta és milyen a kapcsolat a neuroszekréciós granulumok és a szinaptikus vezikulumok között. Sajnos mind a két felelettel adósoknak kell maradnunk.

Bár itt is vannak nehézségek és hozzá elég nagyok, könnyebben tudunk választ adni arra a kérdésre, hogy mi történik azokkal a neuroszekréciós granulumokkal, amelyek ahogy ezt feltételezik a sejtből vagy az axonterminálisból, egyenesen a hajszáledényekbe kerülnek. A kérdés inkább az agyi neuroszekréciós magvakkal kapcsolatosan vetődik fel, amelyek a bennük termelődő hormont a hipofízis hátsó lebenyébe juttatják. Azok, akik ennek a kérdésnek a megoldásán fáradoztak, arra gondolnak, hogy a hajszálereken, amelyek a legbelsőségesebb kontaktusban állanak a szecernáló sejtekkel, nyílások vannak, amelyeken keresztül a neuroszekréciós granulumok az ér lumenébe lépnek. BARGMANN és társai granulumokat találtak a hipofízis hajszálereiben, ami amellett szól, hogy ezek a sejtekből a hajszáledények falán keresztül kerültek ide. Igaz, hogy nehéz elképzelni, de SCHARRER B. (1954), továbbá GREEN (1966) is láttak granulumokat a véredények lumenében. Vannak, akik mint HAMMERSEN (1966) azt tartják, hogy a pórusok, amelyeken a granulumok átlépnek a kapilláris falán nem állandók, hanem csak átmeneti struktúrák. Ugyanezt vallja WOLF és MARRKER (1966). Ezekkel a megállapításokkal kapcsolatosan HOFERNEK (1968) az a véleménye, hogy elementáris granulumok axonterminálison kívül csak kivételesen találhatók és ha igen, ennek a magyarázata kétséges.

BERN és társai (1965) az Albula és Tilapia nevezetű csontos hal caudalis neuroszekréciós rendszerében találtak bizonyítékot arra, hogy a neuroszekretórikus granulumok átlépnek az axolemmán. A neuroszekréciós granulumoknak a hajszálér falán való átlépési lehetősége mellett szólnak DE BRUINE P. H. és SONIA MICHELSON (1981) vizsgálatai, akik úgy találták, hogy az érett vérsejteknek a csontvelő perifériás cirkulációjába való szelektív átlépése transzcelluláris folyamat. Az érett vérsejtek a myeloid sinust bélelő endothel sejteknek a citoplazmáján egy úgynevezett vándorló pórust készítenek, amely záródik, ha a vérsejt az intravascularis térbe került.

A neuroszekréciós granulumok vándorlásában fontos szerepet játszanak a corpus cardiacumok, a corpus allatumok és a caudalis neuroszekréciós rendszer. A corpus cardiacumok hosszúkás testek, amelyek az agy hátulsó szakaszához kapcsolódnak, rendesen a hátedény vége előtt. LIONETT fedezte fel a *Cottus cottus*ban 1762-ben. Az ektodermális előbél kitűrődéseiként jelennek

meg. Eredetileg dúcok, amelyek egy ideig együtt fejlődnek a ganglion hypocerebraléval. Még a kifejlett corpus cardiacumban is vannak ganglion sejtek.

A corpus cardiacum két sejtcsoportból áll. Az egyikbe tartoznak a parenchima sejtek, a másikba az intersticialis sejtek. A parenchima sejtek termelik a neuroszekréciós anyagot, amely először a Golgi zóna területén jelenik meg a pericarionban elektronopák granulumok formájában. A granulumok később elvesztik elektron denzitásukat, majd szerkezetük megváltozása után a sejtnyúlványokban csoportosulnak.

A parenchima sejtek neuroglanduláris elemek, amelyek amellett, hogy szecretórikus zárványokat tartalmaznak, idegsejt jellegzetességüket az axonszerű nyúlványt a neurotubulusokat és a hüvelyeket is megtartják. Az utóbbiakat a második csoportba tartozó sejtek az intersticialis sejtek szolgáltatják. Ezeknek a sejteknek nincsen glandularis szerkezete. Ezek glya elemek módjára járják át az egész szervet és a parenchyma sejtnek nemcsak a pericarionját, hanem a nyúlványát és beburkolják.

A nyúlványok két félék, rövidek és hosszúak. A rövidek a parenchyma sejtek nyúlványai, a hosszúak sejttestei a központi idegrendszerben vannak. A hosszú nyúlványokban levő elektron opak neuroszekréciós granulumok, extrinsic granulumok. Azok a neuroszekréciós granulumok, amelyek a rövid nyúlványokban vannak intrinsic granulumok. A corpus cardiacum raktározó és kiürítő szerve a benne levő extrinsic és intrinsic neuroszekréciós granulumoknak.

A corpus allatumok ektodermális eredetű szervek. Az embrionális fejlődés során betűrődésekként jelennek meg a maxilláris és mandibuláris szelvény határán. Később a coeloma zsákhoz tapadva végső helyükre a corpus cardiacum mögé vándorolnak. Az embrionális, a praepupális, illetőleg a praeimaginális stádiumig fokozatosan nőnek. Az imágónál a peterakás idején már erősen fejlettek. A fokozódó szekréció a szervek megnagyobbodásával jár.

A corpus allatumban termelődő hormon hatása sokirányú. Legfontosabb hatása abban áll, hogy befolyásolja a metamorfózist. Ez abban nyilvánul meg, hogy az átalakulást késlelteti és a szerveket fiatal állapotban tartja.

Tovább specializálódott a neuroszekrétum raktározó és kiürítő készülék a caudalis neuroszekréciós rendszerben. Ebben a neuroszekretumot termelő idegsejtek egy körülírt központot alkotnak. Ettől bizonyos távolságban olyan vérerekben gazdag kiürítő helyet lehet látni, amely neuroszekréciós axonokkal áll összeköttetésben. Ezek transzportálják a neuroszekréciós anyagot.

Összefoglalás

A neuroszekréciós sejtek idegsejtek, amelyek váladékot termelnek. A váladék a neuroszekrétum, amely granulumokból áll. Eredetileg homogén anyag, amely a citoplazmában keletkezik és a neurit kezdő szakaszában frag-

mentálódik. A granulumok egyesek szerint mitokondriumokból keletkeznek, mások szerint a Golgi-féle testben alakulnak ki, de az irodalomban arról is szó van, hogy a termelődési folyamatban az endoplazmatikus retikulumoknak is szerepe van. Vizsgálataink amellett szólnak, hogy a granulum fejlődésében mind a három organellumnak része lehet. A granulumok a neuritekben a raktározó vagy a végrehajtó szervekbe jutnak. A kapcsolat, amely a granulumot tartalmazó axonterminális és a raktározó, illetőleg végrehajtó sejtek között fennáll, az esetek egy részében a kontaktus, a másikban a szinapszis. Azok a granulumok, amelyek a hipotalamusz magvainak a neuroszekréciós sejtjeiben termelődnek a sejtekben levő vagy a magvakból kilépő neuritek útjába eső hajszálerekbe kerülnek. Ezekben jutnak a végrehajtó szervekbe, ahol felhasználódnak. Hogy ezeknek a granulumoknak a végrehajtó sejtekhez vezető útja a vér, azt igazolják megfigyeléseink, amelyek szerint a nukleusz paraventrikuláris neuroszekreciós sejtjeiben hajszáleret láttunk és az irodalmi adatok, amelyek szerint a hipofízis hajszálereiben neuroszekréciós granulumok vannak. Hogy ez az út járható, arról azok a vizsgálatok is tanúskodnak, amelyek szerint a csontvelőből érett vérsejtek lépnek át a hajszáledényekbe.

IRODALOM

ÁBRAHÁM, A.: Histological, histochemical and cytological investigations on the central nervous system of some insects. XI. Internat. Kongr. f. Entomol. (Wien) Verhandlungen I. 391. (1960).

ÁBRAHÁM, A.: Histological, histochemical and cytological examinations on the central nervous system of the swimming beetle (Dytiscus marginalis). Acta. Biol. Acad. Sci. Hung. Suppl. **4**, 35 (1962).

ÁBRAHÁM, A.: The structure of the interneuronal synapses in the visceral ganglion of Aplysia. Acta. Anat. Basel **54**, 260—264 (1963).

ÁBRAHÁM, A.: Histological and histochemical Studies on the brain of the water beetle (Dytiscus marginalis). Proc. of the XII-th Internat. Cong. of Entomol. London. **138**, 8—16 (1964)

ÁBRAHÁM, A.: The structure of the endocrine system in the central nervous system of the water beetle (Dytiscus marginalis) Acta Biol. Acad. Sci. Hung. Suppl. **6**, 31 (1964).

ÁBRAHÁM, A.: Histochemical investigations on the neurosecretory system of the swimming beetle (Dytiscus marginalis); II. Internat. Kongr. f. Histo- und Cytochemie. (Frankfurt-Main) **194**, 16—21 (1964).

ÁBRAHÁM, A.: Die Struktur der Synapsen in Ganglion viscerale von Aplysia California. Z. mikr. anat. Forsch. **73**, 45—59 (1965).

ÁBRAHÁM, A.: Neurosecretory activity in the brain of the water beetle. Acta Anatomica **658**, 434—446 (1965).

ÁBRAHÁM, A.: The influence of environmental factors on the neurosecretory activity of the water beetle Dytiscus marginalis. Revue Roumaine de Biologie. Ser. Zool. Cluj **2**, 25—33 (1966b).

ÁBRAHÁM, A.: Die Struktur der Gehirnzentren des Gelbrandkäfers Dytiscus marginalis. Z. mikr. anat. Forsch. **76**, 436—465 (1967a).

ÁBRAHÁM, A.: Electron microscope examinations on the brain of water beetle Dytiscus marginalis. Acta. Biol. Univ. Szeged **13**, 46—62 (1967b).

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

ÁBRAHÁM, A.: Structure of Synapses in the supraoesophageal Ganglion of the Water Beetle (Dytiscus marginalis) Z. mikrosk.-anat. Forsch. Leipzig. **90**, 226—238 (1976).

ARVY, L., GABE, M.: Particularités histophysiologiques des glandes endocrines céphaliques chez Tenebrio molitor L. C. R. Acad. Sci. (Paris) **237**, 844 (1953).

BARGMANN, W.: Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. Zschr. Zellforsch. **34,** (1949).
BARGMANN, W.: Das Zwischenhirn-Hypophysensystem. Springer Verlag. (1954).
BARGMANN, W.: Elektronmikroskopische Untersuchungen an der Neurohypophyse 2. International Symposium über Neurosecretion. Lund 1957. Springer, Verlag (1958).
BARGMANN, W., JACOB, K.: Über Neurosekretion im Zwischenhirn der Vögel. Z. Zellforsch. **36,** p. 556 (1952).
BARTON-BROWNE, L., L. F. DODSON, E. S. HODGSON and J. K. KIRÁLY: Adrenergic properties of the cockroach corpus cardiacum. Gen. comp. Endocr. **1,** 232—236 (1961).
CAMERON, M. L.: Secretion of an orthodiphenol in the corpus cardiacum of the insect. Nature (Lond.) **172,** 349 (1953).
CAMPBELL, E. R.: Ultrastructural studies of transmural migration of blood cells in the bone marrow of rats, mice and guinea pigs. Am. J. Anat. **135,** 521 (1972).
DAVEY, K. G.: The mode of action of the corpus cardiacum on the hindgut in Periplaneta americana. J. exp. Biol. **39,** 319—324 (1962).
DAY, M. F.: Neurosecretory cells in the ganglia of Lepidoptera, Nature **145,** 264 (1940).
DE BRUY, P. P. H.: Locomotion of blood cells in tissue cultures. Anat. Rec. **89,** 43 (1944).
DE BRUYN, P. P. H., MICHELSON S., THOMAS T. B.: The migration of blood cells of the bone marrow through the sinusoidal wall. J. Morphol. **133,** 417 (1971).
DE BRUYN, P. P. H., MICHELSON, S.: Changes at the cell surface during transmural blood cell passage in rat bone marrow. J. Cell. Biol. **53,** 76 (1979).
DE BRUYN, P. P. H., MICHELSON, S.: An Anonic Material at the Advancing Front of Blood Cells Entering the Bone Marrow Circulation. Blodd, Vol. **57,** No. 1 (1981).
DE ROBERTIS, E., and A. VAZ FERREIRA: Electron microscope study of the excretion of catechol-containing droplets in the adrenal medulla. Exp. Cell. Res. **12,** 568—574 (1957).
DUNCAN, D.: An electron microscope study of the neurohypophysis of a bird, Gallus domesticus. Anat. Rec. **125,** 457—471 (1956).
FRASER, A.: Neurosecretory cells in the brain of the larva of Lucilia caesar L. Nature Lond. **179,** 257—258 (1957).
FÜLLER, H. B.: Morphologische und experimentelle Untersuchungen über die neurosecretorischen Verhältnisse im Zentralnervensystem von Blattiden und Culiciden, Zool. Jb., Abt. Allg. Zool. Physiol. **69,** 223 (1960).
GAUPP, R., SCHARRER, E.: Die Zwischenhirnsekretion bei Mensch und Tier. Z. Neur. **153,** 327 (1935).
HAGADORN, I. R., H. A. BERN and R. S. NISHIOKA: The fine structure of the supraesophageal ganglion of the rhynchobdellid leech, Theromyzon rude, with special reference to neurosecretion. Z. Zellforsch. **58,** 714—758 (1963).
HANSTRÖM, B.: Neue Untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem der Crustaceen. I. U. Morph. u. Ökol. Tiere **23,** 80 (1931).
HANSTRÖM, B.: Über das Organ X, eine inkretorische Gehirndrüse der Crustaceen. Psychiatr. Bl. (holl) (Festbundel A. Kapper's) Jg. No **3/4,** 1. (1934).
HANSTRÖM, B.: Inkretorische Organe, Sinnesorgane und Nervensystem des Kopfes einiger niederer Insektenordungen. Kgl. Svensk. Vetensk. Handl. **18,** No. 8. 1. (1940).
HESS, A.: The fine structure of nerve cells and fibres, neuroglia and sheaths of the ganglion chain in the cockroach Peripleneta americana. J. biophys. biochem. Cytol. **4,** 731—742 (1958).
HOFER HELMUT H.: The Phenomenon of Neurosecretion. The Structure and Function of Nervous Tissue Geoffrey H. Bourne Verkes Regional Primate Research Center, Emory University Atlantia, Georgia Volume I. Structure (1968).
JOHNSON, B.: A histological study of neurosecretion in aphids. J. ins. Physiol. **9,** 727—739 (1963).
KIRSCHNER, E.: Untersuchungen über neurohormonale Faktoren bei Melolontha vulgaris. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **69,** 43—62 (1960).
KLOOT, W. G., van DER.: Neurosecretion in insects. Ann. Rev. Ent. **5,** 35—52 (1960).
KLUG, H.: Neurosekretion und Aktivitätsperiodik bei Carabiden. Naturwissenschaften **45,** 141—142 (1958).
KNOWLES, F. G. W.: The ultrastructure of a crustacean neurohaemal organ. Mem. Soc. Endocr. No. **12,** 71—97 (1962).
KONOK, I.: UV-besugárzással kezelt Tenebrio molitor L. (Coleoptera) lárvák agykomplexének hisztológiai vizsgálata. Ann. Inst. biol. (Tihany) Hung. Acad. Sci. **25,** 47—55 (1958).
KÖPF, H.: Über Neurosekretion bei Drosophila, I. Zur Topographie und Morphologie neurosekretorischer Zentren bei der Imago von Drosophila. Biol. Zbl. **76,** 28—42 (1957).

KUROTSU, T.: Über den Nucleus magnocellularis periventricularis bei Reptilien und Vögeln. Konikl. Akad. Wetensch. Amsterdam **38,** 784 (1935).
LEGHISSA, S.: Peculiari connectioni nervose nella catena ganglionari de Dixippus morosus. Arch. Zool. Ital. **30,** 289 (1942).
LERMA, de B.: Osservazioni sulla neurosecrezione in Hydrous piceus L. (Coleopteri). Pubbl. Staz. Napoli. Suppl. **24,** p. 56 (1954).
MEYER, G. F., u. O. PFLUGFELDER: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Corpora cardiaca von Carausius morosus. Br. Z. Zellforsch. **48,** 556—564 (1958).
MUTO, M.: A scanning and transmission electron microscopic study on rat bone marrow sinuses and transmural migration of blood cells. Arch. Hist. Jap. 39—51 (1976).
NAYAR, K. K.: The neurosecretory system of the fruit fly Chaetodacus cucurbitae Coqu. I. Distribution and description of the neurosecretory cells in the adult fly. Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B. 40 (1954).
NICHOLSON, G. L.: Anionic sites of human erythrocyte membranes. J. Cell. Biol. **57,** 373 (1973).
NISHIITSUTSUJI-UWO, J.: Electronmicroscopic studies on the neurosecretory system in Lepidoptera. Z. Zellforsch. **54,** 613—630. (1961).
NOVÁK, V. J. A.: Insektenhormone, Verl. der Tschechoslow. Akad. der. Wiss. Prague (1959).
PFLUGFELDER, I.: Entwicklungsphysiologie der Insekten. Akad. Verlagsges. Geest-Portig, Leipzig (1958).
PIPA, R. L.: Studies on the hexapod nervous system. IV. A cytological and cytochemical study of neurons and their inclusions in the brain of a cockroach, Periplaneta americana L., Biol. Bull. **121,** 521 (1961).
POPPI, U.: Structure a funzione delle cellule del tuber cinereum. Riv. Pat. nerv. **36,** 397 (1930).
REHM, M.: Morphologische und histochemische Untersuchungen an neurosekretorischen Zellen von Schmetterlingen, Zeitschr, f. Zellforsch. **42,** 19 (1955).
SAKSENA, D. N.: The Hypothalamo-Neurohypophysial System in Indian Fresh-Water Goby, Glossogobius giuris (Ham.) Z. mikrosk. Anat. Forsch, Leipzig **93,** 6 1137—1158 (1979).
SANZ IBANEZ, J.: Contribution a la connaissance de la glande diencéphalique, Trav. Labor. Rech. Biol. Univ. Madrid **30,** 221 (1935).
SCHARRER, E.: Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen I. Untersuchungen über des Zwischenhirn der Firsche. Z. vergl. Physiol. **7,** 1 (1928).
SCHARRER, E.: Über sekretorisch tätige Zellen im Thalamus von Fundulus heteroclitus L. II. Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische. Z. vergl. Physiol. **11,** 767 (1930).
SCHARRER, B.: Über »Drüsen-Nervenzellen« im Gehirn von Nereis virens Sars. Zool. Anz. **113,** 299 (1936).
SCHARRER, B.: Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. Naturwiss. **25,** 131 (1937).
SCHARRER, B.: Neurosecretion II. Neurosecretory cells in the central nervous system of cockroaches. J. Comp. Neur. **74,** 93 (1941).
SCHARRER, E., SCHARRER B.: Neurosekretion, in W. Möllendorf, W. Bargmann, Handbuch der mikr. Anatomie des Menschen, 6. Bd., 5. Teil 953. Springer-Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg. (1954).
SCHARRER, E. and S. BROWN: Neurosecretion, XII. The formation of neurosecretory granules in the earthworm, Lumbricus teresstris L. Z. Zellforsch. **54,** 530—540 (1961).
SCHARRER, B.: The neurosecretory system of Leucophaea maderae and its role in neuroendocrine integration. Gen. Comp. Endocr. **2,** 30 (1962).
SCHARRER, B.: Ultrastructural proporties of extrinsic and intrinsic secretory granules within the corpus cardiacum of Leucophaea maderae. Amer. Zoologist **2,** 555 (1962).
SPEIDEL, C. C.: Further comparative studies in other fishes of cells that are homologous to the large irregular glandular cells in the spinal cord of the skates. J. comp. Neur. **34,** 303 (1922).
TOLZE, R.: Über Neurosekretion im Vogelhirn. Diss. Med. Fakultät Kiel (1951).
TOMSEN, E.: Functional significance of the neurosecretory brain cells and the corpus cardiacum in the female blow-fly, Calliphora erythrocephala Meig. J. exp. Biol. **29,** 137—72 (1952).
THOMSEN, M.: Observations on the cytology of neurosecretion in various insects (Dipt. Hymenopt.). Pubbl. Staz. Zool. Napoli **24,** 46 (1954).
TRUJILLO-CENÓZ: The fine structure of a special type of nerve fiber found in the ganglia of Armadillidum vulgare. Crustaces, Isopoda, J. biophys. biochem. Cytol. **7,** 185—186 (1960).
TRUJILLO-CENÓZ: Some aspects of the structural organization of the Arthoropoda ganglia. Z. Zellforsch. **56,** 649—682 (1962).

VOGT, M.: Zur hormonalen Bedeutung des Drosophila Gehirnes und seiner hormonal bedingten imaginalen Entwicklung, Naturwiss, **30,** 470 (1942).
VEYER, F.: Über drüsenartige Nervenzellen im Gehirn der Honigbiene, Apis mellifica L. Zool. Anz. **112,** 137 (1935).
WILLEY, R. B. and G. B. CHAPMAN: The ultrastructure of certain components of the corpora cardiaca in orthopteroid insects. J. Ultrastruct. Res. **4,** 1—4 (1960).
WINGSTRAND, K. G.: The structure and development of the avian pituitary. Lund. Gleerup. (1951).

MEMBRÁNFEHÉRJÉK ROTÁCIÓS ÉS LATERÁLIS MOBILITÁSA

TRÓN LAJOS ÉS DAMJANOVICH SÁNDOR

DOTE Biofizikai Intézete, Debrecen

A sejteket határoló felületeik izolálják a környezettől, de ugyanakkor a sejtmembránon keresztül minden sejt érintkezik és kapcsolatban áll a környezetével. A sejt és a külvilág közötti anyagcsere biztosítása a sejtmembránnak csak egyik funkciója. Az extracelluláris ingerek szintén a plazma membrán közvetítésével érik a sejteket. A sejtfelületen, tehát a citoplazma membránon át realizálódik a sejt növekedésének, osztódásának, differenciálódásának és fejlődésének, a külvilággal való kommunikációjának szabályozása. Ezen folyamatokban, bár kétségkívül számos egyéb tényező is közrejátszik, a membránnak izoláló és egyszersmind információ, és anyagcsere, közvetítő szerepénél fogva központi jelentősége van. Ma már elfogadottnak tekinthető az a nézet, hogy a membránok közvetve vagy közvetlenül szinte minden sejtszintű folyamatban elvitathatatlan jelentőséggel bírnak. A felsorolt tények alapján teljesen indokoltnak tűnik az a törekvés, hogy a membránok összetételével, szintézisével, struktúrájával, különböző komponenseinek sajátosságaival kapcsolatos kérdésekre mind tökéletesebb és teljesebb választ nyerjenek a kutatók.

A folyékony mozaik membránmodell

A sejtmembrán különböző strukturális és funkcionális sajátságait leíró modellek kritikai áttekintésére nem vállalkozhatunk, csupán a jelenleg legáltalánosabban elfogadott SINGER és NICOLSON folyékony mozaik membrán modell (41, 43) néhány vonására utalunk. A membrán többé-kevésbé egy orientált kettős lipidrétegnek képzelhető el, amelynek nagy hányada foszfolipid, ill. szfingolipid és szterol. Kísérleti adatok szerint 37 °C-on a foszfolipidek túlnyomó hányada „folyékony" állapotban van. A foszfolipid molekulák úgy orientáltak, hogy a hidrofób szénhidrogén láncok a kettősréteg belseje felé mutatnak. A hidrofil felületi rétegekhez fehérje molekulák kapcsolódnak (ekto- és endoproteinek), ezenkívül előfordulnak ún. transzmembrán integrális fehérjék, amelyek a membrán egész vastagságát átérik. Ezek stabilizálása „trimodális", a kettős rétegen belül hidrofób, a felületeken pedig hidrofil kölcsönhatások révén biztosított. A citoplazma membránok fehérje tartalma eredettől függően széles határok (20—75%) között váltakozik (6, 31). A membránfehérjék egy része

speciális lipid és szénhidrát molekulákkal lehet komplexben (lipo- és glikoproteinek). Az integrális bi- és trimodális glikoproteineknek, valamint ezek komplexeinek a membránhoz viszonyított elhelyezkedése olyan, hogy azok nem vándorolnak az egyik membrán felszíntől a másikig és vissza, azaz nem rendelkeznek transzverzális mozgékonysággal. Hasonlóan, a glikolipidekre sem jellemző a transzmembrán mobilitás. (Ezzel ellentétben a foszfolipidek, bár igen kicsiny sebességgel, néha transzmembrán rotációra — „flip-flop" — képesek (22). Az említett fehérjék, gliko- és lipoproteinek speciális funkciókat láthatnak el (pl. receptorok vagy antigének, esetleg meghatározott enzimaktivitásuk van).

Az integrális és perifériás membránkomponensek (fehérjék, fehérjekomplexek, gliko- és lipoproteinek) a membránon belül nincsenek mereven rögzítve, hanem egyre több kísérleti adat szerint rotációs és laterális mozgékonysággal rendelkeznek (l. pl. 4, 16, 42, 43). Bár ezek a mozgások, ill. azok sebességét jellemző diffúziós állandók értéke aránylag széles tartományba esik, mind a rotációs, mind a kétdimenziós membránban való laterális diffúzió erősen gátolt és távol áll a megfelelő szabad diffúziós mozgások sebességétől (32).

A diffúziós mozgások gátolt volta számos tényező eredménye lehet. Először is ezek a mozgások a híg vizes oldatok cP nagyságú viszkozitásával szemben Poise nagyságrendbe eső viszkozitású közegben játszódnak le. A membrán lipidek legnagyobb részéről feltételezik, hogy azok szabadon keverednek, de bizonyos lipid-lipid kölcsönhatások azt eredményezik, hogy az alapvetően folyadék lipid részben tartósan kialakulhatnak olyan „szigetek", amelyeknek lipid összetétele jelentősen eltér az átlagos összetételtől. A membrán-lipidek aszimmetriája a kettős réteg két felének egymástól eltérő összetételében is megnyilvánulhat (7). A membrán komponensek horizontális kölcsönhatásai révén planáris asszociációk alakulhatnak ki (34). Bizonyos membránkomponensek ki lehetnek zárva specifikus lipid régiókból. Ha egy membránkomponens nem juthat be akár a folyékony, akár a szilárd lipid régiókba, ez az illető species látszólag gátolt laterális diffúzióját eredményezi. A kettősréteg külső- és belsőfelületén kialakulhatnak olyan hálószerű fehérje struktúrák, amelyek szintén akadályozhatják a laterális mozgékonyságot (32, 44). A citoszkeleton rendszer (mikro- és vastag filamentumok, valamint mikrotubulusok) szintén korlátozhatja a diffúziós mozgások sebességét (49, 51). A néha több μm hosszúságú citoszkeleton kötegek bizonyos membránkomponenseket kihorgonyozhatnak. Ez a diffúziót akadályozó faktor, ill. annak hatása alacsony hőmérsékleten, ill. magas Ca^{2+} koncentráció mellett csökken, mert ilyen feltételek mellett a mikrotubulusokat alkotó tubulin depolimerizálódik. Alkaloidákkal (colchicin, colcimid, vinblastine sulfat) a mikrotubulus rendszert szétroncsolva a sejtfelszíni jelenségek erősen befolyásolhatók (2).

Membrándinamikai vizsgálatok és kísérletes módszerek

A fentebb részletezett diffúziós mozgások a membrándinamikának csak egyetlen aspektusát jelentik. A membrándinamikával foglalkozó kutatásokat JOVIN (23) alábbi módon csoportosította:

1. fluiditás vagy mikroviszkozitás vizsgálatok
2. strukturális heterogenitás vizsgálatok (régiók, különböző aszimmetriák)
3. mobilitás vizsgálatok (laterális, rotációs és transzverzális diffúzió)
4. receptor szerveződés- és funkcióvizsgálatok
5. transzmembrán fluxus vizsgálatok.

Fenti jelenségek olyan molekuláris történéseket foglalnak magukba, mint különböző kötődési, aggregációs és fúziós reakciók, elektrokémiai diffúzió, Brown-mozgás, konformációs átmenetek, katalízis stb. Mindezek különböző környezeti faktorok hatása alatt állnak (ionösszetétel, hőmérséklet, nyomás, pH), továbbá a membrán külső és belső felszínére lokalizálható specifikus kölcsönhatásoktól függenek (pl. hormonok és egyéb ligandoknak receptorokhoz való kötődése, valamint a citoszkeleton rendszer működése). Mindezekből következik, hogy a membrán dinamikai vizsgálatok céljára számos biofizikai, biokémiai és biológiai technikát fejlesztettek ki, ill. adaptáltak.

Molekuláris mozgások, ill. a strukturális rendezettség és annak időben történő változása vizsgálható többek között a következő kísérletes módszerekkel:

mágneses rezonancia spektroszkópia (ESR, NMR, szaturációs transzfer ESR, szaturációs transzfer NMR);
ultrahang és infra abszorpciós spektroszkópia;
emissziós spektroszkópia;
fényabszorpciós spektroszkópia; (dichroizmus mérések); elektroforézis (membrán fragmentumok, receptorok, sejteken végzett elektroforézis).

A molekuláris szerveződés, ill. annak időben változásai a következő kísérletes technikákkal vizsgálhatók:

röntgen és neutron szórás
rugalmas és rugalmatlan (rezonancia Raman) fényszórás, mikroszkópos (fény-, fluoreszcenciás-, elektronmikroszkópos) technika,
kémiai kinetikai vizsgálatok (stopped-flow, T-jump, P-jump),
kémiai és biológiai módszerek (kémiai módosítás, rekonstitúciós vizsgálatok, fúziós vizsgálatok, növekedés- és differenciálódás vizsgálatok, katalitikus aktivitás mérések).

Természetesen a felsorolt módszerek mindegyike meghatározott időfelbontással jellemezhető és egy-egy konkrét dinamikai vizsgálat céljára való al-

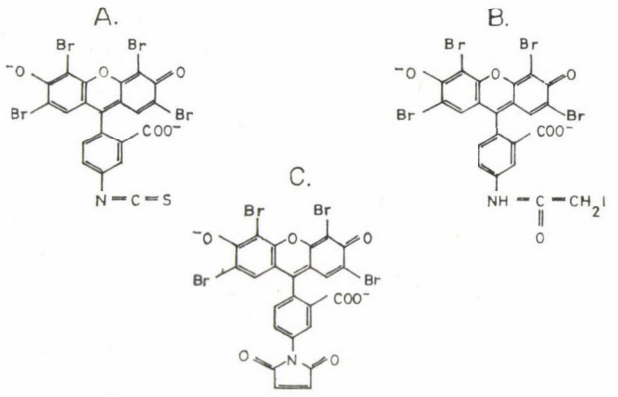
kalmazhatósága attól függ, hogy a vizsgált jelenség milyen időskálán játszódik le.

A membrándinamikai vizsgálatok szerteágazó volta, valamint a rendelkezésre álló igen sok kísérletes technika miatt a továbbiakban kizárólag a membránfehérjék mobilitásával kívánunk foglalkozni, egyidejűleg az alkalmazott technikákat a fényemissziós, fényabszorbciós és fénymikroszkópos módszerekre kívánjuk korlátozni.

Tranziens abszorpciók mérése

Vizes oldatban levő makromolekulák rotációs Brown-mozgásának vizsgálatára aránylag hosszú idő óta sikeresen alkalmazzák a fluoreszcencia depolarizációs méréseket. A módszer lényege a fotoszelekció, amelynek során a síkban poláros gerjesztő fény a vizsgált makromolekulák kezdeti véletlenszerűen orientált, egyenletes eloszlásából a gerjesztett molekuláknak egy orientált alpopulációját választja ki. Ez azzal kapcsolatos, hogy az abszorpció során preferenciálisan gerjesztődnek azok az egyedek, amelyeknek az abszorpciós átmeneti dipolmomentuma a beeső fény elektromos vektorával párhuzamos, vagy azzal kis szöget zár be. A gerjesztett molekuláktól származó fluoreszcencia emissziós jelek a fotoszelekció utáni anizotróp eloszlást tükrözik. A gerjesztéstől számított minél rövidebb időn belül következik be a fluoreszcens legerjesztődés, a fluoreszcenciás fény annál magasabb polarizációval jellemezhető. Ha az abszorpció (gerjesztés) és az emisszió között eltelt átlagos idő alatt a makromolekulák térbeli orientációjukat számottevő módon megváltoztathatják, az emittált fény polarizációja csökken. A depolarizációs folyamat steady-state mérések eredményeivel jellemezhető (54), vagy időben követhető nanoszekundumos technikával (52, 53). A módszer alkalmazhatóságának az a feltétele, hogy a fluoreszcenciás élettartamok és a fotoszelekció eredményezte rendezett állapot lecsengését jellemző rotációs relaxációs idők összemérhetők legyenek. Ez a 10^{-9} sec -10^{-7} sec-os fluoreszcenciás élettartamokat figyelembe véve azt jelenti, hogy a módszer nem alkalmazható olyan rendszerek esetén, amelyek rotációs relaxációs ideje 1 μsec körüli érték vagy annál hosszabb. Tekintettel arra, hogy a membránfehérjék rotációs Brown-mozgásukat nagy viszkozitású környezetben végzik, valamint, hogy a diffúziós mozgások sebességét számos, fentebb már említett tényező korlátozza, a fluoreszcenciás emisszió gyakorlatilag teljesen lecseng, még mielőtt szignifikáns depolarizáció lépne fel.

A lassú rotációs mozgások méréséhez olyan spektroszkópiai állapotokra van szükség, amelyek élettartama a μsec—msec időtartományba esik. Ilyen hosszú élettartamú állapotok a triplett állapotok. Az irodalomban közölt triplett próbák túlnyomórészt valamilyen reaktív csoporttal makromolekulákhoz kapcsolható eozin (tetrabróm fluoreszcein) származékok (1. ábra). A megfelelő, hosszú életű triplett állapottal rendelkező jelzők szintetizálása után

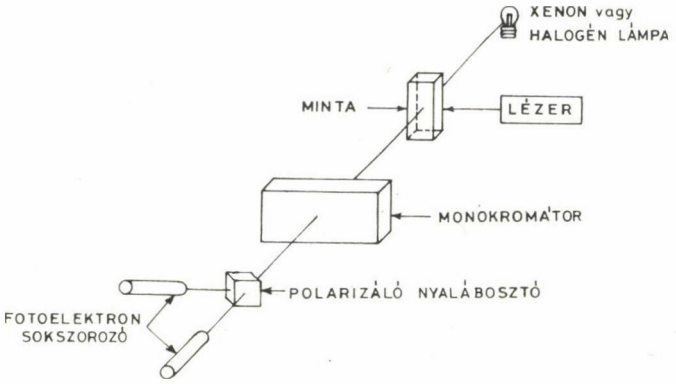


1. ábra. Lassú rotációs mérésekhez alkalmas triplett próbák. A) Eozin izotiocianát; B) Eozin jódacetamid; C) Eozin maleimid

lehetőség nyílt lassú rotációs diffúziós mozgásoknak a nanosecundumos depolarizációs mérésekkel teljesen analóg foszforeszcencia depolarizációs vizsgálatára.

Annak ellenére, hogy az elvi lehetőség adott, foszforeszcencia mérésekre kevés példát találunk az irodalomban. Vizsgálták ugyan ilyen módszerrel nagy viszkozitású oldószerekben kis szerves molekulák rotációs Brown-mozgását, sőt kifejlesztésre kerültek olyan érzékenységű berendezések, amelyek segítségével fehérjék foszforeszcenciáját szobahőmérsékleten is mérni lehet (39). Ennek ellenére biológiai mintákon foszforeszcencia depolarizációs vizsgálatokat eddig igen csekély számban végeztek a sugárzás nélküli átmenetek relatíve igen nagy valószínűsége miatt. A foszforeszcencia kvantumhatásfok a hőmérséklet drasztikus csökkentése árán ugyan lényeges mértékben fokozható, de a cseppfolyós levegő hőmérséklet-tartományban mért adatoknak az interpretálása nem egyszerű.

Fentiek miatt a triplett próbákkal végzett depolarizációs mérések túlnyomórészt abszorpcióváltozások detektálásán alapulnak. E mérések kivitelezésére elvileg két lehetőség van. Intenzív fényforrások alkalmazásával az első triplett állapotban jelentős populációt generálnak, és ezt követően vizsgálják az S_0 alap szingulett állapotból az S_1 állapotba vezető átmenettel kapcsolatos abszorpciócsökkenést („ground state depletion signal"). A másik lehetőség a T_1 állapot populációja által lehetségessé váló $T_1 \rightarrow T_2$ átmentek miatti abszorpció mérése. Tekintettel arra, hogy a T_1 állapotba optikai pumpálással jutnak a molekuláris rendszerek, polarizált fénnyel történő gerjesztés esetén a fotoszelekció miatt az abszorpcióváltozások polarizációs irány-függőek. A vertikálisan polarizált lézer-impulzusokkal történő gerjesztés szüneteiben (az impulzusok szélessége 1 μs körüli érték) egy külön fényforrás alkalmazásával mérik a minta abszorbciós sajátságait (9). Ez a fényforrás lehet Xe-lámpa vagy wolfram-halogén lámpa (2. ábra). A mérő fényt a mintán való áthaladás után két részre



2. ábra. Tranziens abszorpciók mérésére szolgáló mérőberendezés. Bővebb magyarázatot l. a szövegben

választják egy megfelelő optikai elem (polarising beam splitter) segítségével oly módon, hogy a fény vertikálisan, ill. horizontálisan polarizált komponensei térben szeparálva külön-külön detektálhatók legyenek. A mért intenzitásokból meghatározható a függőlegesen és vízszintesen polarizált fényre vonatkozó A_V, ill. A_H abszorpciók mértéke, valamint ezen mennyiségeknek a lézer impulzussal történő gerjesztés megszűntétől mért időtől való függése. Az $A_V(t)$ és $A_H(t)$ függvényekből az r(t) abszorpciós anizotrópia a következő módon nyerhető:

$$r(t) = \frac{A_V(t) - A_H(t)}{A_V(t) + 2A_H(t)}.$$

Az anizotrópia időbeli változása független a triplett állapotok élettartamától, s az r(t) függvény analizálása révén a makromolekulák rotációs Brown-mozgásának paraméterei meghatározhatók (21, 45).

Ahhoz, hogy egy membránfehérje rotációs Brown-mozgását tanulmányozni lehessen, biztosítani kell a szóbanforgó protein molekulák alkalmas triplett próbákkal való szelektív jelölését. Ez általában nem könnyű feladat és a megkívánt szelektivitás csak ritkán érhető el. Ilyen eset a humán eritrocita membrán eozin maleimiddel való jelölése (33), amely triplett próba több mint 80%-os valószínűséggel a Band 3 fehérjéhez kötődik. [FAIRBANKS és mtsai (17) a szolubilizált vörösvértest membránfehérjék gélektroforézise alapján a megfelelő csíkokat megszámozták, innen az elnevezés. A Band 3 fehérje a membránfehérjék mintegy 25%-át teszi ki, egy 90 000 dalton molekulasúlyú, transzport folyamatokban involvált fehérje.]

Az eozin izotiocianáttal jelölt Band 3 fehérjének (ez kevésbé specifikus jelölés mint az eozin maleimid jelölés, de a szelektivitás még mindig meghaladja a 80%-ot (10, 33, 35), a membrán normálisával párhuzamos tengely körüli for-

gását jellemző rotációs diffúziós együtthatójára meglepően alacsony érték (1000 s^{-1}) adódott. Meglepő, hogy az anizotrópia bomlás egy konstans értékre vezetett, más szóval még igen hosszú idők után sem állt be a teljes rendezetlenség. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy több, különböző rotációs diffúziós állandóval jellemezhető alpopuláció található a Band 3 molekulák között, és egy lassú depolarizációjú komponens kizárja a mért idők alatti teljes depolarizációt. A mérések nagyobb időfelbontással való megismétlése szerint az anizotrópia időbeli csökkenése két szimultán folyamatra enged következtetni. A gyorsabb, 200 μs körüli relaxációs idő a Band 3 fehérje dimérjeihez rendelhető, míg a 2—5 ms-os időállandóval jellemezhető folyamat egy nagy mértékben gátolt rotációs mozgásra utal.

Érdekes, hogy a cholesterol, amely tudvalevően növeli a lipid mikroviszkozitását (35), gyakorlatilag nem befolyásolja a Band 3 rotációs diffúzióját a 0,34—1,66 cholesterol/foszfolipid moláris koncentrációarány tartományban. Ez azt jelenti, hogy legalábbis bizonyos membránfehérjék rotációs mobilitása független a membrán fluiditástól. Ilyen esetekben feltételezhető, hogy a rotációs Brown-mozgás gátlásában nem a viszkozitás a meghatározó, hanem esetleg valamely, a fentiekben felsorolt egyéb gátló tényező (33).

Sapkaképződés („Capping")

A sejtfelületi immunglobulinok (Ig) eloszlása a legtöbb limfoid sejten megváltozik, ha a fiziológiáshoz közeli hőmérsékleten anti-Ig molekulák kötődnek hozzájuk. Elsőként Taylor és mtsai (46) figyelték meg, hogy ha anti-Ig-k kötődnek a B sejtek felületi Ig receptoraihoz, azok agrregálódnak. A folyamat során először a kezdeti mikroaggregátumok („cluster"-ek) nagyobb kiterjedésű foltokká („patch") alakulnak, végül a receptorok túlnyomó többsége a sejtfelület egy meghatározott helyére vándorol és ily módon egy ún. sapka („cap") alakul ki. A jelenséget több típusú ligand-receptor kölcsönhatás kiválthatja (46). Az Ig receptorokon kívül cap-képződést észleltek, többek között lektin (konkanavalin A, fitohemagglutinin) receptorok (29, 50), H-2 (13), C_3 (15), F_c (38), HLA (24): β_2 mikroglobulin (36), poli-L-lizin (47) stb. receptorok és a megfelelő ligandok kapcsolódását követően. A sapka általában a sejtfelületnek a Golgi-féle szervhez közeli helyén alakul ki (12), de a pontos hely a sejt és a receptor típusoktól függően változhat (14). Hasonlóan, sejt és receptor típusoktól függően bizonyos receptorok meghatározott körülmények között egymástól függetlenül produkálhatnak cap-képződést (27), ugyanakkor előfordulhat, hogy különböző receptorok, ún. co-capping jelenséget produkálva közös cap-kialakulást eredményezhetnek (14). A kialakult cap általában nem stabil, az anti-Ig-Ig komplex egy része pl. endocitózis révén a sejt belsejébe kerül, más része leválik a sejt felszínéről és az extracelluláris térbe jut (3, 46, 47). Ezután a felületi Ig-k újraszintetizálásához 6—20 órára van szükség (28).

Alacsony hőmérsékleten a patch és cap kialakulás általában egyaránt gátolt, valószínűleg az anyagcsere-folyamatok leállítása miatt. A citoszkeletonra ható citokalazin B esetenként semmilyen vagy elhanyagolható, máskor számottevő, de korántsem teljes gátlást eredményez. Mindmáig nem tisztázott, hogy a sejtekben fiziológiás körülmények között lejátszódó folyamatokban van-e a capping folyamatának valamilyen szerepe vagy jelentősége.

A cap-képződésben megnyilvánuló felületi receptor mozgékonyság aránylag kicsi és fluoreszcenciás mikroszkóp segítségével kényelmesen tanulmányozható (30). Novikoff hepatoma és normális patkány máj sejtek konkanavalin A receptorainak cap-képzését vizsgálták fluoreszcenciás (fluoreszcein izotiocianáttal jelölt) konkanavalin A segítségével. Megállapították, hogy Novikoff-sejtek esetén a cap kialakulásához 37 °C-on a lektin koncentrációtól függően 20—60 perc szükséges. A cap-képződés alacsony (3 °C) hőmérsékleten, valamint glutáraldehides fixálás után nem figyelhető meg. Ugyanakkor normális hepatocitákon sem 3 °C-on, sem 37 °C-on nem észleltek sapkakialakulást. Figyelembe véve, hogy a normális és transzformált sejtek alacsony konkanavalin A koncentrációk mellett egyaránt agglutinálhatók, arra következtettek, hogy — legalábbis ebben a konkrét esetben — a sejtagglutinálás és a konkanavalin A receptorok nagy távolságokra vonatkoztatott laterális mobilitása között nincs közvetlen kapcsolat. A lektin receptorok mozgékonyságának normális és malignus májsejtek esetén észlelt különbsége a transzformáció markeréül szolgálhat.

Fotodekompozíciót követő fluoreszcencia intenzitás regenerálódás („Fluorescence photobleaching recovery")

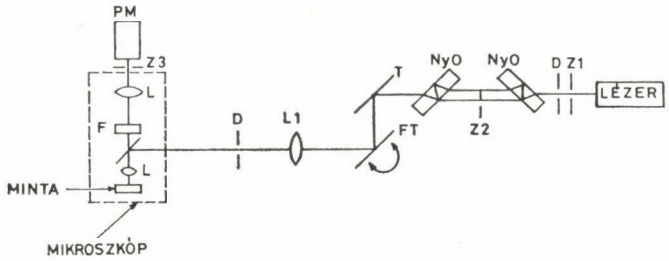
Integrális membránfehérjék laterális mozgását első ízben FRYE és EDIDIN (20) észlelték, amikor megállapították, hogy sejtek fúzióját követően a két sejt felületi komponensei egyenletesen eloszlanak a fúzió eredményezte sejt egész felületén. FOWLER és BRANTON (19) később lényegében ugyanilyen technikával vizsgálták a sejtmembrán komponenseinek a humán eritrociták fúziója utáni újraeloszlást. Fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelölt vörösvértesteket jelöletlen eritrocitákkal fúzionáltattak Sendai vírus vagy polietilén glikol alkalmazásával. A fúzió után előálló sejt fele részben sötét (nem fluoreszkáló), fele részben világos volt. Ez a nem egyenletes eloszlás bizonyos idő elteltével egyenletes fluoreszcencia intenzitás eloszlásba ment át. A jelenség magyarázata, a vörösvértest membránokkal („ghost") végzett hasonló kontroll kísérletek eredményei alapján, egyértelműen a fluoreszcenciás módon jelzett integrális membránfehérjék diffúziója. Úgy találták, hogy az egyenletes eloszláshoz szükséges idő csökkenő hőmérséklettel növekszik. A mért időkből meghatározták a diffúziós állandók közelítő értékét.

A fotodekompozíciót követő fluoreszcencia intenzitás regenerálódás („fluorescence photobleaching recovery" — FPR) módszer alkalmazásakor a FRYE—EDIDIN, ill. FOWLER—BRANTON-módszerhez hasonlóan egy kezdeti, nem egyenletes eloszlást hoznak létre, majd az egyensúlyi eloszláshoz való közeledést vizsgálják időben. Bizonyos fluoreszcenciás festékek ismert sajátsága, hogy intenzív fénnyel történő besugárzás hatására fotodekompozíciót szenvednek. Különösen fotoérzékeny fluoreszcens marker a fluoreszcein izotiocianát. A szokásos fénymikroszkópos vizsgálatokban észlelték, hogy ez a festék igen gyorsan halványul. Ez adta az ötletet, hogy intenzív besugárzás segítségével a sejtek felületének egy kicsiny részén az egész ottlevő festék mennyiségét eliminálják és azt követően mérjék ugyanazon helyen az esetleges fluoreszcencia intenzitás növekedést. Tekintettel arra, hogy ha a fotodekompozíció az egész sejt felületére kiterjedt, a fluoreszcencia intenzitás csak minimális mértékben növekedett (37), az ennél lényegesen nagyobb mértékű fluoreszcenciás intenzitás növekedésnek csak az lehet a magyarázata, hogy a scannelt felületre a sejtfelület azon részéről diffundálnak a fluoreszcein izotiocianáttal jelzett membránkomponensek, amely részek a primer fotodekompozíción kívül estek.

Az FPR módszer alkalmazása szükségessé teszi meghatározott membrán komponenseknek megfelelő fluoreszcens markerekkel való jelzését. Erre a célra legelterjedtebben fluoreszcein vagy rodamin származékokat használnak. A mérések során a fluoreszcens mikroszkóp látóterében egyetlen sejtet vizsgálnak. A sejtfelület egy kicsiny hányadát (néhány μm^2) rövid időre igen intenzív, fókuszált fénnyel világítják meg. Ezt követően a megvilágítás erősségét neutrális szűrőkkel igen nagy mértékben csökkentik, hogy a fluoreszcencia intenzitás változásának mérése idején számottevő fotodekompozíció ne léphessen fel. A fluoreszcencia intenzitás időben növekszik, amint a kiválasztott felületre az azt környező területekről fotodekompozíciót nem szenvedett fluoreszcens festékkel jelzett membránkomponensek diffundálnak. A fluoreszcencia intenzitás időbeli változásából diffúziós együtthatók határozhatók meg.

Az ilyen mérések kiértékeléséhez, az abszolút transzport paraméterek meghatározásához a fénynyaláb pontos geometriájának és azon belül a fényintenzitás eloszlásának ismerete szükséges. A módszer hátránya, hogy nem képes különbséget tenni a random diffúzió és a sejtfelületen többek által feltételezett szisztematikus áramlások miatti fluoreszcencia intenzitásváltozások között. Ezen okok miatt a diffúziós paraméterek ilyen módon meghatározott értéke a valódi értéktől esetenként eltéréseket mutathat.

A 3. ábrán egy módosított FPR kísérleti elrendezés látható (37). Az L1 egy speciális mikroszkópobjektív, amely a lézernyalábot a mintára fókuszálja. Ez előtt a lencse előtt el lehet helyezni egy hengerlencsét, ilyen esetben az elhalványított felület megnyúlt téglalap alakú. A két nyalábeleosztó szerepe, hogy kényelmesen lehessen a fényintenzitést a fotodekompozíciót produkáló



3. ábra. FPR vizsgálatok céljára alkalmas mérőrendszer. Bővebb magyarázatot l. a szövegben

(„bleaching") és a mérési célokat szolgáló („monitoring") értékekre beállítani, miközben a nyaláb helyzete nagy pontossággal változatlan. Ha a Z2 reteszt zárják, a fény csak négyszeres visszaverődés után jut a minta megfelelő helyére. Mivel minden visszaverődés mintegy 10% hatásfokú, ezért az intenzitásváltozás $\sim 10^{-4}$-szeres. A nyitás—zárás 1 ms alatt elvégezhető.

A nyaláb helyzete az FT forgótükör forgatásával változtatható. A fotodekompozició több mint 10, nagy pontossággal beállítható pozíció bármelyikén, esetleg mindegyikén létrehozható, és ezt követően egymás után mérik az összes pozícióban a fluoreszcenciás intenzitás időbeli változását. Ilyen módon kényelmesen el lehet különíteni a szisztematikus áramlások és a random diffúzió miatti intenzitásváltozásokat. A különböző módon kivitelezett FPR mérések eredményeiből a diffúziós állandók meghatározátára több matematikai módszer áll rendelkezésére (5, 25, 26).

Sejtfelületi receptorok eloszlása

A sejtmembrán felületén elhelyezkedő receptorok eloszlását, valamint annak időbeli változását illetően elvileg két szélsőséges felfogás lehetséges.

i., a receptorok eloszlása determinisztikus és egyszersmind statikus;

ii., az eloszlás teljesen véletlenszerű (egyenletes) és bármely kiválasztott receptor tökéletesen random diffúziós mozgást végez.

Az előző fejezetekben kifejtett tények mindkét extrém elképzelést kizárják. A statikus kép teljesen tarthatatlan, ez az előzőek ismeretében nem szorul további indokolásra. Hasonlóképpen elvethető a bármiféle restrikciót nélkülöző sztochasztikus modell is (l. a folyékony mozaik membránmodellel kapcsolatos megjegyzéseket). A valóságot jobban közelítő modellek ezen két szélsőséges modell „között" keresendők. Ilyen és ehhez hasonló meggondolásokból kiindulva a sejtfelületi receptorok eloszlására az alábbi modellt javasoltuk (11).

A receptorok elhelyezkedése nem lehet teljesen egyenletes, azok mozgása nem lehet teljesen sztochasztikus. Erre utal, egyebek között, a különböző receptorok csatolt sapkaképzése („co-capping") is (40). Bizonyítottnak tekinthető, hogy a receptorok (legalábbis egy részük) és a citoszkeleton rendszer kö-

zött strukturális kapcsolat létezik. Mivel a mikrotubulus, a mikro- és vastagfilamentum rendszer a sejtek genetikusan meghatározott stuktúrái, az általuk „kihorgonyzott" receptoroknak a sejt felületén való eloszlása nagy valószínűséggel a fenotípusra, ill. a genotípusra (esetleg mindkettőre) jellemző karakterisztikus vonásokat hordoz. Bár a receptorok túlnyomó többsége (ha van egyáltalán kivétel) mérhető rotációs és laterális mozgékonysággal bír, e folyamatok dinamikája megengedheti a receptorok egyes, fajra, ill. egyedre jellemző, topológiai sajátságainak időbeli megmaradását. Az ilyen megmaradó jellegzetességek nem feltétlenül egyetlen, azonos típusú receptorokkal kapcsolatosak, hanem több, különböző ligandum receptoraira külön-külön vagy azok együttesére egyidejűleg fennálló közös törvényszerűségek lehetnek (40). A modell kísérletes ellenőrzése nem könnyű, ilyen célra az elektronmikroszkópos „freeze etching" (1) technikánál minden bizonnyal effektívebb módszert jelent a ligandumok egymás kötődését befolyásoló hatásának vizsgálata (8, 18), valamint a fluoreszcenciás energia transzfer módszer, amelynek segítségével az involvált különböző receptorok közötti átlagos szeparációs távolságokat szimultán lehet meghatározni (40). Az ilyen meghatározott receptor topológiát („receptor pattern") leíró paraméterek a sejt felületét karakterizáló egyéb adatok (receptorok kvalitatív és kvantitatív jellemzése stb.) mellett hozzátartozhatnak az egyes sejtek teljes leírásához, maga a receptor pattern pedig a különböző felismerési folyamatokban játszhat szerepet.

Várható eredmények

A sejtfelületi receptorok integrális membránfehérjék, amelyek igen nagy affinitással kötnek meg különböző sejtfolyamatokat reguláló ligandokat. A receptorok működésére nem alkalmazható semmilyen univerzális modell. Ugyanakkor egyre több kísérleti adat utal arra, hogy a sejtfelületi komponensek aggregációs állapota és diffúziós sajátságai bizonyos sejtfunkciókkal korrelációban állnak. Bár jelenlegi ismereteink távol állnak attól, hogy segítségükkel elfogadható módon magyarázni lehessen a sejtfelület dinamikáját meghatározó faktorok hatását, elképzelhető, hogy a témakörön belüli további kutatások a dinamikai sajátságok megváltozásaiban egy-egy, sok elemi lépést tartalmazó sejt-válasz vagy membránon keresztül megvalósuló szignalizáció valamely kezdeti fázisát fogják azonosítani.

IRODALOM

1. Abbas, A. K., Ault, K. A., Karnovszky, M. J., Unanue, E. R.: J. Immunol. **114**, 1197 (1975).
2. Anersberg, N.: J. Cell. Biol. **52**, 206 (1972).
3. Antoine, J. C., Avrameas, S.: Eur. J. Immunol. **4**, 468 (1974).
4. Austin, R. H., Chan, S. S., Jovin, T. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5650 (1979).

5. AXELROD, D., KOPPEL, D. E., SCHLESSINGER, J., ELSON, E., WEBB, W. W.: Biophys. J. **16,** 1055 (1976).
6. BRETSCHER, M. S.: Nature New Biol. **231,** 229 (1971).
7. BRETSCHER, M. S.: Science **181,** 622 (1973).
8. BOYSE, E. A., OLD, L. J., STOCKERT, E.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **60,** 886 (1968).
9. CHERRY, R. J.: Methods Enzymol. **54,** 47 (1978).
10. CHERRY, R. J., BURKLI, A., BUSSLINGER, M., SCHNEIDER, G., PARIXH, G. R.: Nature **263,** 389 (1976).
11. DAMJANOVICH, S., SOMOGYI, B., TRÓN, L.: Macromolecular dynamics and information transfer. IUPS Symposium: Neural Communication and Control: Facts and Theories. Akadémiai Kiadó (megjelenés alatt).
12. DEPETRIS, S., RAFF, M. C.: Nature New Biol. **241,** 257 (1973).
13. DEPETRIS, S., RAFF, M. C.: Eur. J. Immunol. **4,** 130 (1974).
14. DEPETRIS, S.: J. Cell Biol. **65,** 123 (1975).
15. EDEN, A., BIANCE, C., BOGART, B., NUSSENZWEIG, V.: Cell. Immunol. **7,** 474 (1973).
16. EDIDIN, M.: Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **3,** 179 (1974).
17. FAIRBANKS, G., STECK, T. L., WALLACH, D. F. H.: Biochemistry **10,** 2606 (1971).
18. FLAHERTY, L., ZIMMERMAN, D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76,** 1990 (1979).
19. FOWLER, V., BRANTON D.: Nature **268,** 23 (1977).
20. FRYE, L. D., EDIDIN, M.: J. Cell. Sci. **7,** 319 (1970).
21. JABLONSKI, A.: Z. Naturforsch. **A16,** 1 (1961).
22. JOHNSON, L. W., HUGHES, M. E., ZILVERSMIT, D. B.: BBA **375,** 176 (1975).
23. JOVIN, T. M.: 28. Nemzetközi Élettani Kongresszus, 1980. július 13—19. Budapest, Akadémiai Kiadó (megjelenés alatt).
24. KONRILSKY, F. M., SILVESTRE, E., NEAUPORT, SAUTES, C., LOOSFELT, Y., DANSSET, J.: Eur. J. Immunol. **2,** 249 (1972).
25. KOPPEL, D. E.: Biophys. J. **28,** 281 (1979).
26. KOPPEL, D. E.: Biophys. J. **30,** 187 (1980).
27. LOOR, F.: Eur. J. Immunol. **4,** 210 (1974).
28. LOOR, F., FORNI, L., PERNIS, B.: Eur. J. Immunol. **2,** 203 (1972).
29. LOOR, F., LOWLANTS, G. E.: Eur. J. Immunol. **4,** 649 (1974).
30. MATROMARINO, P., NERI, G., SERRA, A., WALBORG, E. F.: J. Cell. Sci. **42,** 169 (1980).
31. MORRISON, M., MUELLER, T. J., HUBAR, C. T.: J. Biol. Chem. **249,** 2658 (1974).
32. NICOLSON, G. L.: BBA **457,** 57 (1976).
33. NIGG, E. A., CHERRY, R. J.: Biochemistry **18,** 3457 (1979).
34. OESTERHELT, D., STOECKENIUS, W.: Nature New Biol. **233,** 149 (1971).
35. OLDFIELD, E., CHAPMAN, D.: FEBS Lett. **23,** 285 (1972).
36. PAULIK, M. D., BERNOCO, M., BERNOCO, D., CAPPELINI, R.: Science **182,** 1352 (1973).
37. PETERS, R., PETERS, F., TEWS, K. H., BAHR, W.: BBA **367,** 282 (1974).
38. RAMASAMY, R., LAWSON, J.: Immunology **28,** 301 (1975).
39. SAVIOTTI, M. L., GALLEY, W. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71,** 4254 (1974).
40. SCHREINER, G. F., UNANUE, E. R.: Adv. Immunol. **24,** 37 (1976).
41. SINGER, S. J.: Adv. Immunol. **19,** 1 (1974).
42. SINGER, S. J.: Ann. Rev. Biochem. **43,** 805 (1974).
43. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: Science **175,** 720 (1972).
44. STECK, T. L.: J. Cell Biol. **62,** 1 (1974).
45. TAO, T.: Biopolymers **8,** 609 (1969).
46. TAYLOR, R. B., DUFFUS, W. P. H., RAFF M. C., DEPETRIS, S.: Nature New Biol. **233,** 225 (1971).
47. UNANUE, E. R., PERKINS, W. D., KARNOVSKY, M. J.: J. Immunol. **108,** 569 (1972).
48. UNANUE, E. R., KARNOVSKY, M. J.: Transplant. Rev. **14,** 181 (1973).
49. YAHARA, I., EDELMAN, G. M.: Exp. Cell. Res. **81,** 143 (1973).
50. YAHARA, I., EDELMAN, G. M.: Nature **236,** 152 (1973).
51. YAHARA, I., EDELMAN, G. M.: Exp. Cell. Res. **91,** 125 (1975).
52. YGUERABIDE, J.: Methods Enzymol. **26,** 498 (1972).
53. WAHL, P.: in: New Techn. Biophys. Cell Biol. **2,** 233 (1975).
54. WEBER, G.: Adv. Protein Chem. **8,** 415 (1953).

NMR RELAXÁCIÓ ÉS A FEHÉRJÉK BELSŐ DINAMIKÁJA

GÁSPÁR REZSŐ, IFJ.

DOTE Biofizikai Intézet

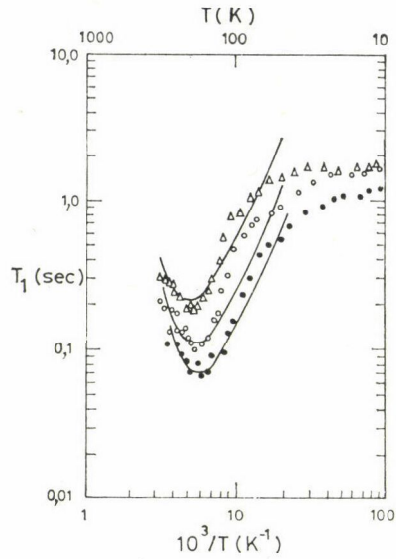
Az utóbbi években született számos kísérleti és elméleti eredmény arra utal, hogy a fehérjék belső dinamikája valószínűleg alapvető szerepet játszik biológiai funkciójuk ellátásában (DAMJANOVICH, SOMOGYI, 1978, CARERI és mtsi 1979). Mivel a fehérjék háromdimenziós szerkezetét többnyire kristályos mintákon végzett röntgen- és neutrondiffrakciós vizsgálatok alapján ismerjük, egyre érdekesebbé válik ezen makromolekulák szilárd állapotában lezajló mozgások tanulmányozása. A fehérje krisztallográfia hőmérsékletfaktor analízise által nyújtott legújabb eredmények (FRAUENFELDER és mtsa 1979, ARTYMIUK és mtsai 1979) jól kiegészítik a témakörre vonatkozó korábbi ismereteinket, melyeket főként oldatokon végzett nagyfeloldású NMR spektroszkópiai (WUTRICH 1976), illetve ab initio dinamikai vizsgálatok szolgáltattak (MCCAMMON és mtsai 1977).

A kristályos állapotú fehérjék és más makromolekulák dinamikájára vonatkozó igen értékes információk származtathatók NMR relaxációs kísérletekből. Az ilyen vizsgálatok különösen időszerűek, mivel napjainkban éppen az NMR technika segítségével bizonyították, hogy az oldatban levő fehérje molekulák konformációja igen hasonló a kristályos állapotban észlelthez (JARDETSKY és WADE—JARDETSKY 1980).

Az NMR relaxációs eredmények alapvetően három formában jelentkeznek, spin—rács relaxáció (T_1), spin—spin relaxáció (T_2 vagy vonalszélesség) és a forgó koordináta rendszerbeli relaxáció ($T_{1\varrho}$). Az ilyen típusú NMR eredményeket szinte kivétel nélkül relaxációs idő—hőmérséklet grafikonok formájában analizálják. Tipikusan ilyen ábrázolást láthatunk az α-kimotripszinre vonatkozólag az 1. ábrán. A grafikonokból az NMR relaxációt leíró általános elméleti modell alapján (KUBO és TOMITA 1954) a relaxációt kiváltó mozgást jellemző korrelációs frekvencia ν_c, és a mozgás aktivációs energiája számítható. A spin—rács relaxáció (T_1) esetén az elmélet végeredményül a következő egyszerű egyenletre vezet

$$\frac{1}{T_1} = C\left[\frac{\tau_c}{1+(\omega_0\tau_c)^2} + \frac{4\tau_c}{1+(2\omega_0\tau_c)^2}\right], \qquad (1)$$

ahol C az ún. relaxációs paraméter, $\tau_c = 1/2\pi\nu_c$ a korrelációs idő és ω_0 a mérés



1. ábra. Kristályos α-kimotripszin spin-rács relaxációs idejének (T_1) hőmérsékletfüggése három különböző frekvencián (△: 60 MHz; ○: 30 MHz: ●: 18 MHz). Folytonos vonallal a Kubo—Tomita-elmélet alapján illesztett görbéket jelöltük

körfrekvenciája. A korrelációs időre általában feltételezik a 2. egyenlet szerinti egyszerű Arrhenius-féle aktivációs törvényt:

$$\tau_c = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{RT}\right). \qquad (2)$$

A T_1 mérések tipikusan 10^6—10^8 Hz tartományban lezajló mozgások jelenlétéről adnak felvilágosítást. A hőmérsékletfüggő T_2 mérésekből ugyanakkor a makromolekulákon belül történő tipikusan 10^4—10^5 Hz frekvenciájú mozgások jelenlétére lehet következtetni. Az utóbbi években egyre elterjedtebb az ún. forgó koordináta rendszerbeli relaxáció mérése, főként a fenti frekvenciatartomány alacsonyabb értékek felé való kiterjesztésére. A forgó koordináta rendszerben a spinek együttforgását biztosító segéd mágneses tér nagyságrendekkel kisebb a T_1 méréseknél ható Zeeman-térnél, így a $T_{1\varrho}$ mérésekkel tanulmányozható frekvenciatartomány megegyezik a T_2 mérésekkel detektálhatóval. A forgó koordinátarendszerbeli mérések speciális változatának tekinthető az ún. dipoláris térben történő relaxációs idő, T_{1D} mérés. A dipoláris vagy lokális mágneses tér a Zeeman-térnél sok nagyságrenddel kisebb és így a hőmérsékletfüggő T_{1D} mérések tipikusan 10—10^4 Hz frekvenciájú, tehát viszonylag igen lassú mozgások kimutatására is alkalmasak:

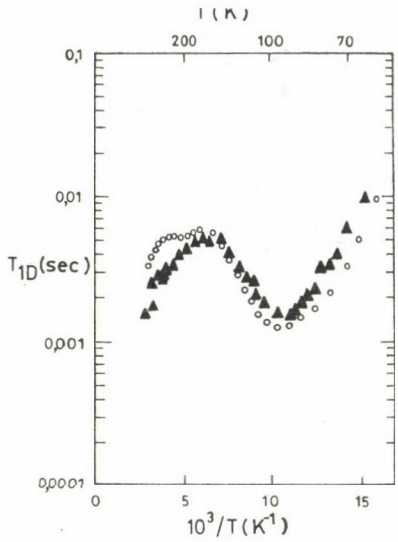
A kristályos fehérjékben lezajló NMR-rel észlelhető mozgásokat a következő kategóriákba lehet osztani:

1. Elsődleges polipeptidlánc-mozgások (a lánc főtengelye körüli gátolt rotáció, aktivációs energiája kb. 120 kJ/mol vagy nagyobb).
2. Másodlagos polipeptidlánc-mozgások (a lánc egyes részeire lokalizált torziós, hajlító mozgások kb. 40—60 kJ/mol aktivációs energiákkal).
3. Oldalláncmozgások (nagy, erősen poláros oldalláncokra 80 kJ/mol vagy a feletti, kis oldalláncokra 10 kJ/mol körüli aktivációs energiákkal).
4. Alacsony molekulasúlyú szennyezések mozgásai (pl. víz hatása).

Az első két mozgástípus elvileg további felbontásra szorulna a szilárd anyagokban sokszor jelenlevő amorf és kristályos régióknak megfelelően. Fehérje kristályokra vonatkozóan azonban még olyan kísérletes bizonyíték nincs, amely ezen felbontást indokolná.

A fehérjék belső dinamikájának vizsgálatára irányuló NMR relaxációs vizsgálatokat a kristályos aminosavakon végzett hasonló mérések előzték meg (ANDREW és mtsai 1977). A fehérje struktúra sok belső szabadsági fokkal rendelkező komplex dinamikai rendszer, így első közelítésben az alapvető mozgásformák megismerésére célszerűnek látszott egyszerű homopolipeptideken tájékozódó vizsgálatokat végezni. A kristályos polialaninon, polileucinon és polivalinon végzett hőmérsékletfüggő T_1 méréseink (ANDREW és mtsai 1978) a polimerek oldalláncaiban elhelyezkedő metil-csoportok domináló hatását mutatták ki ezen molekulák proton mágneses relaxációjára. A metil-csoportok mozgásának hatása annyira erősnek bizonyult ezen anyagoknál, hogy teljesen lehetetlenné tette minden más, a polimerekre jellemző mozgás NMR-es detektálását. Az észlelt mozgások frekvenciatartománya tipikusan 10^8 Hz, aktiválási energiájuk 10 kJ/mol köré tehető. A polipeptid lánc dinamikájára fordítva figyelmünket célszerűnek látszott két további homopolipeptid vizsgálata is, nevezetesen a poliglicíné és a poliproliné. Ezek az anyagok metil-csoporttól mentesek és az oldalláncmozgások zavaró hatásával sem kellett számolnunk. A poliglicin esetében valóban sikerült a fő polipeptidlánc mozgását észlelnünk az általunk használt NMR relaxációs technikával, azonban a poliprolinnál ismét nem várt, a metil-csoportok hatásához hasonló, erős relaxációs folyamatra bukkantunk. A poliprolinra vonatkozó eredményeink a prolin gyűrű belső mozgására épülő elméleti relaxációs modellel egybevágnak, így a szokatlanul erős proton-relaxáció forrását ebben az esetben a prolin gyűrű belső átfordulásaiban látjuk (ANDREW és mtsai 1981).

A fenti modellvegyületeken végzett kísérletek után megvizsgáltunk néhány természetes eredetű fehérjét, név szerint a lizozimot, α-kimotripszint és a ribonukleázt (ANDREW és mtsai 1980). Egyrészt a hagyományos T_1-hőmérséklet függésén keresztül, másrészt pedig a dipoláris térben végzett T_{1D} mérésekkel kívántunk ezen molekulák esetében a belső mozgások széles frekvenciatartományáról felvilágosítást kapni. Széles hőmérséklet (50—300 K)- és frek-



2. ábra. Kristályos lizozim dipoláris spin-rács relaxációs idejének (T_{1D}) hőmérsékletfüggése o-deuterált, és ▲-normál mintán mérve. Magasabb hőmérsékleteken a görbék letörése a fehérjén belüli másodlagos láncmozgások jelenlétére utal

venciatartományban (18—60 MHz) végzett T_1 méréseink tanúsága szerint a fehérjék általános tulajdonsága, hogy bennük a protonrelaxáció elsődleges forrását az energia spin-diffúzió útján történő átadása jelenti a polipeptid váz mentén elszórtan elhelyezkedő metil-csoportok felé (l. pl. 1. ábra). A vizsgált fehérjék esetén egyéb mozgások is kimutathatóan hozzájárultak a protonrelaxációs folyamathoz, mint pl. más, metil-csoportot nem tartalmazó oldalláncok, valamint a kristályszerkezetben elhelyezkedő vízmolekulák mozgása. Ezen következtetéseinket az említett fehérjék hőmérséklet függvényében mért spin—rács relaxációs idejének a Kubo—Tomita-modellel való összevetéséből állapítottuk meg. A Kubo—Tomita-modell által az izolált CH_3-csoportokra megjósolt C relaxációs paraméter ugyanis önmagában nem bizonyult elegendőnek az általunk vizsgált fehérjék erős relaxációs viselkedésének (nagy relaxációs paraméter érték) leírására. Az elmélet és a kísérleti eredmények között fennálló ellentmondást egyéb, a fehérjén belüli mozgások által generált relaxációs mechanizmusok feltételezésével lehetett csak feloldani, illetőleg a tapasztalt eltérés ezek jelenlétét bizonyítja.

A lizozim és az α-kimotripszin esetén ugyanakkor a T_{1D} mérések a fenti mozgások mellett magasabb hőmérsékleten (200 K felett) egy újabb, korábban nem észlelt aktív relaxációs forrás jelenlétére utalnak (2. ábra). Ezt a relaxációs forrást, mivel a hozzá rendelhető korrelációs frekvencia meglehetősen alacsony, 100 Hz, egyértelműen a polipeptid lánc másodlagos mozgásaival hoztuk összefüggésbe (GÁSPÁR és mtsai 1982).

A fenti kísérletek azon túl, hogy a kristályos fehérjén belül is aktív mozgások jelenlétét bizonyítják, rávilágítanak egy ezen makromolekulákon belül létező, alapvető energiaátadási mechanizmusra. Ez az intramolekuláris energiaátadási mechanizmus jelentősen közrejátszhat abban, hogy a fehérjék képesek legyenek katalitikus funkciójuk ellátására.

IRODALOM

Andrew, E. R., Hinshaw, W. S., Hutchins, M. G., Sjoblom, R. O. I.: Mol. Phys. **34**, 1695—1706 (1977).

Andrew, E. R., Gáspár, R., Wennard, W.: Biopolymers **17**, 1913—1925 (1978).

Andrew, E. R., Bone, D.N., Cashell, E. M., Gáspár, R., Meng, Q. A., Bryant, D. J.: Pure & Appl. Chem. 54, 585—594 (1982).

Andrew, E. R., Bryant, D. J., Cashell, E. M., Gáspár, R., Meng. Q. A.: in: Proc. of International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Bendor, France (1980). megjelenés alatt.

Artymiuk, P. J., Blake, C. C. F., Grace, D. E. P., Oatley, S. J., Phillips, D. S., Sternberg, M. J. E.: Nature **280**, 563—568 (1979).

Careri, G., Fasella, P., Gratton, E.: Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **8**, 69—97 (1979).

Damjanovich, S., Somogyi, B.: in: New Trends in the Description of the General Mechanism and Regulation of Enzymes (Eds.: Damjanovich, S., Elődi, P., Somogyi, B.) Symp. Biol. Hung. 21. Akad. Kiadó, Budapest 169—184 (1978).

Frauenfelder, H., Petsko, G. A., Tsernoglou, D.: Nature **280**, 558—563 (1979).

Gáspár, R., jr., Andrew, E. R., Bryant, D. J., Cashell, E. M.: Chem. Phys. Letters 86, 327—330 (1982).

Jardetsky, O., Wade-Jardetsky, N. G.: FEBS Letters **110**, 113—135 (1980).

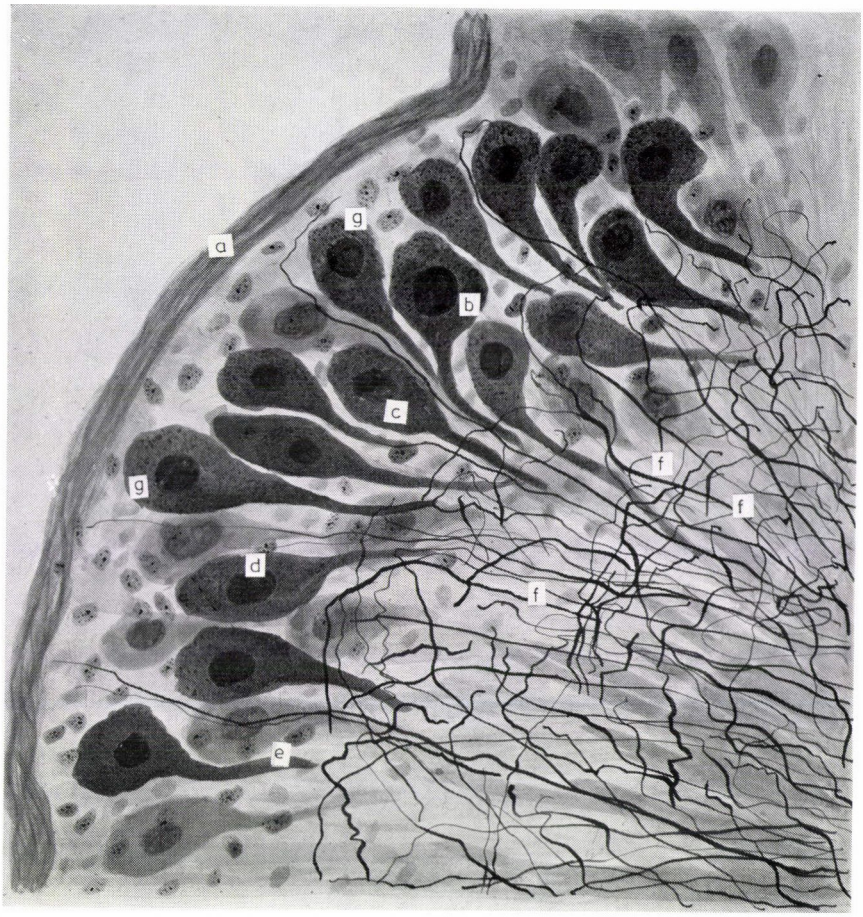
Kubo, R., Tomita, K.: J. Phys. Soc. Japan **9**, 888—919 (1954).

McCammon, J. A., Gelin, B. R., Karplus, M.: Nature **267**, 585—590 (1977).

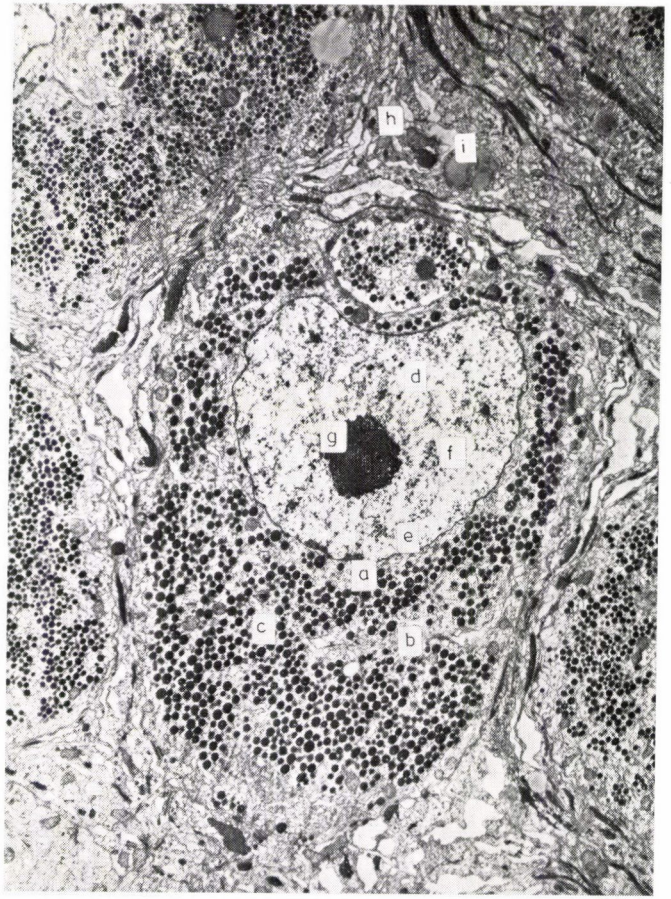
Wuthrich, K.: NMR in biological research: peptides and proteins. North-Holland, Amsterd (1976).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója — Műszaki szerkesztő: Sándor István
A kézirat nyomdába érkezett: 1981. XII. 16. — Terjedelem: 16,45 (A/5) ív

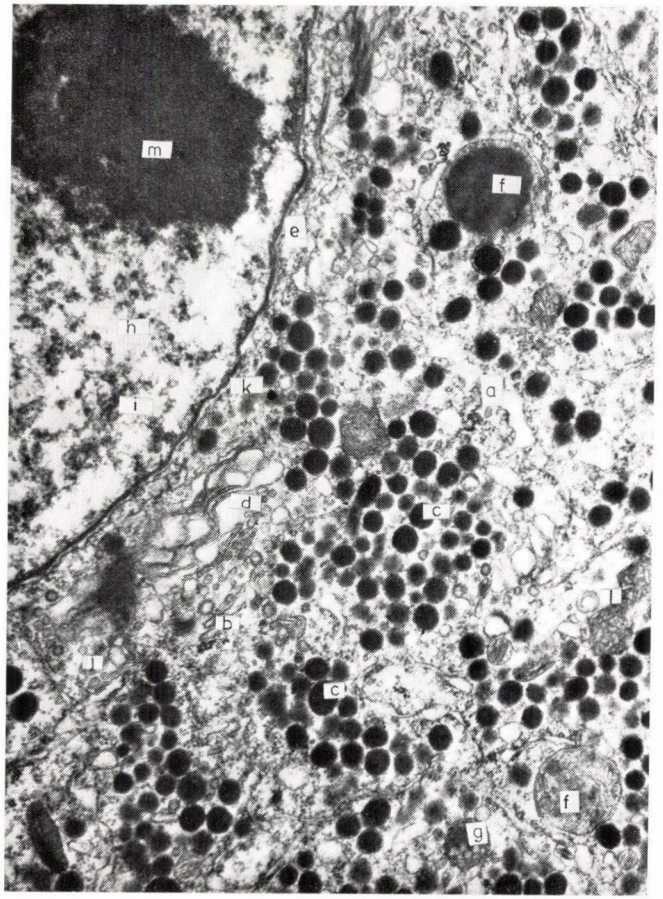
82.10339 Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György



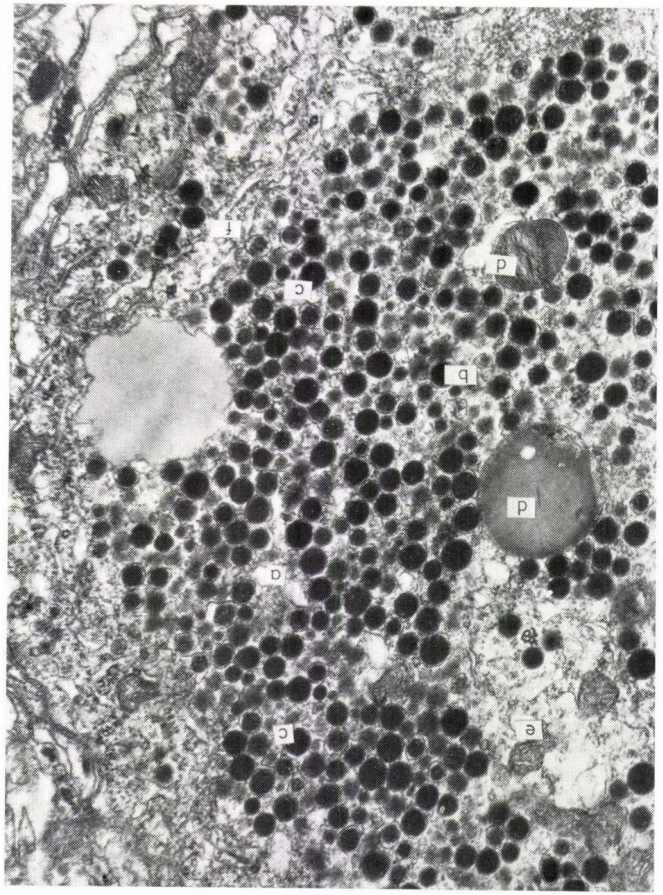
1. ábra. Lumbricus terrestris: ganglion supraoesophageum. a — köztakaró, b — idegsejt, c — citoplazma, d — sejtmag, e — neurit, f — idegrost, g — granulum. Bielschowsky—Gros-féle eljárás. Nagyítás 300×



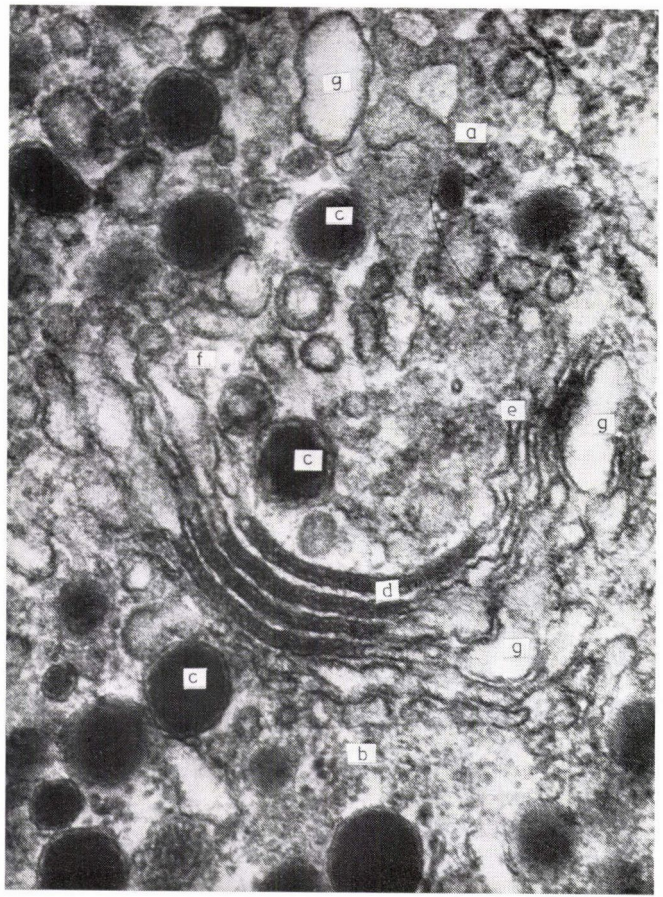
2. ábra. Lumbricus terrestris: ganglion supraoesophageum. a — idegsejt, b — citoplazma, c — neuroszekréciós granulum, d — sejtmag, e — maghártya, f — kromatin, g — magvacska, h — kötőszövet, i — lipid test. Nagyítás: 20 000×



3. ábra. Lumbricus terrestris: ganglion supraoesophageum. a — idegsejt, b — citoplazma, c — neuroszekréciós granulum, d — endoplazmatikus retikulum, e — mitokondrium, f — lipid test, g — multivezikuláris test, h — sejtmag, i — kromatin, j — vezikulum, k — belső maghártya, l — külső maghártya, m — magvacska, Nagyítás: 50 000×



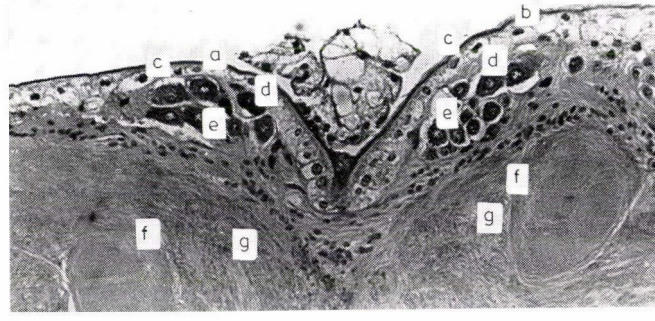
5. ábra. Lumbricus terrestris: ganglion supraoesophageum. a — idegsejt, b — citoplazma, c — dense core vezikulum, d — Golgi-féle test, e — tubulus, f — vezikulum, g — endoplazmatikus retikulum. Nagyítás: 135 000×



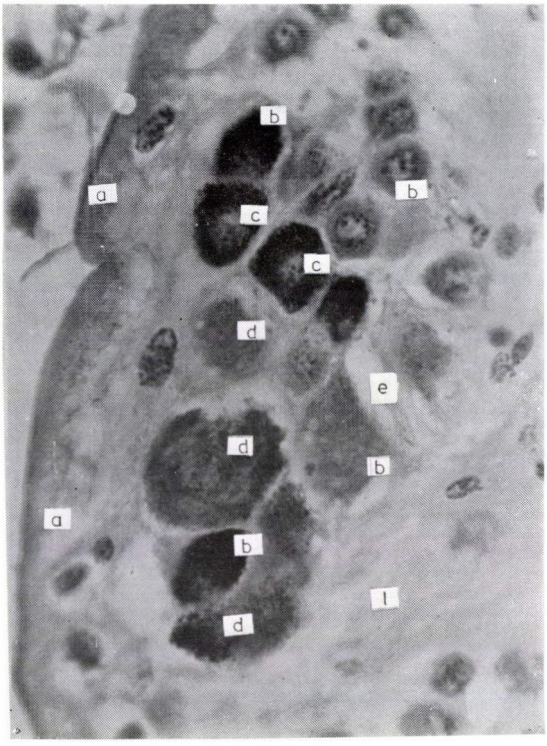
4. ábra. Lumbricus terrestris: ganglion supraoesophageum. a — idegsejt, b — citoplazma, c — neuroszekréciós granulum, d — lipid test, e — mitokondrium, f — kötőszövet. Nagyítás: 50 000×



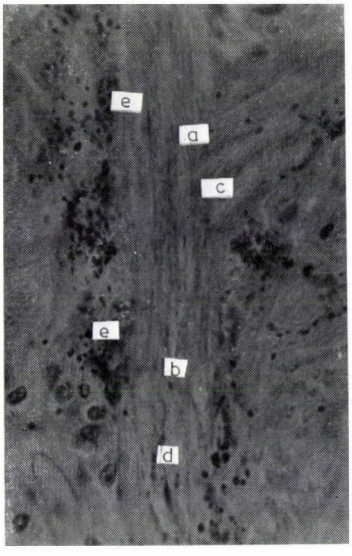
6. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — köztakaró, b — idegsejt, c — citoplazma, d — granulum, e — sejtmag, f — neurit, g — kötőszöveti mag, h — idegnyaláb, i — idegrost. Nagyítás: 300×



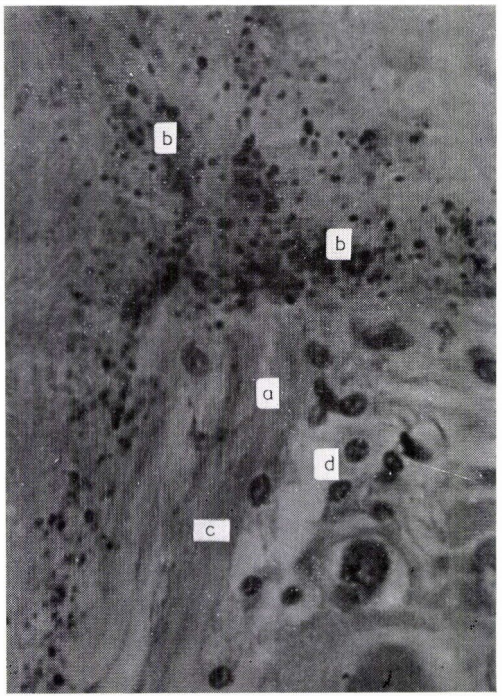
7. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — köztakaró, b — hámsejt, c — hámsejtmag, d — neuroszekréciós sejt, e — neuroszekréciós sejtmag, f — neuropil, g — idegrost. Nagyítás: 300×



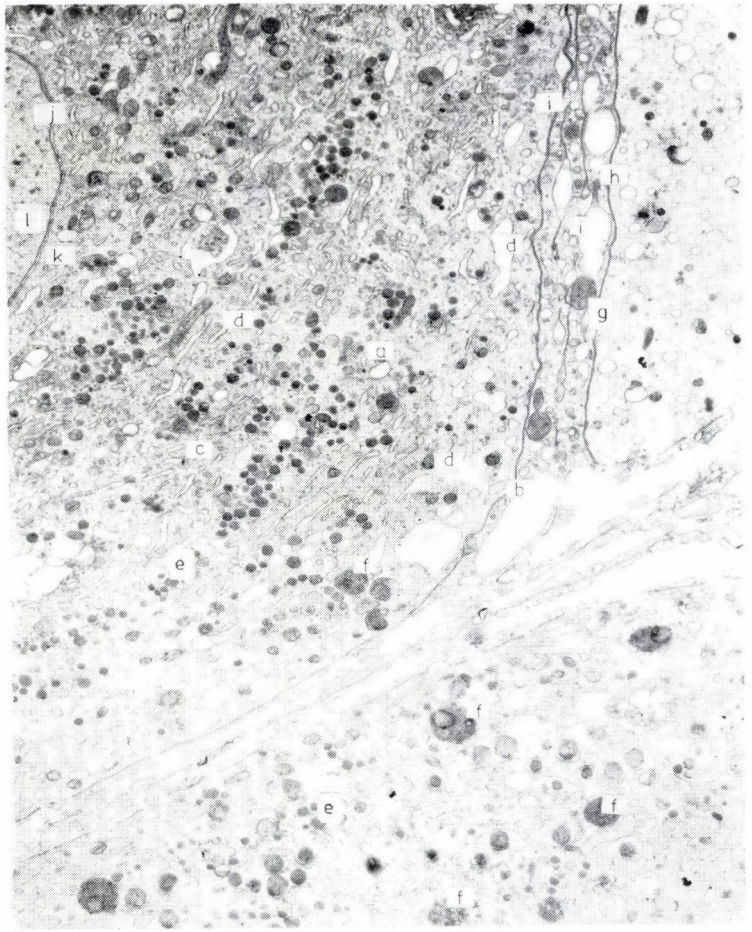
8. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — köztakaró, b — neuroszekréciós sejt, c — sejtmag, d — neuroszekréciós granulum, e — neuropil. Gömöri-Bargmann-féle eljárás. Nagyítás: 600×



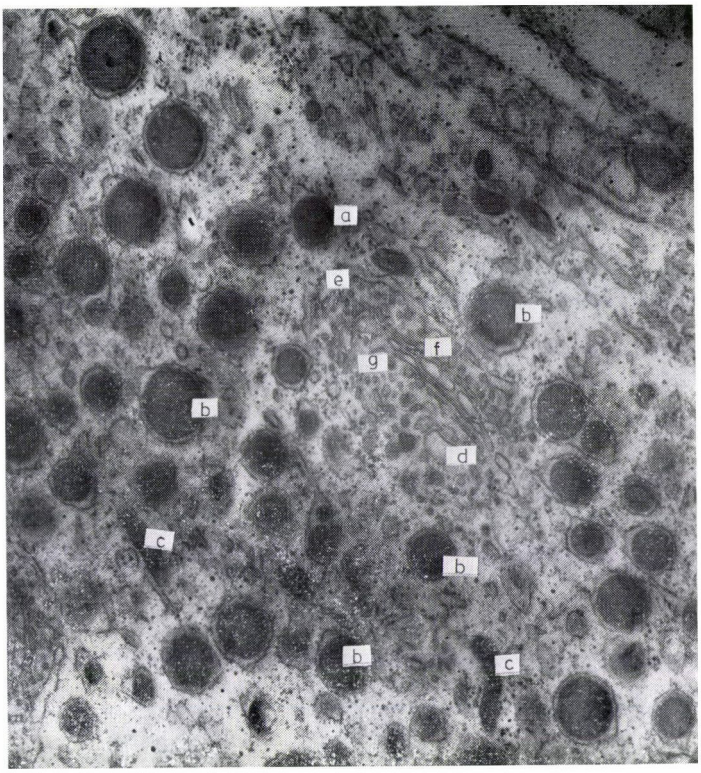
9. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — neuropil, b — pálya, c — pályakereszteződés, d — neuroszekréciós axon, e — neuroszekréciós granulum. Gömöri-Bargmann-féle eljárás. Nagyítás: 300×



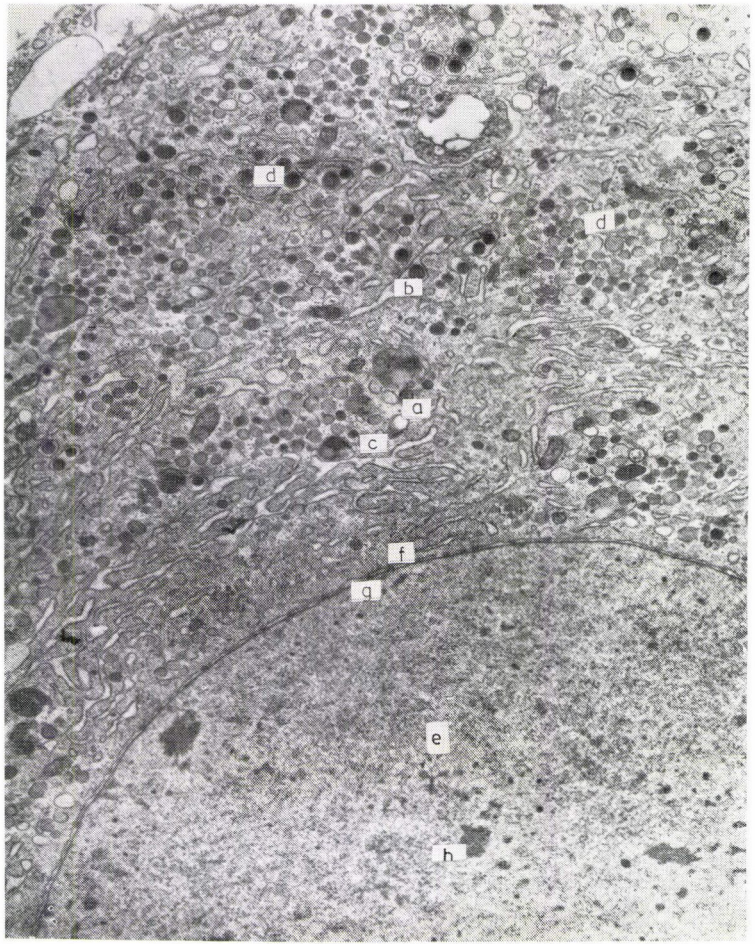
10. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — neuropil, b — neuroszekréciós granulum, c — idegrost nyaláb, d — glyamagvak. Gömöri-Bargmann-féle eljárás. Nagyítás: 400×



11. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — neuroszekréciós sejt, b — sejtmembrán, c — citoplazma, d — endoplazmatikus retikulum, e — neuroszekréciós granulum, f — multivezikuláris test, g — glyanyúlvány, h — glyahártya, i — vezikulum, j — sejtmag, k — külső maghártya, l — belső maghártya. Nagyítás: 22 000×



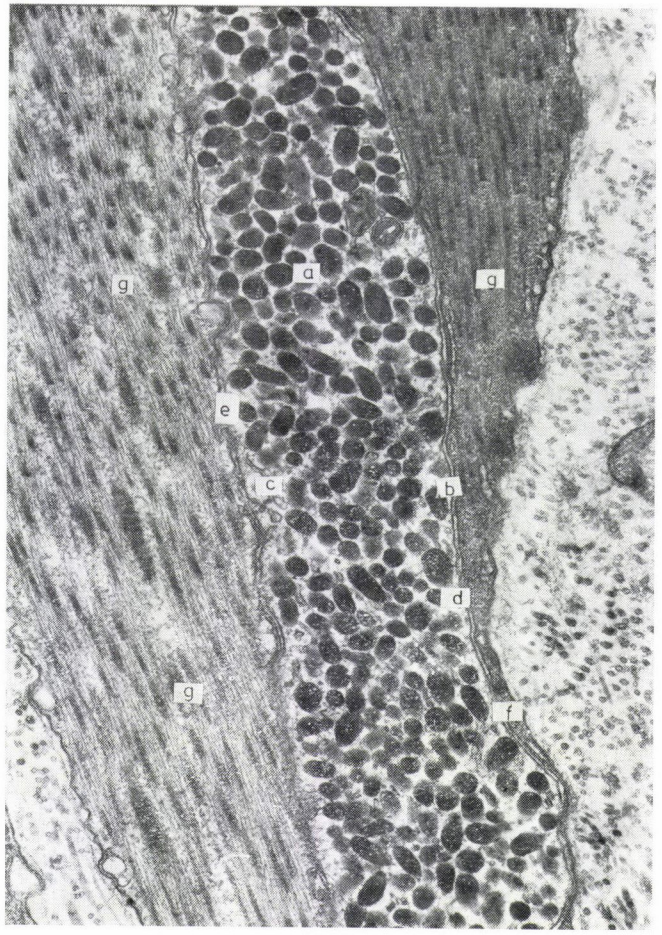
12. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — idegsejt, b — dense core vezikulum, c — mitokondrium, d — Golgi komplexum, e — ciszterna, f — vezikulum, g — tubulus. Nagyítás: 47000×



13. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — idegsejt, b — citoplazma, c — endoplazmatikus retikulum, d — neuroszekréciós granulum, e — sejtmag, f — külső maghártya, g — belső maghártya, h — kromatin. Nagyítás: 22 000×



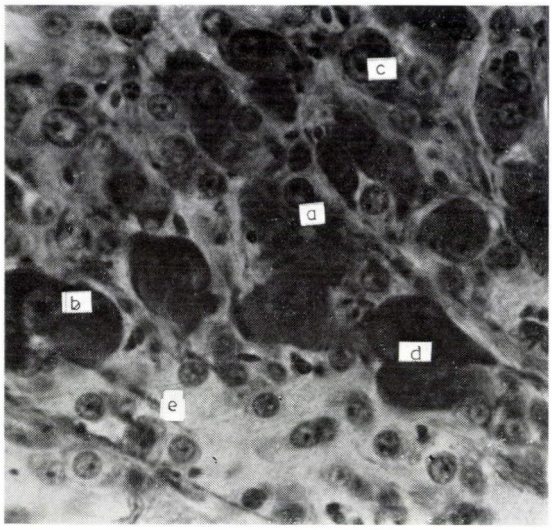
14. ábra. Hélix pomatia: nyelőcső a — idegsejt, b — citoplazma, c — endoplazmatikus retikulum, d — mitokondrium, e — neuroszekréciós granulum, f — sejtmag, g — chromatin, h — maghártya, i — lipid test, j — simaizom. Nagyítás: 20100×



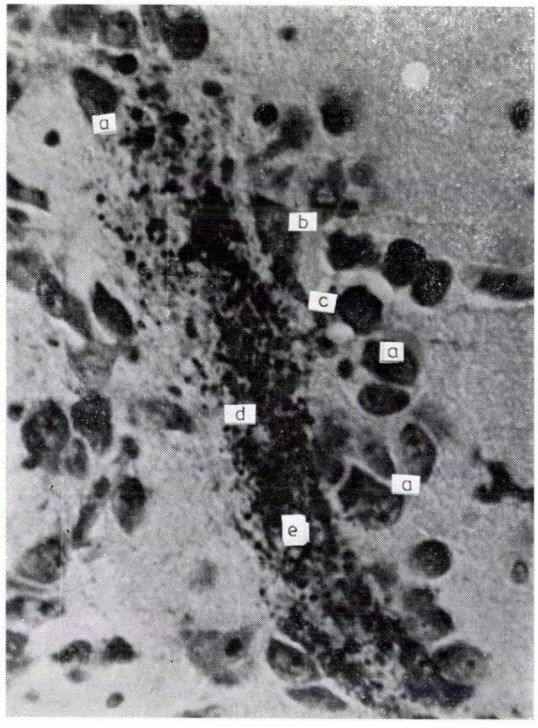
15. ábra. Hélix pomatia: bél a — idegrost, b — neuroszekréciós granulum, c — szarkoplazmatikus retikulum, d — axoplazma, e — citolemma, f — axolemma, g — simaizom. Nagyítás: 50 000×



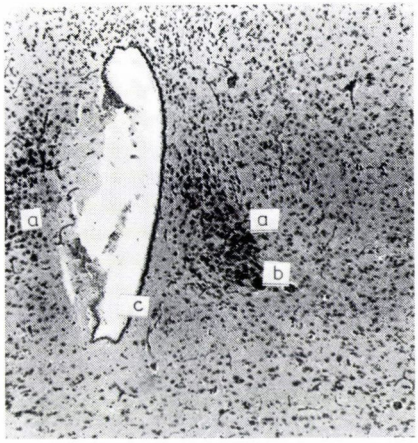
16. ábra. Hélix pomatia: bél a — idegrost, b — axoplazma, c — neuroszekréciós granulum, d — axolemma, e — glyasejt, f — glyanyúlvány, g — glyolemma, h — glycogen granulum, i — glyogranulum, j — vezikulum, k — myolemma. Nagyítás: 50 000×



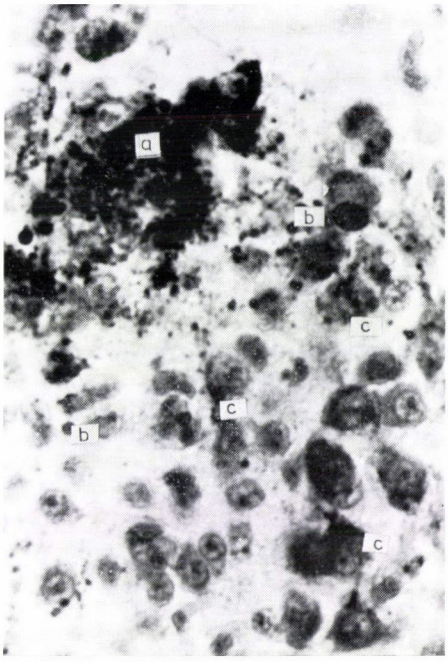
17. ábra. Cyprinus carpio: nucleus preopticus magnocellularis. a — idegsejt, b — sejtmag, c — sejtmagvacska, d — neuroszekretum, e — neurit. Nagyítás: 600×



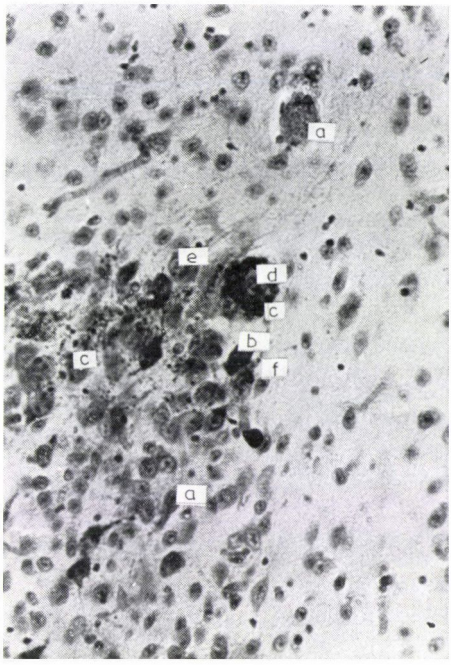
18. ábra. Rhinolophus ferrum equinum: hipotalamus nukleus supraoptikus. a — idegsejt, b — idegsejtmag, c — neurit, d — neuroszekréciós granulum, e — neuroszekréciós rost. Gömöri-Bargmann-féle eljárás. Nagyítás: 800×



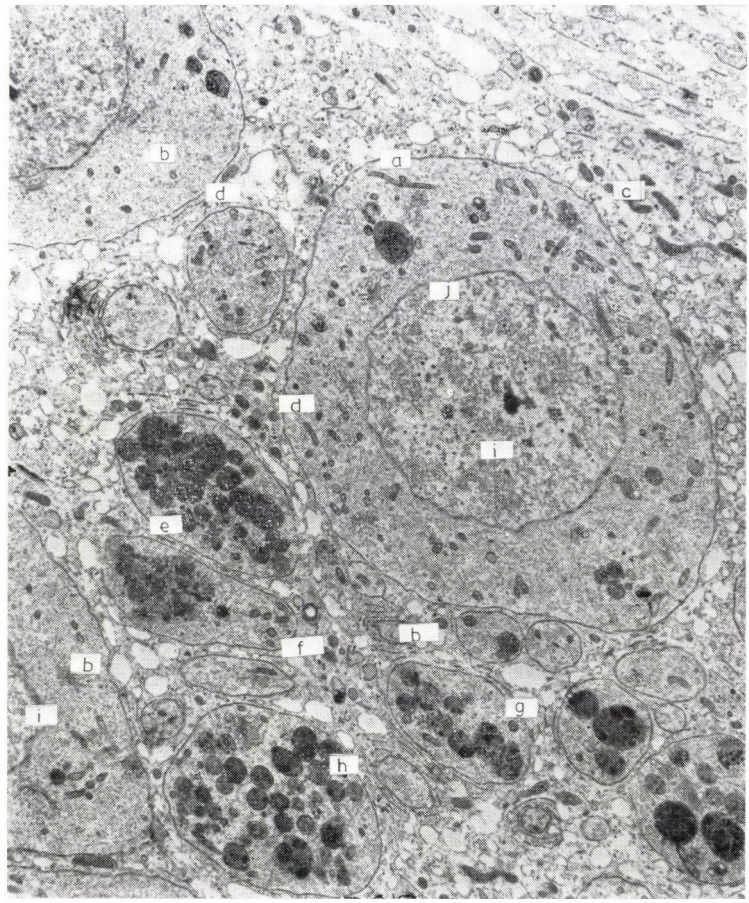
19. ábra. Rhinolophus ferrum equinum: hypothalamus nucleus paraventricularis. a — nucleus paraventricularis. b — neuroszekréciós sejt, c — ventriculus tertius. Gömöri-Bargmann-féle eljárás. Nagyítás: 100×



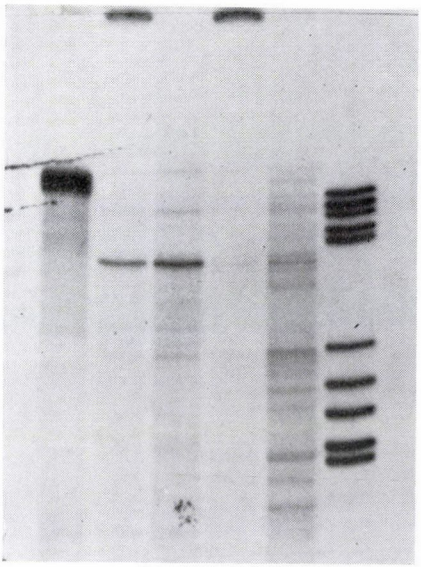
20. ábra. Rhinolophus ferrum equinum: hypothalamus nucleus paraventricularis. a — neuroszekréciós sejt, b — citoplazma, c — granulum, d — hajszálér, e — idegsejtmag, f — neurit. Gömöri-Bargmann-féle eljárás. Nagyítás: 600×



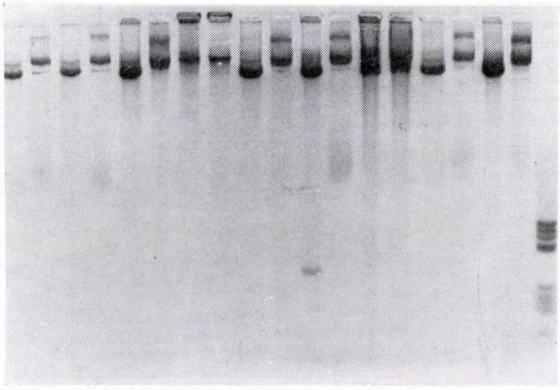
21. ábra. Rhinolophus ferrum equinum: hypothalamus nucleus paraventricularis. a — neuroszekretum, b — neuroszekréciós granulum, c — neuroszekréciós sejt. Gömöri-Bargmann-féle eljárás. Nagyítás: 700×



22. ábra. Dytiscus marginalis: ganglion supraoesophageum. a — idegsejt, b — citoplazma, c — mitokondrium, d — sejthártya, e — axon, f — axolemma, g — axoplazma, h — neuroszekréciós granulum, i — sejtmag, j — maghártya.
Nagyítás: 47 600×



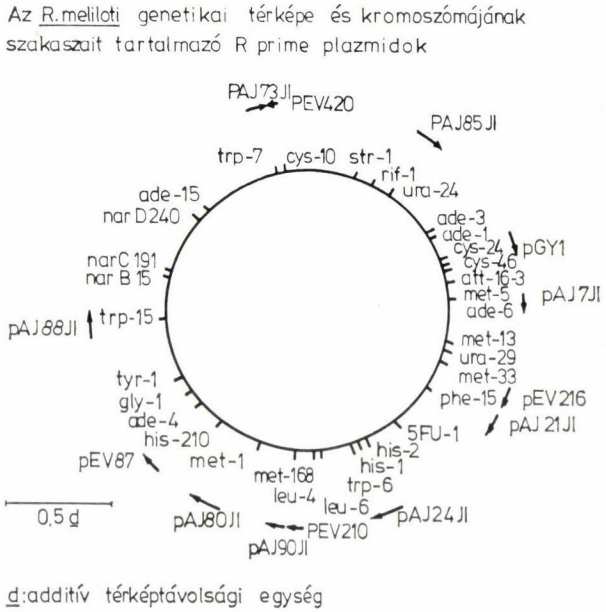
4. ábra. Az egyszálú cDNS elektroforézise és autoradiografiája. A szintézisnél felhasznált „primer" 5'-vége radioaktívan jelölt. 1. minta. Nyúl globin mRNS (mólsúly standard) 2. minta. cDNS szintézis Langerhans-sziget RNS-ről 3. minta. cDNS szintézis Langerhans-sziget RNS-ről 4. minta cDNS szintézis összes pankreász RNS-ről 5. minta cDNS szintézis összes pankreász RNS-ről 6. minta. BspI enzimmel emésztett pBR 322 DNS (mólsúly standard) A 2. és 4. minta az RNS eltávolítása előtt, a 3. és 5. minta az RNS lúgos eltávolítása után készült



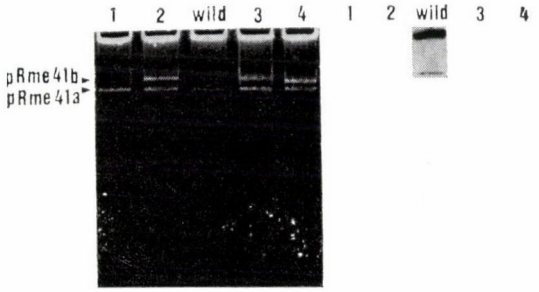
5. ábra. A rekombináns plazmidok ellenőrzése SmaI emésztéssel (elektroforézis agaróz gélen) 19. minta. BspI enzimmel emésztett pBR 322 (mólsúly standard) 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14., 16., 18. minták. Különböző plazmidok emésztés nélkül. 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13., 15., 17. minták. Ugyanazok SmaI emésztés után. Az 1. és 11. mintákban látható a kb. 330 bp nagyságú fragmentum



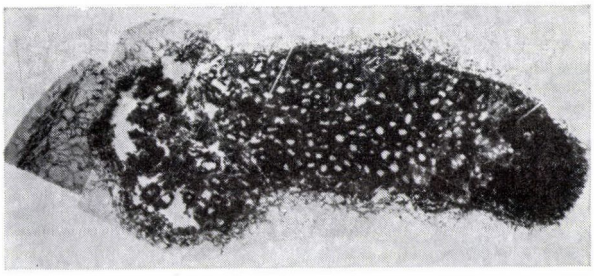
6. ábra. Az emberi pankreász-messengerről készült cDNS elektroforézise. A szintézisnél felhasznált „primer" 5'-vége radioaktívan jelölt. 1., 2., 3., 4. minta cDNS szintézis patkány pankreász mRNS különböző frakcióival. 5. minta. cDNS szintézis patkány Langerhans-sziget mRNS-ről. 6. és 7. minta. cDNS szintézis emberi pankreász mRNS két különböző frakciójával. 8. minta. BspI enzimmel emésztett pBR 322 DNS (mólsúly standard)

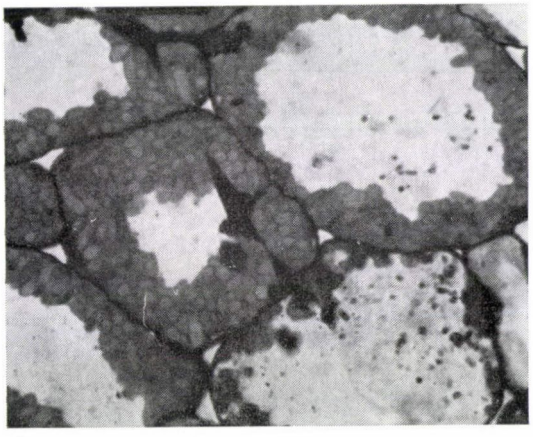


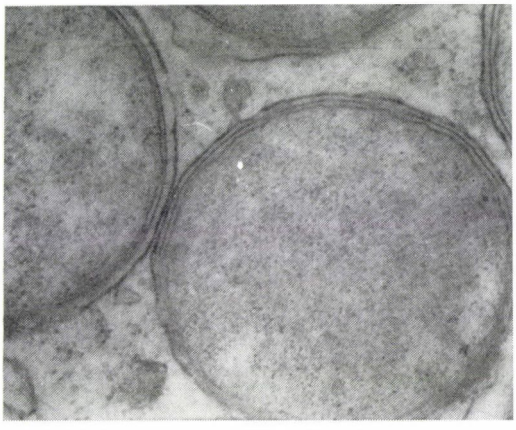
3. ábra. A *Rhizobium meliloti* 41 törzs kromoszómájának genetikai térképe és a kromoszóma egyes szakaszait tartalmazó R-prime plazmidok KONDOROSI, A., KISS, G. B., FORRAI, T., VINCZE, E., BÁNFALVI, ZS. Nature *264*, 525—527 (1977a). KISS, G. B., VINCZE, E., KÁLMÁN, Z., FORRAI, T., KONDOROSI, A.: J. Gen. Microbiol. *113*, 105—118 (1979). KISS, G., B., DOBÓ, K., DUSHA, I., BREZNOVITS, A., OROSZ, L., VINCZE, E., KONDOROSI, A.: J. Bacteriol. *141*, 121—128 (1980). KONDOROSI, A., VINCZE, E., JOHNSTON, A. W. B., BERINGER, J. E.; Mol. Gen. Genet. *178*. 403—408 (1980). VINCZE, E., KONCZ, C., KONDOROSI, A.: Acta Biologica Acad. Sci. Hung. (nyomdában) (1981). SVÁB, Z., KONDOROSI, A., Orosz, L.; J. Gen. Microbiol. *106*, 321—327 (1978)



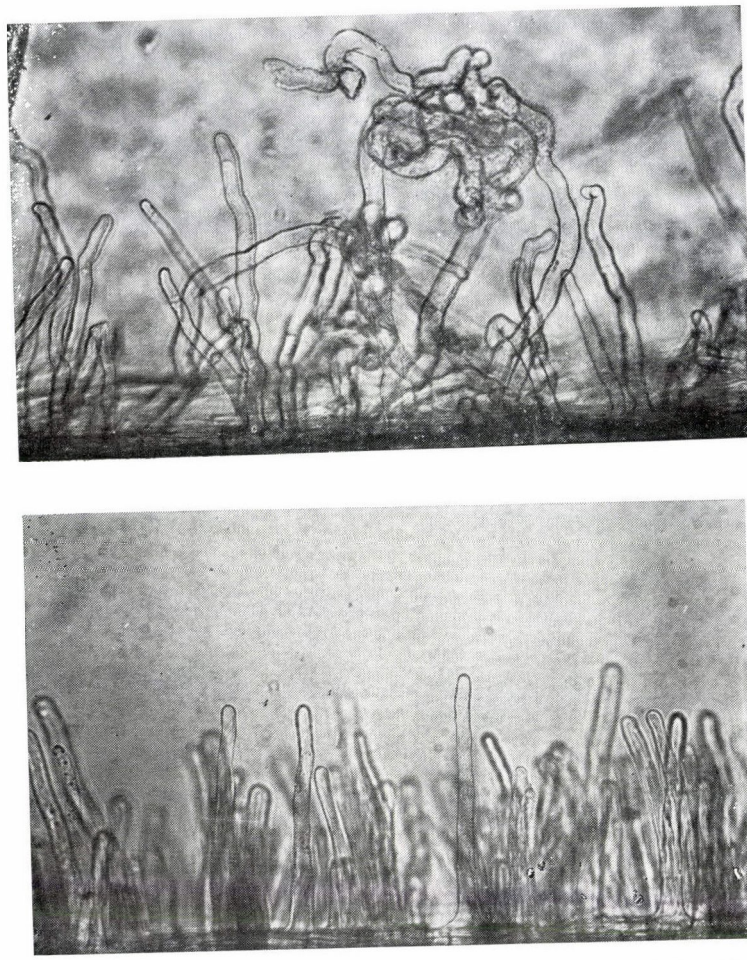
4. ábra. Vad típusú és Nod⁻ *R. meliloti* mutánsok endogén plazmidjainak agaróz gélektroforézises képe (a) és ^{32}p-vel jelzett *R. meliloti nif* fragmentum hibridizációja az (a) képen bemutatott plazmidokhoz (autoradiográfiás kép) (b) SAKANYAN, V., BÁNFALVI, Z., KONCZ, C., KISS, A., KONDOROSI, A.: Proc. Int. Cong. Soil Biology (nyomdában) (1981). BÁNFALVI, Z., SAKANYAN, V., KONCZ, C., KISS, A., DUSHA, I., KONDOROSI, A.: Mol. Gen. Genet. (közlésre beküldve) (1981)







1. ábra. Rhizobium meliloti baktériummal fertőzött lucernán kialakult gumó szerkezete. *a)* A gumó hosszanti keresztmetszete (fénymikroszkópos kép) *b)* A gumó belsejében levő bakteroidokat tartalmazó növényi sejtek fénymikroszkópos metszete *c)* A bakteroidok keresztmetszete (elektronmikroszkópos felvétel)



2. ábra. Lucerna hajszálgyökérzet fénymikroszkópos képe *a)* Vad típusú *R. meliloti* baktérium a hajszálgyökerek görbülését és elágazását idézi elő *b)* Gumókötésben hibás mutánssal való fertőzéskor ez elmarad

50,— Ft ISSN 0025—0333

TARTALOM

Tigyi József: Az MTA Biológiai Tudományok Osztályának beszámolója 281
Hozzászólások 293

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYÁNAK TUDOMÁNYOS ÜLÉSE
1981. április 22.

Alföldi Lajos: Megnyitó 313
Venetianer Pál: Modern nukleinsavkutatási módszerek felhasználása az alapkutatásban és a gyakorlatban 317
Gausz János: Genom szerveződés *Drosophila melanogaster*ben 325
Maliga Pál: Kloroplasztisz átvitel dohány protoplaszt fúzióval 335
Kondorosi Ádám: A szimbiotikus nitrogénkötés molekuláris genetikája 341
Ormos Pál: Bakteriorodopszin: egy egyszerű proton pumpa 351
Faludi-Dániel Ágnes: A fotoszintetikus pigmentek szerveződése a kloroplasztisz fénybegyűjtő és antennakomplexében 371
Farkas Tibor, Vigh László és *Horváth Ibolya:* Biológiai membránok szerepe a hőmérséklet adaptációs folyamatokban. A növények hidegtűrésének problémái 377

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

Oláh János, M. A. Abdel Moneim és *Tóth László:* Nitrogénkötés a Balaton, víztároló és halastavak üledékében 395
Ábrahám Ambrus: Összehasonlító fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok neuroszekréciós sejteken 433
Trón Lajos és *Damjanovich Sándor:* Membránfehérjék rotációs és laterális mobilitása 451
Gáspár Rezső, ifj.: NMR relaxáció és a fehérjék belső dinamikája 463

Megjelent 1982. XI. 8.

Index: 26.496