Diss. B 898

HIDROGÉNION KONCENTRÁCIÓ, ATP ÉS CISZTEIN HATÁSA ÉRZÉKENYITETT TETRAHYMENA PYRIFORMIS L.G. FÉNYINDUKÁLT MOZGÁSÁRA

D O K T O R I É R T E K E Z É S

készült

J.A.T.E. ÁLLATTANI INTÉZET TANSZÉKÉN

Intézetvezető: DR. MÓCZÁR LÁSZLÓ egyetemi tanár

1973.

Révayné R a j k á n y i K a t a l i n

JATE KÖZPONTI KÖNYVTÁRA
Folyóiratok
Szeged

Diss. B 898

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED

Ezuton mondok köszönetet DR. BICZÓK FERENC docens úrnak témavezető tanáromnak, ki értékes szakmai tanácsaival és irányitásával segitette munkámat.

Továbbá köszönet illeti DR. GELLÉRT JÓZSEFET a Felsőfoku Élelmiszeripari Technikum Mikrobiológiai Tanszék vezető tanárát, valamint POPPE KORNÉLNÉT, TÓTH MIHÁLYNÉT és DR. SZÉKÁCS GYÖRGYÖT az Egyesült Izzó Optikai Laboratóriumának fizikus munkatársait, kik segitségükkel valamennyien hozzájárultak kisérleteim sikeres elvégzéséhez.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS

A fény hatása az élőlényekre 1-4

I. VIZSGÁLATI ANYAG ÉS MÓDSZER 5

A. A tenyésztés módja 5-6

B. Az anyag előkészitése a vizsgálathoz 6-7

C. A vizsgálat módja 7-8

D. A vizsgálat körülményei 8

E. Az optikai rendszer leirása 8-11

II. KISÉRLETI ERIDMÉNYEK 12-28

III. A FOTON GERJESZTŐ HATÁSA 29-31

IV. BIOLÓGIAI RENDSZEREK MINT FÉLVEZETŐK 32-34

V. A FESTÉK /BENGÁLVERES SZEREPE/ A GERJESZTÉS FOLYAMATÁBAN 35-40

VI. A pH VÁLTOZÁS BEFOLYÁSA A FÉNYINDUKÁLT CSILLÓS MOZGÁSRA 41

A. pH és az enzimek szerepe a folyamatban 42-43

B. pH és a polipeptidkonformáció szerepe a folyamatban 43-46

C. pH és a mitochondriumok, valamint a membrán szerepe a folyamatban 46-47

VII. AZ ATP KÉPZŐDÉSÉNEK MECHANIZMUSA ÉS SZEREPE A FÉNYINDUKÁLT CSILLÓS MOZGÁSBAN 48-55

VIII. CISZTEIN HATÁSA A FÉNYINDUKÁLT
CSILLÓS MOZGÁSRA 56-59
IX. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA 60-67

B E V E Z E T É S

A FÉNY HATÁSA AZ ÉLŐLÉNYEKRE

Földünkön élő különböző élőlények magatartását számos tényező befolyásolja, vagy éppen meghatározza. A magatartás eredői genetikusan meghatározottak lehetnek. Ez természetesen korántsem jelenti azt, hogy a külvilág különböző ingereinek hatására a különböző ingerületek lényegesen ne változtatnák meg az élők magatartását. Ez áll fenn a mozgás esetében is, amely a magasabb rendűeknél neurohumorális kontroll alatt áll. A szabályozottság azonban akkor is felismerhető, ha kifejezett ideg - rendszeri strukturákat a kérdéses élőlényeknél nem sikerült kimutatni. Gondoljunk pl. az egysejtü állatokra, amelyek ostoraikkal, vagy csillóikkal meghatározott tör - vényszerüségek szerint változtatják helyüket. Ez a helyváltoztató mozgás alaptipusában többnyire nem változik, ha a külvilág ingerei hatnak; ezek az ingerek azonban módosithatják pl. a mozgásszervek ütésének frekvenciáját, a mozgás sebességét. Már régóta ismert, hogy ilyen mozgásváltozásokat pl. a fény is létrehozhat, amikor is a kisérleti állat menekül a károsító fény elől /negativ fotofobotaxis/, vagy éppen arrafelé tart /pozitiv fototaxis/.

A fény hatására adott válaszreakciók egyik fontos jellemzője a testorientáltságban jut kifejezésre. Hogy az ori-

entáltság milyen mérvü azt az állat fényelnyelő molekulái, a rájuk ható fény intenzitása, és hullámhossza határozza meg. Ez a felismerés joggal keltette fel a kutatók figyelmét, akik mind kifejezettebben fordultak a fotobiológia azon területe felé, amely a fény és a mozgás összefüggését kutatja.

A fotoindukált mozgásreakciók sajátosan értelmezhetők ott, ahol jól ismert fotoreceptorok vannak. Az egysejtü állatok világában ilyenekkel csak elvétve találkozunk. Ennek ellenére számos közlemény ad hirt arról, hogy a protozoák kifejezett mozgásváltozással válaszolnak a különböző fényingerekre.
Az első fotokémiai, vagy Grotthus-Draper törvény értelmében ez azt jelenti, hogy a kérdéses állatoknak olyan molekulákkal kell rendelkezniök, amelyek képesek a fotonokat abszorbeálni. Az ilyen molekulákat gyakran fotoreceptorikus molekuláknak nevezik. A molekulák természetéről gyakran olvashatunk. Az ilyen közlemények információi szerint a molekulák fehérje, illetve nukleinsav természetüek, tekintettel arra, hogy a legjelentősebb mozgáshatárok a 2600-2800 körüli abszorpciós csúccsal rendelkeznek, ami megfelel a DNS, illetve a proteinek spektrumának. A Paramécíumnál pl. olyan abszorpciós spektrumnál volt jelentősebb hatás elérhető, amely az albumin absz. spektrumához hasonlitott /GIESE 1945/.

A receptorikus molekulák tanulmányozására vonatkozó vizsgálatok érdekes uj szempontokkal bővültek, amikor megállapitották, hogy a fényt erősen abszorbeáló molekulák mesterséges bevitelével a fotoindukált mozgásreakciók jelentősen felfokozódnak. Az ilyen jellegü vizsgálatok alapjait és az észlelt jelenségek törvényszerüségeit BLUM rakta le 1941-ben, amikor azt észlelte, hogy egyes festékekkel kezelt véglények a fény hatására gyorsan elpusztulnak. A későbbi vizsgálatok azt igazolták, hogy az állatok elpusztulása előtt a mozgás sebessége átmenetileg felgyorsul, majd kissé lassubbá válik, s ezt követően egy ujabb, de az előbbinél kisebb maximum következik be a mozgásban, amelyet az alkalmazott festék természetétől, a fény hullámhosszától és erejétől függően a mozgássebesség csökkenése, az állat mozdulatlansága, majd pusztulása követi /BICZÓK 1969/.

Ismeretes, hogy a festék esetében, szenzitor hatásról van szó, vagyis arról, hogy a természetében sok szempontból nem tisztázott festék kötődésével olyan komplex jön létre, mely fotonokkal jól gerjeszthető. A festék ugyanakkor fotodinám hatást is fejt ki, mely az elektronmikroszkópos és fotokémiai vizsgálatok szerint megváltoztatja a kisérleti objektum szerkezetét.

Az eddig elmondottak természetszerüen csábitanak annak a

kutatására, hogy vizsgáljuk a hidrogénionkoncentráció, az ATP, és a cisztein fotoindukált mozgássebességre gyakorolt hatását, mivel a fotoelektromos jelenségek nagy - ban függnek egyes molekulák /nukleinsavak, polipeptidek/ elektromos töltésállapotától, továbbá az ATP reszintézisétől, az SH csoportot tartalmazó szerkezetképző cisztein jelenlététől is.

A vizsgálatokat festetlen és bengálvörössel érzékenyitett Tetrahymena pyriformis GL sterilen tenyésztett egyedein végeztem, mivel a legtöbb idevonatkozó adat ezzel az állattal kapcsolatban áll rendelkezésre.

I.

VIZSGÁLATI ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálataimat a Felsőfoku Élelmiszeripari Technikum Mikrobiológiai tanszékén általam fenntartott Tetrahymena pyriformis GL törzs steril tenyészetéből nyert egyedeken az Egyesült Izzó Optikai Laboratóriumában végeztem.

Tetrahymena pyriformis GL jellemző sajátossága, hogy a cytostomát szegélyező csillók összeolvadva négy hártyaszerü képletet alkotnak, melyek közül három kisebb /membránellák/ és egy nagyobb /unduláló membrán/. A Tetrahymena pyriformisnak napjainkban több törzsét irták le. Legrégebben ismert az emlitett GL törzs, ezenkivül az E, H, S, W, Y törzsek. Egyes törzsek, mint pl. a GL törzs csak makronukleussal rendelkeznek és igy amitotikusan osztódnak, mig a többi törzsnek mikronukleusa is van. Kisérleteimhez a GL törzs igen kedvezőnek bizonyult, mivel egyedei fényérzékenyek.
Kisérleteimhez steril tenyészeteket használtam.

A. A tenyésztés módja

A Tetrahymena pyriformis steril tenyésztésére fehérpatkány májat használtam, /kb. 0,5 cm^3 darabokhoz félkémcsőnyi csapviz/. Papirvatta dugóval szorosan lezárt anyagot autoklávban 20 percen át 2,5 atm. nyomás alatt sterilizáltam. Az igy kapott májextraktumba lehülése után ste -

ril pipettával előzőleg már benépesedett kulturából oltottam át. Az átoltás utáni negyedik napon az uj kultura elérte a maximális sürüséget, s igy mozgásvizsgálati célokra felhasználhatóvá vált. Tekintettel arra, hogy kisérleteim során a fény hatását vizsgáltam, a tenyészeteket sötétben tartottam, gondosan ügyelve arra, hogy a vizsgálatra való előkészités előtt és alatt minél kevesebb fény érje az állatokat.

B. Az anyag előkészitése a vizsgálathoz

A kapott steril tenyészetet egy perces nem tul gyors centrifugálással leüllepitettem, majd a tenyészfolyadékot az állatokról óvatosan leöntve olyan törzsoldatot öntöttem, amely a Tetrahymena pyriformis számára izotoniás, s igy az állatok benne több napig jól eltarthatók.
Ezen törzsoldat összetétele:

Egy liter desztillált vizben:

0,373 gr KCL

1,169 gr NaCL

0,190 gr $MgCL_2$

0,407 gr $CaCL_2$

0,140 gr KH_2PO_4

0,006 gr KOH

A törzsoldat pH-ját 3-9-ig állitottam be /NaOH foszforsav/

A mozgásvizsgálatokat az említett pH tartományokban végeztem, olyan állatokon, amelyeket tisszeresre higitott törzsoldatban 12-16 órán át éheztettem.
Ezután az előkészités után az anyagon a következő vizsgálatokat végeztem:
Vizsgáltam a fény hatását

a./ festetlen állatokon pH3 - pH9 közötti tartományokban

b./ 1:50.000 higitásu bengálveressel festett állatokon

c./ ATP-vel és

d./ ciszteinnel kezelt állatokon.

C. A vizsgálat módja

A vizsgálati anyagot függőcseppbe helyeztem, melynek átmérője 2 mm volt, igy a monokromátor fénye az állatokat teljesen megvilágitotta. A mozgássebességet stopperórával 5 perces időközökben mértem. Az első 5 percben természetes megvilágitás mellett mértem, s 10 regisztrált értékből számitottam ki a mozgássebesség u.n."sötétátlagát!" A további méréseket ugyancsak 5 perces időközökben de már monokromatikus megvilágitás mellett végeztem.
A mérések során kapott értékekből szerkesztettem meg a mozgássebesség változását szemléletesen ábrázoló grafikonokat, melyek alakját a korábban említett faktorok határozták meg.

D. A vizsgálat körülményei

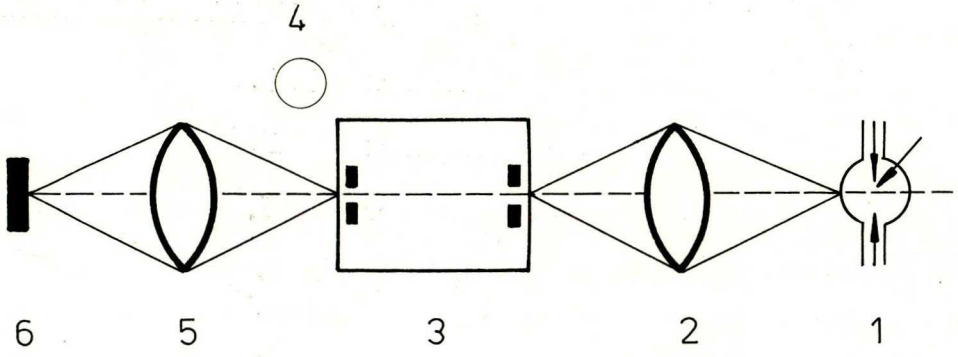
Mint már az előzőekben emlitettem a kisérleti objektumok vizsgálata 12-16 órás éheztetés után történt.

A helyiség hőmérséklete, melyben a kisérleteket végeztem 24° - 25° C között változott.
A különböző tipusu vizsgálatokat azonos számu minta /6 függőcseppben lévő anyag/ alapján végeztem.

E. Az optikai rendszer leirása

Az optikai rendszer gerincét a szovjet gyártmányú DMR-4-es tipusu kettős monokromátor, valamint az OSRAM HBO 200 W-os magasnyomásu Hg-gőzlámpa alkotta.

A monokromátor vázlatos rajza:



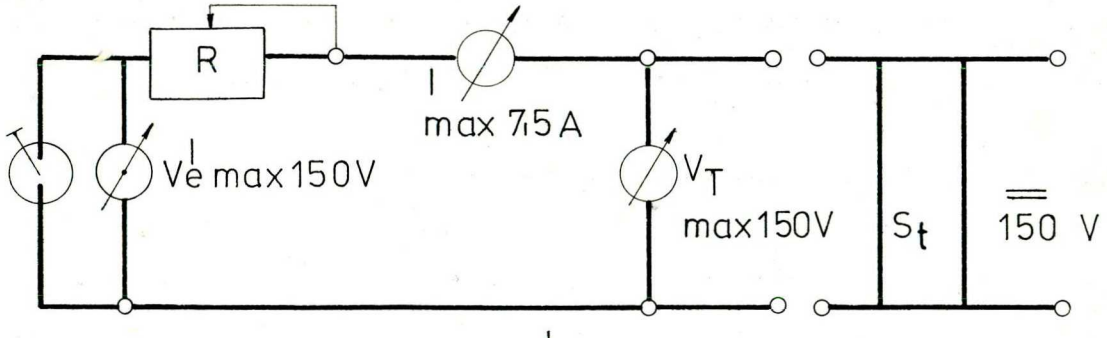
1. ábra

Az ábrán látható számok jelentése:

1. rövidivü higanygőzlámpa
2. leképező
3. monokromátor
4. fotocella
5. leképező lencse
6. mérendő minta

Mérés során nagy fénysürüségü /33.000 cd/cm^2/ rövidivü OSRAM HBO 200 W higanygőzlámpát használtam. A higanygőzlámpa ivét a 2. lencse képezte le, a 3-as monokromátor belépő részére. A monokromátor kilépő részén áthaladó monokromatikus fénnyalábot az 5-ös lencse fokuszolta a 6-os mintára. A 4-es RCA 935-ös fotocella a kilépő fénnyaláb intenzitásának mérésére szolgált, ezzel ellenőriztem, hogy mindig ugyanakkora sugárfluxus essen a mintára. A rövidivü magasnyomásu higanygőzlámpát egyenfeszültségről működtettem.

Kapcsolás:



2. ábra

$V_é$ = az égésfeszültséget mérő müszer
/statikus V-mérő TAUBER 602/2053/

V_T = tápfeszültséget mérő müszer

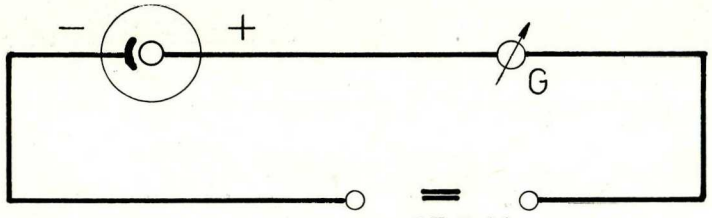
I = lámpa áramát mérő müszer
/ASZTATIKUS 536735/1955/

R = a lámpa áramának beállitására szolgáló tolóellenállás

St = a lámpát tápláló egyenfeszültség stabilizátor.

A mérés során a lámpa áramát I=3.5 A értéken tartottuk, az ehhez tartozó egész feszültség 54 V.

A kilépő fénysugár intenzitását mérő fotocellát az alábbi kapcsolásban müködtettük:



3. ábra

G = müveleti erősitő árammérő müszer.

A fotocella számára a stabilizált egyenfeszültséget egyenirányitó müszer szolgáltatta.

A feszültséget EKM 320641 voltmérővel mértük.

A fotocellát az ellenőrző mérések végzésekor mechanikusan a fény utjába toltuk. A fotocellára eső szort fényeket blendézéssel küszöbültük ki.

A monokromátor bontóeleme két 30° -os prizma, amelynek a törőéle mellett fekvő befogólapja tükrözve volt. A lekó-

pezéseket tükörrel végeztem, igy a monokromátor mentes volt a szini hibáktól. A monokromátor ki- és belépő, valamint középső rése 2 mm-ig volt nyitva. A mérés során mindvégig ezen a résen dolgoztam, ügyelve arra, hogy a monokromatikus λ = 543 milimikronos sugárzáson kivül más ne essék a mintára.

A rövidivü nagynyomásu higanygőzlámpa ivének közepes fénysürüsége 33.000 cd/cm^2.

A fenti fénysürüség adatát a nem monokromatikus látható tartományban sugárzott összenergiát adja meg.

Méréseim során csak a higanygőzlámpa λ = 543 milimikronos vonalára szoritkoztam, ugyanis ez a hullámhossz felelt meg legjobban az érzékenyitőként használt bengálveres abszorbciós maximumának. Ezenkivül erre a hullámhosszra nagy energiájára való tekintettel a nem érzékenyitett egyedek is kitünően reagáltak.

II.

KISÉRLETI EREDMÉNYEK

A vizsgálati célok figyelembevételével méréseim két nagy csoportba oszthatók attól függően, hogy használtam-e fényérzékenyitő anyagot, vagy sem. Ezen csoportositáson belül további kisebb egységeket lehet még megkülönböztetni.

I. csoport: azok a mérések tartoznak ide, melyek során a kisérleti objektumot nem kezeltem fényérzékenyitő anyaggal.

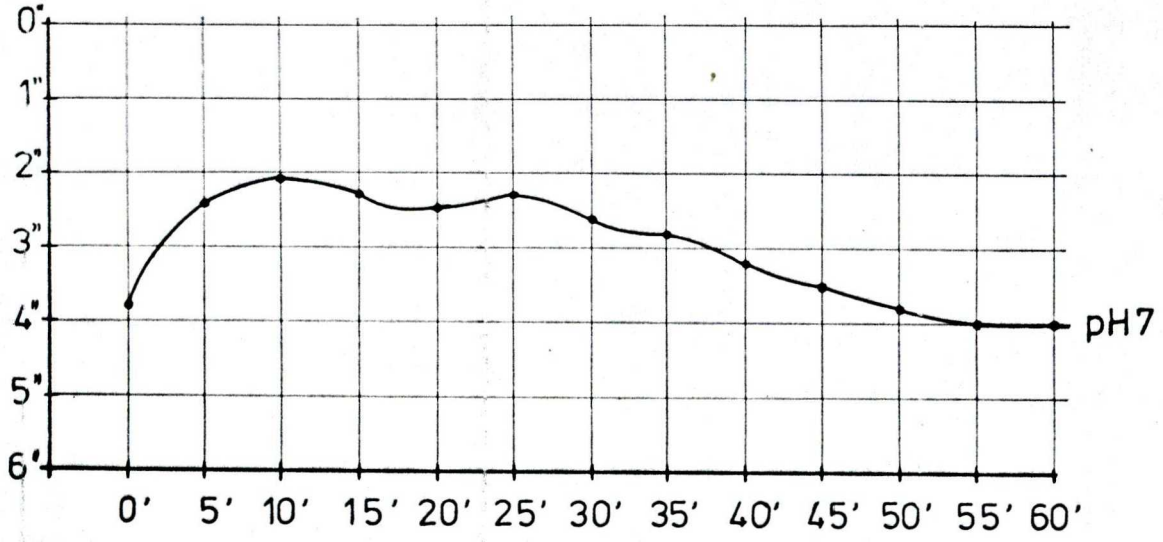
I./1. Különböző pH értékek /3-9/ hatásaira bekövetkező mozgássebességi reakciók, illetve ezek változásainak, eltéréseinek vizsgálata.

I./2. Különböző pH értékek + ATP módositó hatásának vizsgálata.

I./3. Különböző pH értékek + cisztein módositó hatásának vizsgálata.

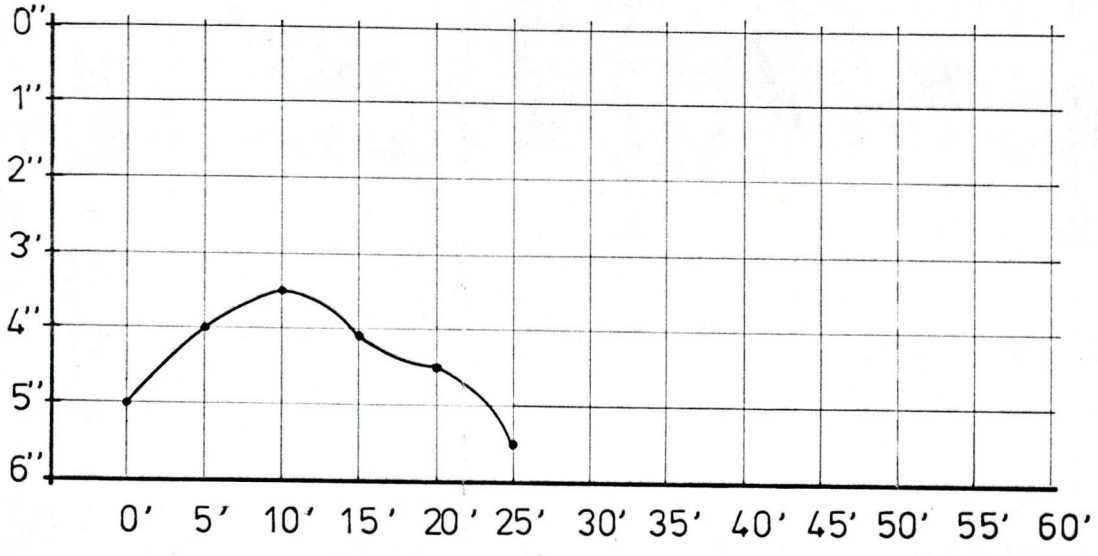
II. csoport: az idetartozó mérések elvégzése alkalmával a fenti sorrendben a kisérleti objektumhoz szenzitort /bengálveres/ adtam.

Csoportonként 42-42 mérés eredményeinek átlagértékeit dolgoztam fel.



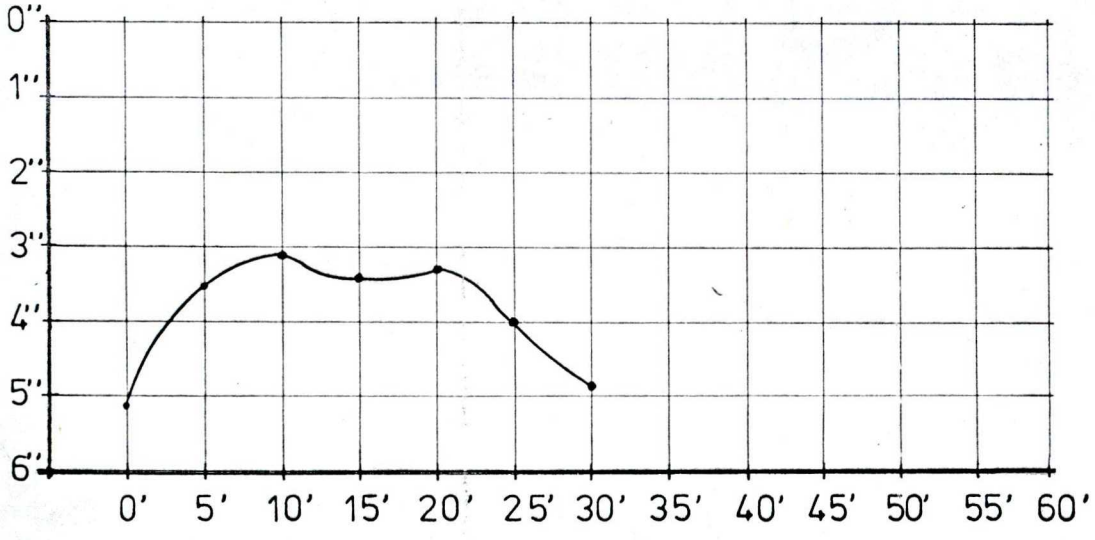
4. ábra

Tetrahymena pyriformis mozgássebességének változása az idő függvényében pH 7 értéknél



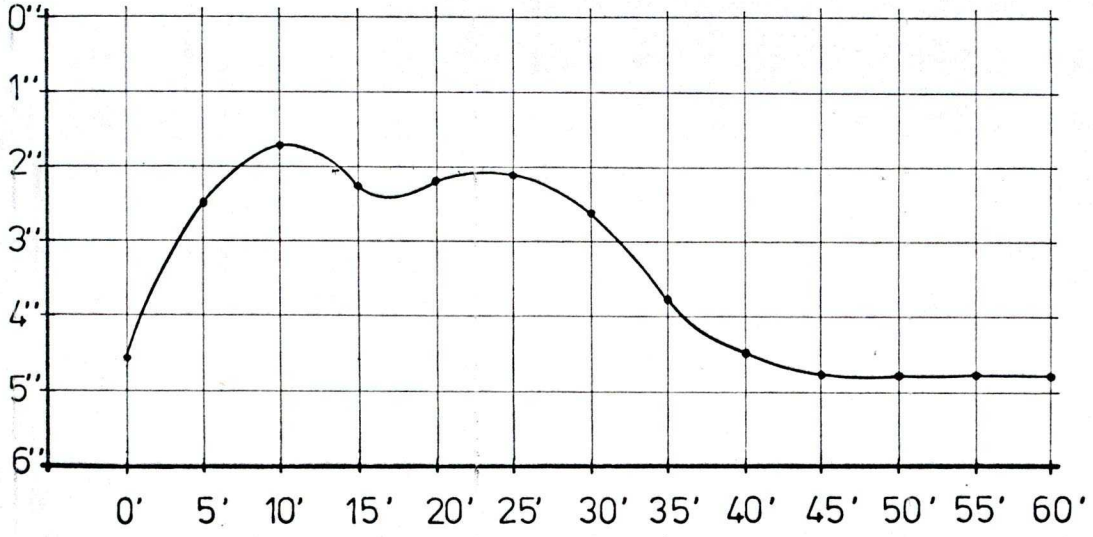
5. ábra

Tetrahymena pyriformis mozgássebességének változása az idő függvényében pH 4 értéknél.



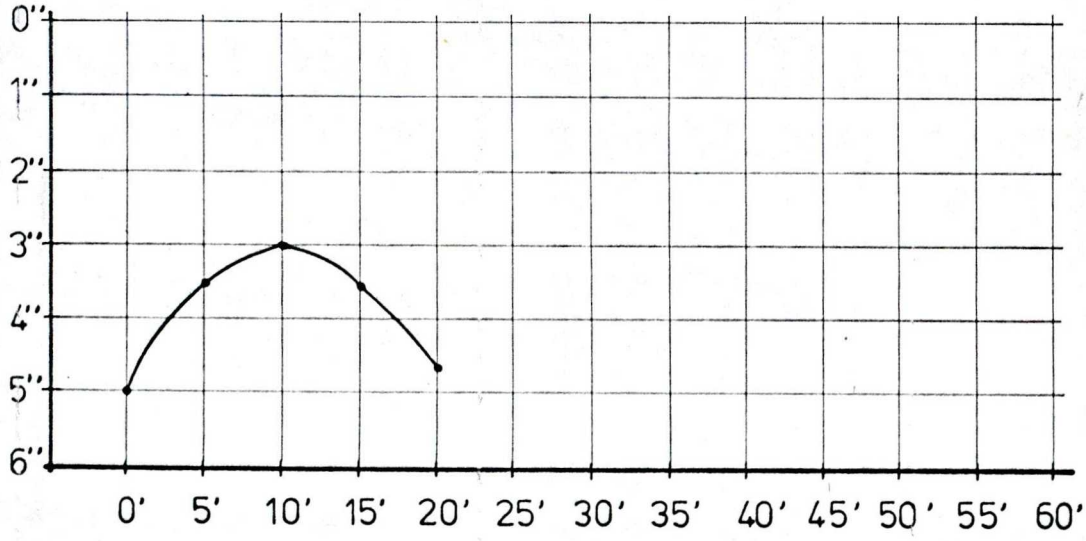
6. ábra

Tetrahymena pyriformis mozgássebességének változása az idő függvényében pH 9 értéknél.



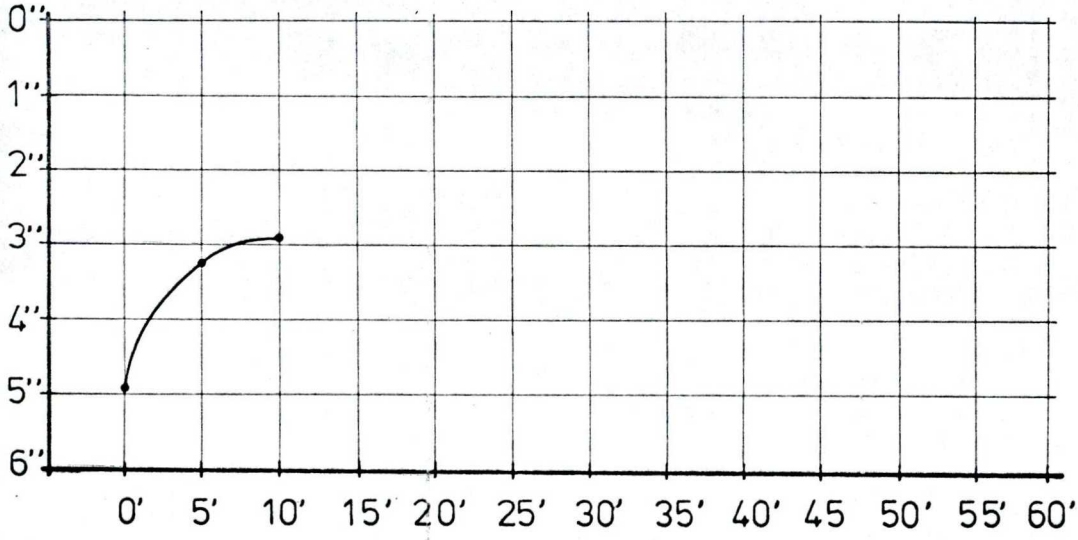
7. ábra

ATP-vel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgássebességének változása az idő függvényében pH 7 értéknél



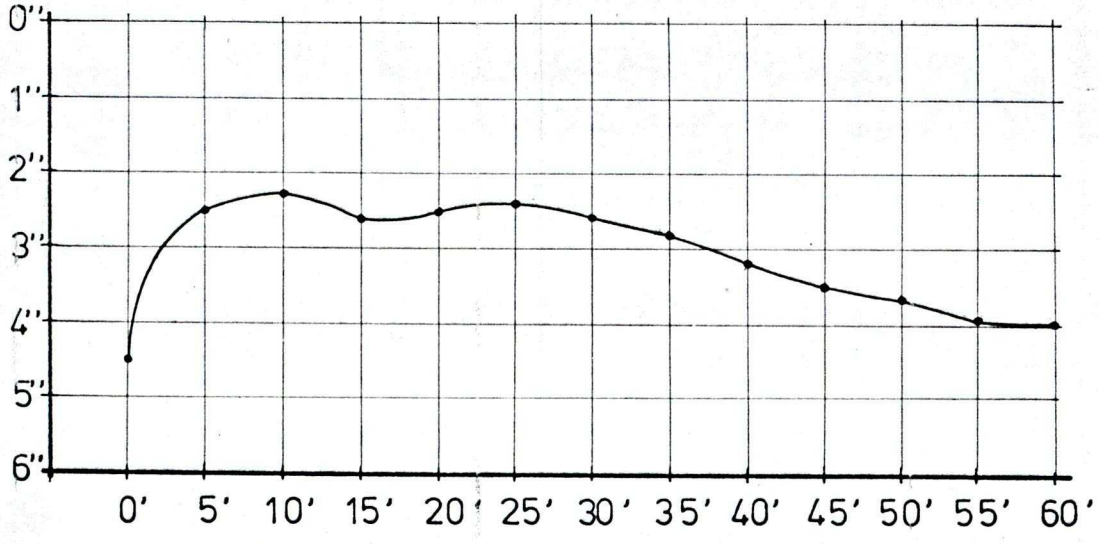
8. ábra

ATP-vel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgássebességének változása az idő függvényében pH 4 értéknél



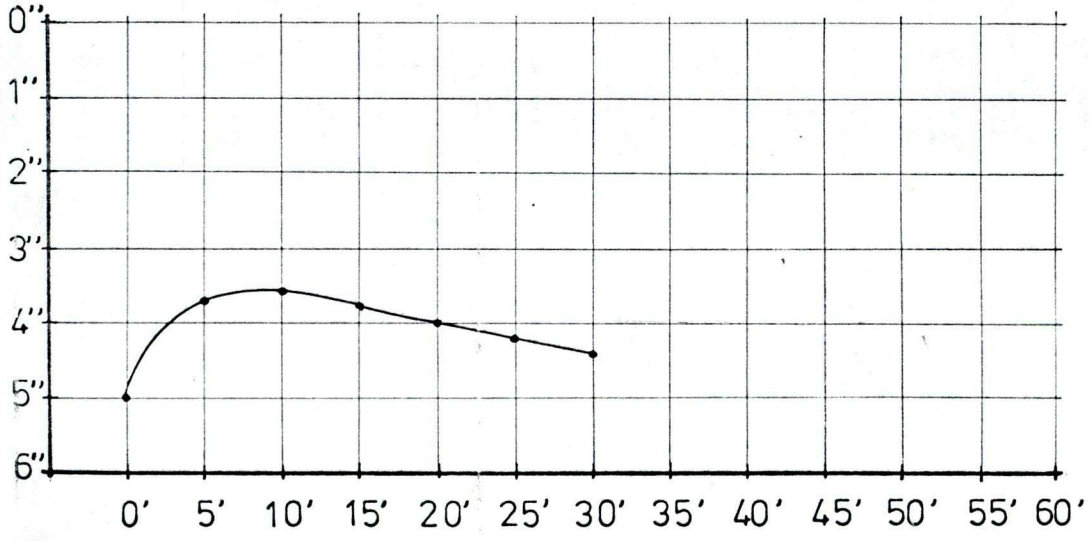
9. ábra

ATP–vel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgás-sebességének változása az idő függvényében pH 9 értéknél



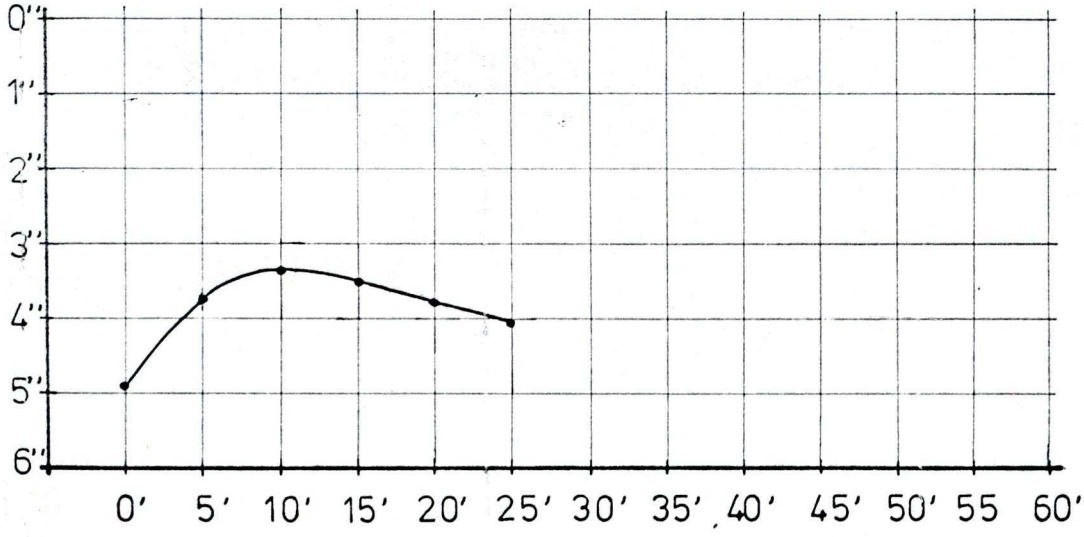
10. ábra

Ciszteinnel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgás-sebességének változása az idő függvényében pH 7 értéknél.



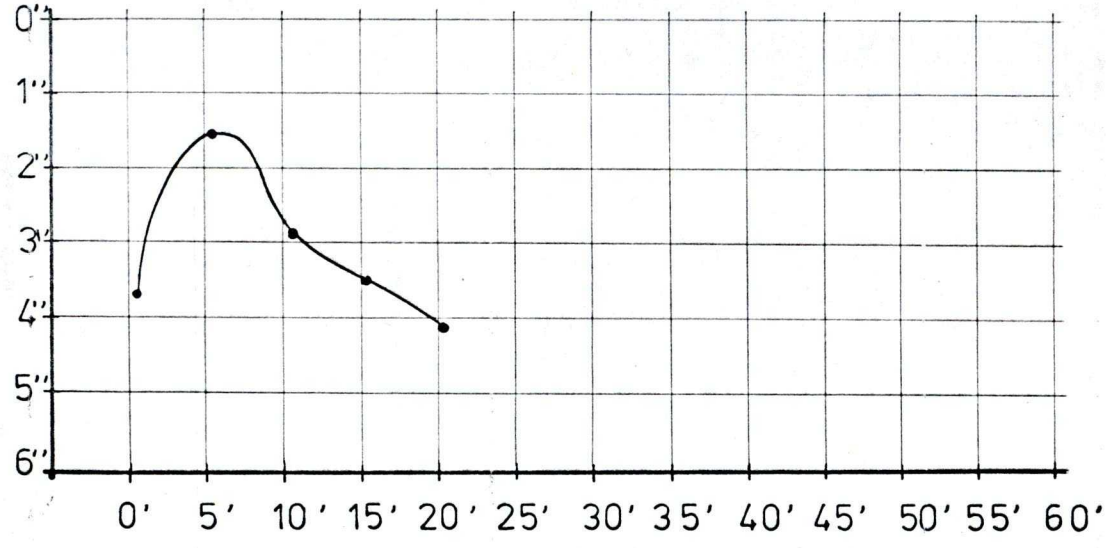
11. ábra

Ciszteinnel kezelt Tetrahymena pyroformis mozgás-sebességének változása az idő függvényében pH 4 értéknél.



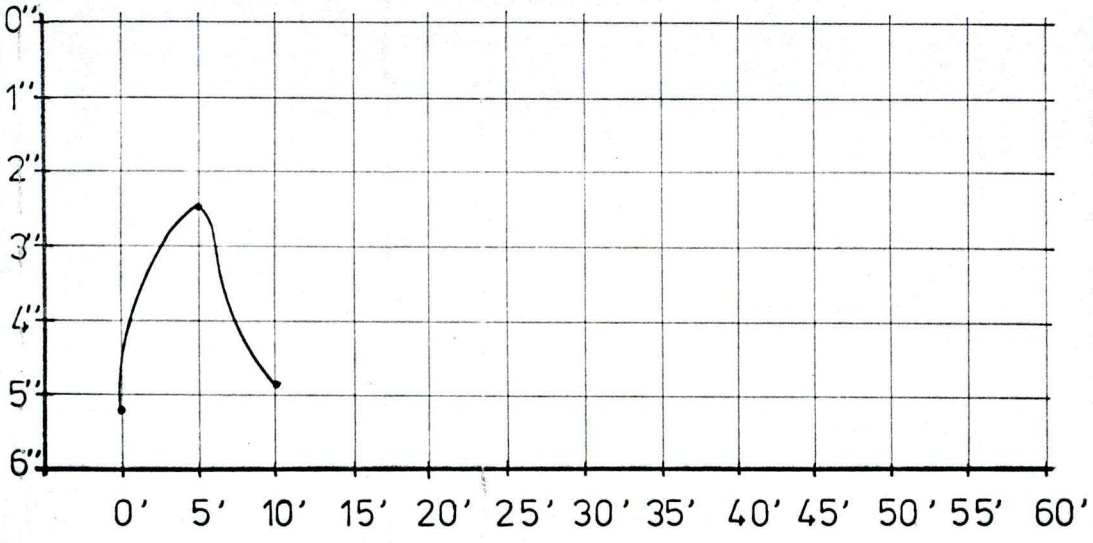
12. ábra

Ciszteinnel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgás-sebességének változása az idő függvényében pH 9 értéknél



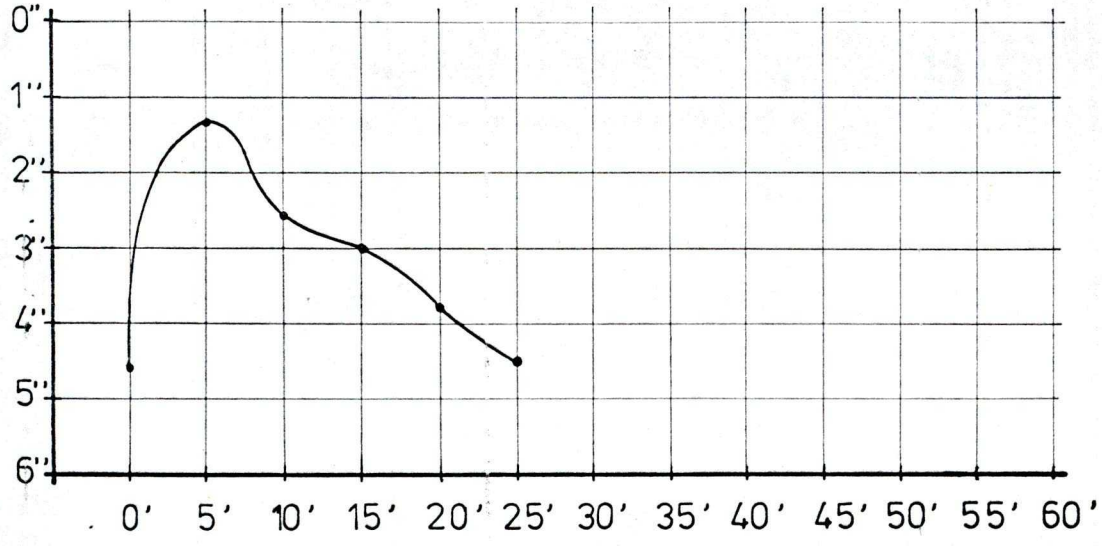
13. ábra

Tetrahymena pyriformis mozgássebességének változása az idő függvényében pH 7 értéknél Bengalveres jelenlétében.



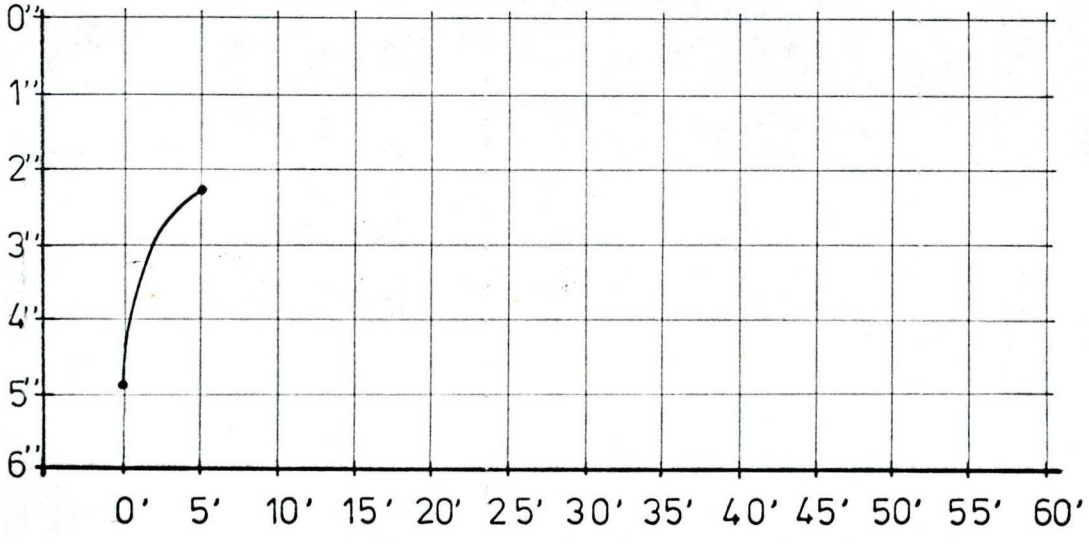
14. ábra

Tetrahymena pyriformis mozgássebességének változása az idő függvényében pH 9 értéknél Bengalveres jelenlétében.



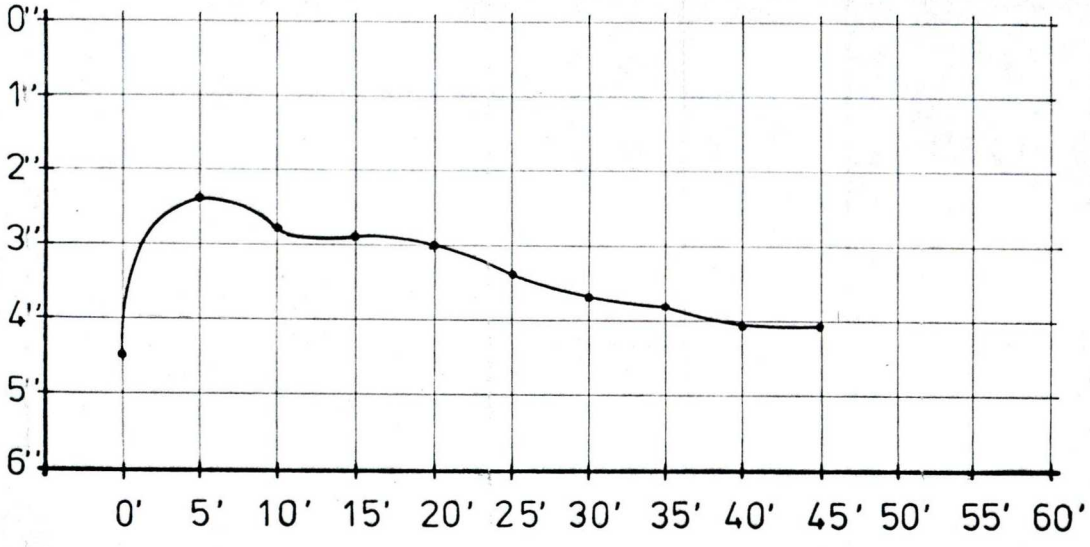
15. ábra

ATP-vel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgás sebességének változása az idő függvényében pH 7 értéknél Bengalveres jelenlétében.



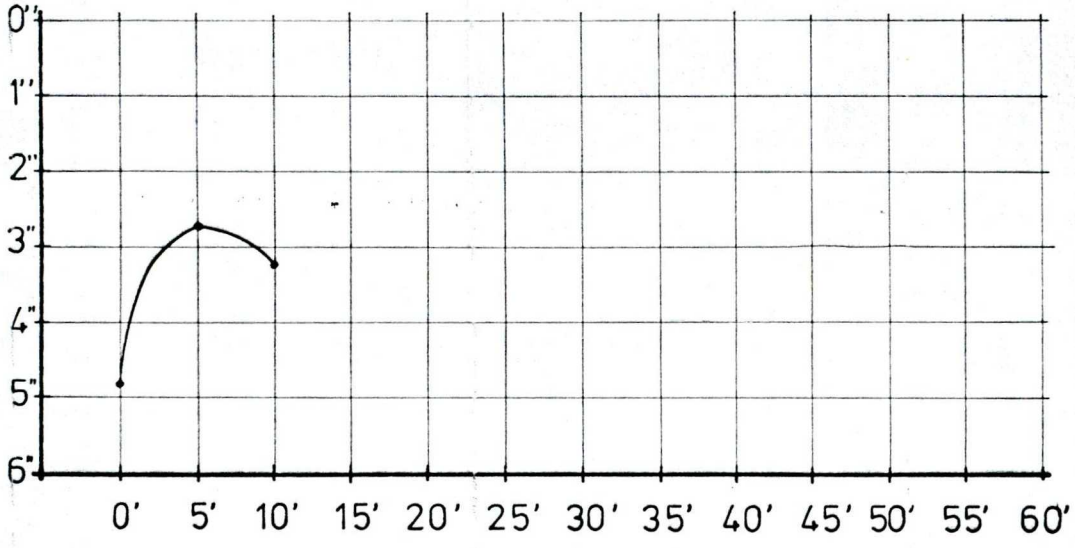
16. ábra

ATP-vel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgás-sebességének változása az idő függvényében pH 9 értéknél Bengalveres jelenlétében.



17. ábra

Ciszteinnel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgás-sebességének változása az idő függvényében pH 7 értéknél Bengalveres jelenlétében.



18. ábra

Ciszteinnel kezelt Tetrahymena pyriformis mozgás-sebességének változása az idő függvényében pH 9 értékben Bengalveres jelenlétében.

I. táblázat: Különböző pH értékeknél kapott mozgássebességi maximumok

pH	I.max.	II.max.
pH 4	3,5"	4,5"
pH 5	3,3"	4,2"
pH 6	2,7"	2,9"
pH 7	2,1"	2,3"
pH 8	3,0"	3,1"
pH 9	3,2"	3,3"

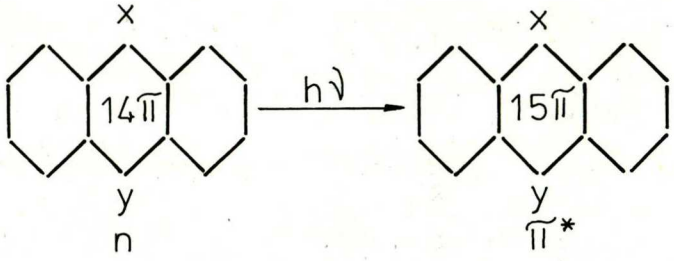
A feltüntetett értékek figyelembevételével megállapitható, hogy a pH 7 értéktől távolodva mind a savas, mind pedig a lugos tartomány felé haladva a mozgássebesség értékei csökkennek. Nagy esés tapasztalható a pH 7-nél mért értékhez viszonyitva az első savasabb és az első lugosabb tartományban az I. maximumok alatt. Ezután a sebesség csökkenés mérsékeltebbé vált. A táblázatban szereplő pH alatti, illetve feletti értékeket a kisérleti állatok nem tudták tolerálni.

III.

A FOTON GERJESZTŐ HATÁSA

A mérések eredményeit szemléltető grafikonok egyöntetüen azt mutatják, hogy az állatok mozgássebessége a rájuk ható monokromatikus fény hatására megnövekedett. Ez a tény azzal magyarázható, hogy az elnyelt fény az elektronakceptor alapvázzal rendelkező molekula elektronját gerjeszti, vagyis magasabb energiaszintre emeli, ami a mozgás felgyorsulásában jut kifejezésre.

A gerjesztő hatás elektronakceptor alapvázzal rendelkező molekulákat tételez fel, melyeket az elnyelt fény a szerveskémiában ismert $n \longrightarrow \pi^*$ tipusu elektron átmenet révén gerjeszt. /KASHA 1960, 1961/.



A gerjedés intramolekulárisan $n \longrightarrow \pi^*$ tipusu delokalizációnak felel meg. Maga a molekula kettőskötéseket tartalmaz. A konjugált molekulákat ugy jellemezhetjük, mint C-C vagy C-H atomok vázát, melyeket mozgékony π elektronok tartanak össze, s ezek hullámfüggvénye az egész molekulára érvényes.

A legalacsonyabb energiaszintü molekulapályák mindegyik alapállapotában 2 elektron foglal helyet ellentétes spin-nel. Ha a molekula teljes elektron - spinje 0, akkor singlet S, azaz alapállapotról beszélünk. A spin irányok S állapotban ellentétesek. Ha ez az S_o molekula fényt abszorbeál, az elektron az eredetileg elfoglalt pályáról egy magasabb energiáju u.n. betöltetlen molekulapályára ugrik. Ez az átmenet $\pi \longrightarrow \pi^*$ mely csökkenti a molekula stabilitását.

A gerjesztett elektron gyenge kötésben mozog, pályája kiterjedt, melyben valószinüleg egy külső elektrofil ágenst követ. Továbbá a megüresedett alapállapotu pályák ekvivalensek au u.n. "lyukakkal", "csapdákkal", hogy azok az elektront képesek legyenek befogadni /Exciton elmélet/. A gerjesztett állapotok mind oxidációs, mind pedig redukciós folyamatoknak felelnek meg a relativ redoxpotenciáltól függően.
Az elsődlegesen gerjesztett S_o állapot S_1, élettartama 10^{-6}, 10^{-10} secundum.

Ha a két spin iránya pararell, a molekula stabil. Ekkor a molekula teljes elektron spinje $h/2\pi$. Az ilyen molekulát triplet-nek T nevezzük. A triplet állapot hosszu életü, mert S_o-ra való átmenet nem jöhet

létre. A gerjesztett állapot során a heteroatom kötetlen elektronja átlép a konjugált rendszer molekulapályájának egyik üres helyére, melyet $n \longrightarrow \pi^*$-nek neveznek, s ez gyakran alacsonyabb energiáju, mint a legalacsonyabb $\pi \longrightarrow \pi^*$ gerjesztett S állapot. Biologiai rendszerekben érdekessége az $n \longrightarrow \pi^*$ állapotok sajátosságának, hogy hatásos alakként szerepelnek az $n \longrightarrow \pi^*$ és $\pi \longrightarrow \pi^*$ triplet állapotok létrehozásában /KASHA 1960/.
A gerjesztési energia, mely a deaktiváció által elvesznek, átalakulhat hosszu életü triplet állapottá, mely tartós voltánál fogva alkalmas a fényaktivált nagyobb mozgássebesség magyarázatára.

Tekintettel arra, hogy az energiaátvitel jelenségét a molekulán belüli elektromos töltések elmozdulása kiséri, melynek eredete visszavezethető a gerjesztés ideje alatt végbemont változáshoz, igy szükségszerüen idetartozik a biológiai rendszerek, mint félvezetők vizsgálata is.

IV.

BIOLÓGIAI RENDSZEREK MINT FÉLVEZETŐK

Több kisérleti adat és ezeket alátámasztó elmélet számol be arról, hogy a biológiai rendszerekben félvezető tulajdonságu anyagok vannak, mint például a fehérjék és a nukleinsavak /SZENT-GYÖRGYI 1941, 1946; WIRTZ 1947; LADIK 1963, 1964/.

SZENT-GYÖRGYI /1941/ szerint a fehérjék szerkezete olyan sáv-struktura kialakulását teszi lehetővé, mint például a kristályokban:

a telitetlen zóna vagy alapsáv
a vezetési zóna, és
a telitett zóna vagy gerjesztett sáv.

Azok az elektronok, melyek gerjesztés folyamán az alapsávból a gerjesztett sávba jutnak, képesek arra, hogy a fehérjemolekula egyik helyéről a másikra vándoroljanak, és elektrontranszfert hozzanak létre, sőt a fehérje molekulák összefüggő rendszert alkothatnak, több molekulára kiterjedő közös energiasávrendszerrel.

ELEY és LESLIE /1963/ rámutattak arra, hogy a molekula elektronrendszerében a π elektronok $\pi \longrightarrow \pi^*$ gerjesztésének megfelelően terjednek tova.

CARSWELL és munkatársai /1954/ szerint a vezetési sáv

triplet állapotnak felel meg. Vannak olyan vélemények is, hogy a vezetési sáv kollektivizálódott triplet szint, amely egyes molekulák szeparált triplet szintjeiből alakult ki /TERENIN 1957/. Ez a kérdés ma sincs pontosan eldöntve.

A szerves félvezetők energiasávjai eltérnek a szervetlenekétől. Szerves molekula esetén a molekula átlapolása kisebb, ezért az elektronpályák kevésbé kollektivizálódnak, a molekula pályák viszonylag izoláltak maradnak, s ez magaután vonja, hogy az elektronok tartozkodási lehetősége sokkal nagyobb a molekulában, vagy azok közelében, mint az intramolekuláris térben. A gyenge átlapolás azt eredményezi, hogy a vezetési sáv nagyon keskeny. A vezetési tulajdonság kialakitásában nagy szerepük van a π elektronoknak.

A π elektronokat tartalmazó szerves félvezetőkben a gerjesztés hatására triplet állapot jöhet létre, amelynek élettartama hosszabb a singlet gerjesztett alapállapoténál,

singlet állapot 10^{-9} sec

triplet állapot m sec - sec néhány

A singlet állapot időtartama rövid ahhoz, hogy biológiai folyamatokkal kölcsönhatásba kerüljön, a triplet állapot élettartama pedig lehetőséget nyújt erre.

Mc. CONELL /1956/ szerint a biológiai rendszerekben minden valószinüség szerint fellépő energiavándorlás mechanizmusában triplet exciton állapotok játszanak szerepet.

A hosszuéletü triplet gerjesztett állapot lehetővé teszi a fotooxidáció végbemenetelét. Ez a folyamat az állatok mozgásreakcióit alapvetően befolyásolja. Az emlitett folyamatban fontos szerepet tölt be a bengálveres. A festék jól ismert hatékony szenzitor. E tulajdonsága miatt érdemes megvizsgálni szerepét a gerjesztés folyamatában.

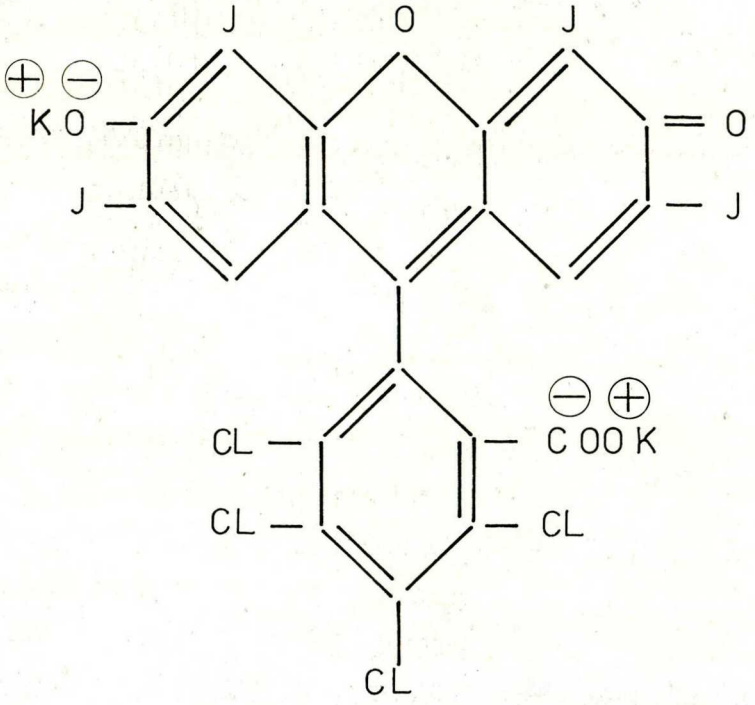
V.

A FESTÉK /BENGÁLVERES/ SZEREPE A GERJESZTÉS FOLYAMATÁBAN

A bengálveres fotodinam hatása szembetünő.

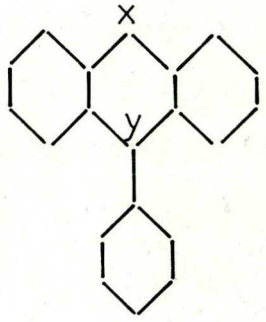
Összetétele és szerkezete:

Tetrajód-tetraklór-fluoreszcein káliumsója /vagy nátriumsója/ káliumsóval dolgoztam:



Biológiai hatása abban rejlik, hogy jól abszorbeállja a fényt. Ezt igazolják a 13. és 14. ábrákon feltüntetett mérési eredményeim. Továbbá O_2 jelenlétében oxidációs hatást fejt ki. Szerkezete miatt alkalmas arra, hogy metastabil állapotokra gerjesztődjék.

A festék alapvázа



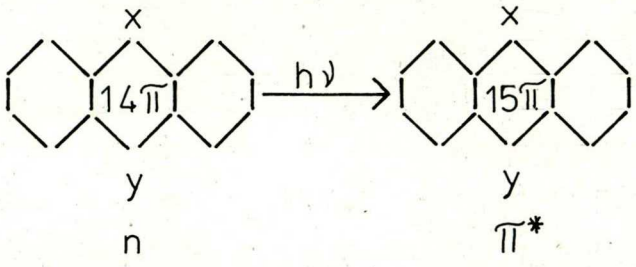
Ezek a gyürük vagy közvetlenül, vagy centrális atomok közvetitésével egyesülnek egymással. /C,N/.

A festék alapvázának benzolmagja van. A benzolmolekula vizsgálata során megállapitást nyert, hogy szénatomjai közti kötésátmenet az egyes és kettős kötés közt van. A kettős kötés eloszlik az összes szénatom közt, és a molekulaváz minden tagjához tartozik.

Az egyes kötést olyan elektronpárok hozzák létre, melyek spinjükben egymástól lényegesen különböznek. Ezek az elektronok a σ elektronok. Erősen kapcsolódnak a szénatomhoz és nem vesznek részt az abszorpcióban.

A kettős kötést két elektronpár hozza létre. Az egyik elektronpár σ elektronokat tartalmaz és σ kötést képez. A másik elektronpár a π elektron és π kötést képez. A π elektronok mindegyike kettős elektromos töltésfelhőt alkot. Egyik a molekula síkjának egyik, a másik a másik oldalán van.

Ezek után felirható a fényérzékenyitésre használt festék alapváza a gerjesztés folyamatában.



A gerjedés intramolekuláris $n \longrightarrow \pi^*$ tipusu delokalizációnak felel meg.

A π elektronok határozzák meg a festék optikai sajátosságait. Fény hatására sok festék jelentékeny fotovezetést mutat. Az elnyelt fény a festékmolekulát a már emlitett $n \longrightarrow \pi^*$ tipusu elektronátmenet révén gerjeszti. /KASHA 1960, 1961/. A gerjesztett állapotban a festék elektronaffinitása megnő és két-centrumu szabad gyökök keletkeznek. A reakció szilárd fázisban a következő fő termékeken keresztül zajlik le.

alap $\longrightarrow$ singlet* $\longrightarrow$ triplet $\longrightarrow$ gyök $\longrightarrow$ leukobázis

$S \longrightarrow S^* \longrightarrow T \longrightarrow R \longrightarrow L$

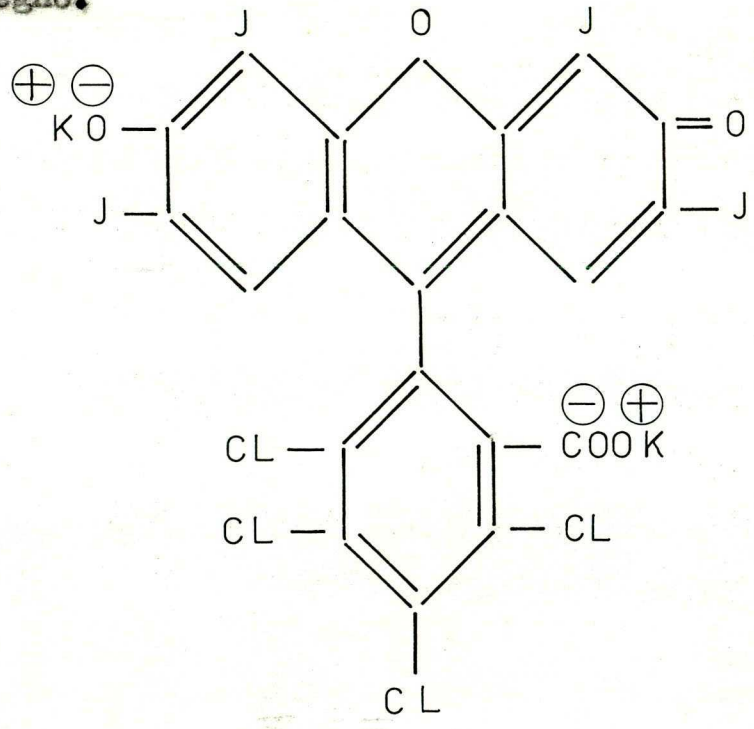
$^1\pi^*$..... $\longrightarrow$ $^3\pi^*$

Az $S^* \rightarrow S$ átmenet /fluoreszcencia/ nem kedvező, a bengálveres esetében a leukobázis pedig hatástalan.

Az $S^{*} \longrightarrow T \longrightarrow R$ reakciósor a lényeges /KUHN 1949, GROSSWEINER 1964/.

A 15 π elektronos szabad gyök igen stabil is lehet, ha nem tartalmaz donor csoportokat, még kristályositható is. A szubsztituált származékok gyökei igen reakcióképesek /McILWAIN 1937/, és egyensulyi gyök-koncentrációjuk körülbelül 3 nagyságrenddel a festék koncentráció alatt van. Ez a bengálveres esetében azt jelenti, hogy 10^{-10} M/liter szabad gyök hatásos. A hatáskifejtéshez bizonyos idő szükséges, ezért a metastabilis állapotok a kedvezők /ROSENBERG 1946/.

A reakcióképesség az intramolekuláris töltésátmeneten kivül a halogénezett xanténeknél pontosan a magasfoku halogenizációjuk miatt /bengálveres 50 % jódot tartalmaz/ megnő.



Ennek lényege, hogy a nehéz halogén a molekula singlet és triplet nivóit közeliti meg, és növeli az $S \longrightarrow T$ valószinüségét, emiatt vörös eltolódás lép fel.

Összegezve a reakció lezajlását:

1/ A festék adszorpcióval, illetve ionosan kötődik. Az adszorpciómellett szól az, hogy a festékek egyrésze adszorpciós indikátor.

2/ Tömör, majdnem szilárd rendszerben a metastabil gerjesztett állapotok számára a festékek kedvezőbbek /McRAE és KASHA 1958, BELLIN 1965/.

3/ Az S és T gerjesztett állapotok eltérő életideje mellett a gyök környezete is döntő.

A bengálveres OXIGÉN fotovezető, ugyanis fotoáramát az O_2 növeli. A fluoreszcein tipusu érzékenyitők O_2 igényesek /GROSSWEINER 1964, SZAZONYENKO 1965/.

A gyök akceptor tulajdonsága, hogy igen erős és kiemelkedően nagy redoxpotenciálu helyek jönnek létre. A festék igy elektronmediációra képes pontokat képez.

$$\begin{array}{ccccc} & & \downarrow h\nu & & \\ \text{Donor} & \longrightarrow & \text{Szenzitor} & \longrightarrow & \text{Akceptor} \\ /SH, H_2O/ & & n \longrightarrow \pi^* & & /\text{citokrómoxidáz } O_2/ \\ D & & S & & A \end{array}$$

A mechanizmus teljes pontossággal nem ismert, mert a festék tulajdonságai adszorbeált közegben sokszor erősen de nem elég ismert módon változnak. /BELLIN 1965, /KASHA 1959/.

VI.

A pH VÁLTOZÁS BEFOLYÁSA A FÉNYINDUKÁLT CSILLÓS MOZGÁSRA

A grafikonok különböző pH értékek mellett eltérő eredményeket mutattak. Épp ezért kivánatos, hogy megvizsgáljuk a pH-nak a fényindukált mozgássebességre kifejtett hatását.

Ismeretes, hogy az állat a mozgásához szükséges energiát a mitochondriumokból nyeri. Továbbá az is ismert, hogy a mitochondriumok igen labilis strukturák, ennélfogva a különböző hatásváltozásokra pl. a közeg pH-jának megváltoztatására szerkezetileg és funkcionálisan is károsodnak. Ugy gondolom, hogy a jelenségek magyarázatát illetően a mitochondriumoktól kell kiindulni.

Ismeretes, hogy a mitochondrium összetett membránrendszer, melynek felépitésében nagy szerepet játszanak az enzimek, melyek felépitésüket tekintve fehérjék.
Ez indokolja, hogy a következő megvilágitásban magyarázom az eltérő eredményeket:

A/ pH és enzim

B/ pH és polipeptidkonformáció

C/ pH és mitochondrium, valamint a membrán szerepe a folyamatban.

A. pH és az enzimek szerepe a folyamatban

Az enzimek az élő sejtekben vagy oldatban vannak jelen, vagy pedig a sejt valamelyik alkotórészében, igy a mitochondriális membránokba vannak beépitve /ROBERTIS 1958/. Igy a mitochondriumok savas pH-ju közegben történő károsodása enzimrendszerük károsodását is maga után vonja. A pH tehát eképen is befolyásolja az enzimek müködésének hatását.

SÖRENSEN /1909/, valamint vele egyidőben több más tanulmány is foglalkozott az enzimek által katalizált reakciók sebességének alakulásával a pH változások függvényében. Megállapitották, hogy az enzimek hatása minden esetben jelentősen függ a közeg pH-jától, még akkor is, ha szó sincs erősen savanyu, vagy lugos hatásról.

Bizonyos pH tartományokban az enzimhatás maximálisnak mutatkozik, ahol ez a jelenség megfigyelhető, az az enzim számára az optimális pH érték. Az állati szervezetek legtöbb enzimje pH 7 körül müködik optimálisan. Az itt leirtakat igazolják mérési eredményeim is, lásd 4.ábra.

Néhány enzim viszonylag éles pH optimumot mutat, más enzimek esetében ez az optimum több pH egységen át tart. Majdnem mindegyik enzim érzékeny a savas hatásokra, lásd 5. ábra és I. táblázat eredményeit.

Az élő sejtek esetében nem szükségszerű, hogy az enzimek pH optimuma azonos legyen az intracelluláris pH-val. Ennek következményeként a pH aktivitási görbe alakjának le vagy felszálló ága eltolódhat. /LEHNINGER 1970/.

A pH és az enzimaktivitás viszonyában a pH-nak azért van jelentős szerepe, mert az enzimfehérjék és egyéb hasonló proteinek többértékű dipoláris ionok, melyek disszociációját a közeg pH-ja befolyásolja. Valószínű, hogy a közeg pH-jának változása az enzim affinitásának változásához vezet, és ezt ingadozást vált ki a reakció sebességében.

B. pH és a polipeptidkonformáció szerepe a folyamatban

Mivel a biológiailag aktiv enzimek fehérje természetű anyagok, ezért érdemes a pH-nak a fehérjékre gyakorolt hatásait is megvizsgálni.
A fehérjék labilis anyagok lévén a pH változtatásának hatására elvesztik eredeti tulajdonságaikat, s ez mindig maga után vonja a fehérje szerkezetének megváltozását. Emiatt tartom szükségesnek, hogy egészen röviden de foglalkozzam a fehérje szerkezettel. is.

A fehérje elsődleges strukturáját a polipeptidlánc, a molekula gerincének aminósav összetétele, és sorrendje szabja meg.

Másodlagos struktúrája az α helix.

A polipeptidlánc helix formában van, s ezt a struktúrát H kötések stabilizálják. Azonban nem alkot minden peptidlán helix strukturát, mivel egy adott peptidlánc hajlandoságát stabil helix kötegek képzésére a láncban lévő R csoport természete, és szekvenciája határozza meg.

Ha az R csoport egy adott pH-nál nem rendelkezik töltéssel ott kialakul a helix struktura. Ahol az R csoport egy adott pH-nál negativ, vagy pozitiv töltéssel rendelkezik ott nem alakul ki az említett helix struktura.

Harmadlagos szerkezetét a peptidlánc térbeli orientációja szabja meg.

A legtöbb fehérje pH 4 alatt, illetve pH 10 felett denaturálódik.

Lásd I. táblázat.

A közbeeső pH értékek mellett a fehérjék finomszerkezete fokozatosan változik meg.

A denaturálódás hatására a fehérjék elvesztik biológiai aktivitásukat, ez a folyamat ugy megy végbe, hogy szerkezetük teljesen rendezetlenné válik. Mivel a denaturáció során a fehérjék peptidláncában a kovalens kémiai kötések nem törodeznek el, arra következtettek hogy a denaturáció a nativ fehérjemolekulában lévő

peptidláncok csavart strukturájának szétbontását idézi elő. Denaturált állapotban a polipeptidláncok szabálytalan hurkokat képeznek.
A másodlagos szerkezet megváltozása maga után vonja a harmadlagos szerkezet megváltozását is /KAUZMANN 1954/.
A denaturált fehérje másod- és harmadlagos szerkezetétől megfosztott rendezetlen polipeptidlánc lesz.
Alacsony pH-nál nem tudnak kialakulni azok a másodlagos szerkezeti erők, amelyek a megfelelő kovalens kötések létrejöttét biztositják. A rendezetlen fehérjékben az enzimek legtöbbje elveszti hatását.

Az enzimek többértékü dipoláris ionok. Ezek disszociációja függ a közeg pH értékétől, ha a pH érték változik ez eltéréseket okoz egy adott folyamat lezajlásában is.
Lásd 4., 5. és 6. ábrákon feltüntetett eltérő mozgássebességi értékeket.
Erősen savas közegben a fehérjemolekula töltése pozitiv, erősen lugos közegben pedig negativ.
A fiziológiás pH értékeknek megfelelő környezetben a fehérjemolekulák felületén, és belsejében intenziv elektromos erőterek uralkodnak, melyek a fehérjék szerkezetét meghatározzák. Az erőteret létrehozó töltések nem oszlanak el egyenletesen. A tényleges töltés-eloszlás és a polipeptidkonformáció közti összefüggés valószinü.

C. pH és a mitochondriumok, valamint a membrán szerepe a folyamatban

- Az állati sejt energiaközpontjai - a mitochondriumok anyagcseréjük fenntartásához állandóan felvesznek és leadnak anyagokat. Ez a cserélődés a mitochondriális membránon keresztül megy végbe. A mitochondriumok belső membránjában lokalizáltak az oxidáció, elektrontranszport, és a foszforiláció enzimjei.
Ez a membrán jelenti a mitochondriumok permeációjának barrierjét. A membrán rendszeren keresztül bonyolódó aktiv transzportrendszernek igen nagy szerepe van az előbb említett mitochondriális anyagcsere szempontjából. Dolgozatomban mégsem részletezem az egész folyamatot, csak a foszfátpenetrálást befolyásoló tényezőket ismertetem röviden.

MITCHELL és MOYLE /1969/ megállapitásai szerint a membránon át lezajlodó foszfátpenetrálódás a pH függés eredménye is. Ebben a folyamatban a membránon keresztül kialakult H^+, illetve OH^- gradiens szerepel.
Az extramitochondriális foszfát

1/ vagy az intramitochondriálisan felesleges OH^- anionokkal cserélődik ki,
2/ vagy az extramitochondriálisan feleslegben lévő H^+ ionokkal együtt transzlokálódik.

Kimutatták, hogy foszfátfelvétel alkalmával a matrix pH értéke csökken. Foszfát kiáramláskor pedig az intramitochondriális pH emelkedik.

A pH eltolódása lassitja a foszfát belépését, és ezáltal hatással van az energiaátalakulási folyamat lezajlására is. Vizsgálataim esetében ez a jelenség a mozgássebességet befolyásolta.

Az előbbi szerzőkre való hivatkozással szeretném hangsulyozni, hogy a foszfátpenetrálódás sebessége pH 8 felett lényegesen nagyobb volt a pH 7 alatt mért sebességnél.

VII.

AZ ATP KÉPZŐDÉSÉNEK MECHANIZMUSA ÉS SZEREPE A FÉNYINDUKÁLT CSILLÓS MOZGÁSBAN

Az ATP-vel kezelt állatok mozgássebességét regisztráló grafikonok eredményei alapján megállapitható, hogy az ATP befolyásolja az állatok mozgássebességét. Ezeknek az eredményeknek alátámasztása végett foglalkoznunk kell az ATP szerepével, élettani hatásával.

Ismeretes, hogy az ATP mint magas energiatartalmu vegyület a mitochondriumokban szintetizálódik, és raktározódik. Ismeretes továbbá az is, hogy a mitochondriumok tubulusai fény hatására károsodnak, s ezt a károsodási folyamatot a szenzitorok még felfokozzák /BICZÓK és PÁRDUC 1970/. Joggal várható, hogy ennek következményeként az állatok mozgássebessége csökken.
Ez a feltevés indokolja az ATP-vel való kezelés és a mozgás közt fennálló összefüggés vizsgálatát.

A fentemlitettek alapján világossá válik, hogy a sejtek müködéséhez szükséges energiát a mitochondriumok szolgáltatják, ezek tehát a sejtek energia központjai. A mitochondriumok ATP képző funkciója szoros kapcsolatban áll strukturájával, ezért szükséges, hogy néhány idevonatkozó adattal röviden foglalkozzam.

A mitochondriumok mind az egysejtüek, mind pedig a soksejtüek citoplazmájában szemcse, vagy fonálszerü képződmények formájában találhatók. A sejtben mindig azon részek közelében helyezkednek el, ahol energiára van szükség, igy az ATP-t igényló összehuzó elemhez könnyen diffundálódik. A mitochondriumok a citoplazma térfogatának relative nagy részét tehetik ki, pl. májsejtben ez az arány 22 %.

Szerkezete szempontjából bennünket a belső membrán érdekel a legjobban, ezenkivül tartalmazza még a külső membránt és a matrixot.

Külső membrán: nem tartalmazza a légzési lánc egyetlen komponensét sem. Olyan enzimek találhatók benne, melyek a belső membránban nincsenek, pl. monoaminoxidáz, mely különböző monoaminok pl. triptamin oxidációját katalizálják.

Matrix: jelzőanyagokat tartalmaz;
dehidrogenázt
fumarázt
akonitázt.

Belső membrán: citochromoxidázt
citochrom A,B,C-t

Továbbá ATP-ase aktivitás, oxidativ foszforilálás, succinát és NADH dehidrogenáz aktivitásának mechanizmusával

SZEGED

kapcsolatos. A membrán fehérjetartalmának 20-25 %-a enzimatikusan aktiv fehérjékből áll, melyek az elektron - transzportban, oxidativ foszforilációban jelentősek. Ilyen enzimek pl. a flavoproteinek, citochromok, melyek az ATP képzésében vesznek részt.

Az ATP képződésének folyamata:

Képződéséhez két alapvető anyagra az ADP-re és foszfátra van szükség. Ezekből szintetizálódik az ATP a belső membrán elektrontranszportrendszere /légzési lánc/ segitségével.

A gépzési lánc alkotórészei: két flavoprotein enzim,
négy citochrom,
nem hem. tipusu vas,
réz és koenzim .

A lánc mentén három helyen transzformációs mechanizmusok vannak, ezek az elektronpárból felszabaditott energiát használják fel ahhoz, hogy ATP-t szintetizáljanak. A légzési lánc a mitochondriumok legfontosabb energiaátalakitó berendezése. Alkotórészei funkciónálisan és szerkezetileg is szoros kapcsolatban állnak a mitochondriumok szerkezeti elemeivel. Feltételezik, hogy a légzési lánc három pontján elektronok kerülnek át az enzimekre, igy jön létre az emlitett folyamat.

Itt emlitem meg a mitochondriumok bonyolult enzimrend-

szere közül az ATP-aset, mivel ez a terminális foszfát-kötést hasitja. Az ATP molekula hasitása során a mitochondriumok több száz vizmolekulát tudnak aktivan kipréselni magukból. Feltételezik, hogy a mitochondriumok tartalmaznak egy kontraktilis fehérjét is, mely az ATP jelenlétében összehuzódik, mint pl. az izomban az aktomiosin. /ROBERTIS 1958/. Ugyancsak az összehuzódással kapcsolatban feltételezik, hogy ebben a folyamatban azok az enzimek játszanak szerepet, melyek a foszfátok az ADP-hez kapcsolják az ATP-vé alakulás során; ezek az u.n. "mechano-enzimek" /ROBERTIS 1958/.

A mitochondrium membránok áteresztőképességével kapcsolatban ismert, hogy a külső membrán a legtöbb kismolekuláju anyag és oldat számára könnyen átjárható.

A belső membrán csak a viz és különböző kicsi semleges molekulák számára permeabilis. Mivel a belső membrán a NAD^+, $NADP^+$, NADH és NADPH, coenzim A számára átjárhatatlan, ilymódon a mitochondrium belső ürege ezeknek az anyagoknak mintegy "belső lerakóhelyét" képezik, melyek fizikailag elválaszthatók és funkcionálisan is megkülönböztethetők a citoplazmás lerakóhelyektől.

Megállapitották, hogy a belső membrán különböző szállitóanyagokat tartalmaz, melyek bizonyos anyagokra speciálisak lehetnek, ugyanakkor speciálisan gátló hatást is ki-

fejthetnek. Patkánymájon végzett kisérletek során megállapitották, hogy az ADP és ATP számára szolgáló vivőanyag közös. Az ADP és ATP a belső membránon egyszerü diffuzióval nem vándorol át, csak vivőanyaggal. Ezt a vivőanyagot vizsgálva megállapitották, hogy igen nagy affinitással bir az ADP és ATP számára, telitettségi jelenséget mutat és rendkivül specifikus, mivel más XTP, XDP pl. GTP GDP transzfert nem segit elő.

MITCHELL feltevése szerint az ATP-ase, mely képes a vizet eltávolitani az ADP-ből és a foszfátból orientáltan helyezkedik el a mitochondriális membránon olymódon, hogy a H_2O-t és ADP-ből és foszfátból H^+ és OH^- formájában távolitja el.

Az előzőekben már utaltunk arra, hogy a mitochondriumok mind az egysejtüekben, mind pedig a soksejtüekben egyaránt fellelhető képződmények. Tekintettel arra, hogy kisérleti objektumom a Tetrahymena pyriformis csillós egysejtü, és ismeretes az is, hogy szinte minden csilló bázisánál megtalálhatók az ovális mitochondriumok, nyilvánvalónak látszik, hogy a szubsztráthoz adott ATP befolyást gyakorolt a csillós mozgásra is. Ezt igazolják a 7., 8., 9., 15., 16. ábrák eredményei.

Az ATP hatása a fényindukált csillós mozgásra:

A Tetrahymenán, valamint más egysejtü állatokon nagyszám-

ban találhatók csillók, melyek a sejtet környezetében aktiv helyváltoztatásra késztetik. E sejtmozgás a sejtaktivitás legobjektivabb jele.

A csillós mozgás energiafogyasztó folyamat, melynek során a felszabaduló energiát a sejt mechanikai működésre használja fel. Az ATP itt is mint energiadonor szerepel, melynek következtében a csillók mozgása az ATP függés eredménye, mely alaki változást hoz létre a függelék /csilló/ egész hosszában. Ebben az energiát igénylő folyamatban a bazális testecskék /kinetosomák/ energia - transzferálóként szolgálnak, pl. ha csillókat izolálunk és ehhez ATP-t, valamint Mg_2-t adunk, olyan hullámszerü mozgás tapasztalható, mint az érintetlen sejt csillóin, amikor az ATP ADP-re és foszfátra hidrolizál /LEHNINGER 1962/.

A csillók szerkezetének ismeretében megállapitható, hogy a hidrolizis a külső filamentum A alrostjához tapadó karokban lokalizálódik. Vizsgálatok során fényt derítettek arra, hogy a karok, melyek a külső filamentumok A alrostjához kapcsolódnak ATP-ase aktivitással birnak.

Annak a mechanizmusnak a létrejötte, mely a csillók hullámszerü mozgását előidézi nem ismeretes pontosan.
Az ATP hatására kapott intenzivebb mozgássebességi gürbe eredményeit könnyebben tudjuk magyarázni ugy, hogy az ATP

molekula sugárhatásra aktiválódott. Tekintettel arra, hogy az ATP vizes oldatban fejtette ki aktiváló hatását, az oldatban történő átalakulásnál a felszabaduló energia megkötésére lehetőség van. Feltételezhető, hogy a vizes oldat miatt a sugárzás indirekt uton hatott az ATP-re. Ennek az utnak a lényege, hogy a változást előidéző sugárzó energiát nem az ATP abszorbeálta, hanem ennek a környezetében lévő valamilyen más molekula, és valamilyen mechanizmussal közvetittette az ATP-re. Az ATP vizes oldatában jelen lehet O_2, N molekula, esetleg fémionok. A vizes oldgtban a vizmolekula abszorbeálja a sugárzó energiakvantumot /ionizáló sugárhatás/.

Sugárzás hatására az ATP molekula fokozottan hasithatóvá válik vizes oldatban. Ez azért történik meg, mert a sugárzás hatására a vizből keletkező valamely oxidativ radikális épiti be a struktúrába az általa abszorbeált energiát /GARAY 1960/.

Dolgozatom során már emlitettem, hogy a vizsgálatok alatt bizonyos mértékü fotodinam károsodás ment végbe a sejtben, mely a mozgás folyamán észrevehetően nyilvánvalóvá vált. Ez a károsodás elsősorban a mitochondriumokat érintette, ami az ATP szintézis szempontjából döntő jelentőségü. A felgyorsult fényaktivált mozgás hanyatlása nyilván az ATP utánpótlás elmaradásának következménye.

Megerősiti ezt a tényt, hogy a fotodinam károsodással együtt jelentkező mozgássebességi hanyatlás párhuzamban van az O_2 fogyasztás hanyatlásával. /BICZÓK 1972/.

A fotodinam károsodások kivédésére használtam méréseim során a ciszteint, mint jól ismert sugárvédő anyagot.

VIII.

A CISZTEIN HATÁSA A FÉNYINDUKÁLT CSILLÓS MOZGÁSRA

A cisztein kéntartalmu aminósav, amely a fehérjemolekulán belül szereplő kötések jellegének kialakitásában, továbbá az SH csoport jelenléte miatt a kémiai sugárvédelemben jelentős szerepet játszik. Ez utóbbi tulajdonsága alapján használtam fel, ugyanis alkalmas arra, hogy a káros sugárváltozást kivédje, illetve létrejöttét meggátolja, esetleg visszaállitsa a korábbi strukturális helyzetet.
Ezeket igazolják a 10., 11., 12., 17., és 18.ábrák, elnyúlt, laposabb grafikonjai is.

Korábban az SH tartalmu anyagok által kifejtett sugárvédelmet egyértelmüen fiziko-kémiai hatásmóddal magyarázták /anoxia, gyökfogás, H átadás/. Ezek az elképzelések különböző kémiai rendszerek sugárkémiai tanulmányozásán alapultak. A tapasztalatokat mechanikusan átvitték, illetve értelmezték a sejtbiológiai rendszerekre is, figyelmen kivül hagyva, hogy a sugárvédő vegyület és a sejtalkotók pl. az enzimek közt is lejátszódhatnak olyan folyamatok, melyek a sejtek anyagcseréjét, fiziológiai állapotát befolyásolják, függetlenül a besugárzás közben lejátszodó

fiziko-kémiai hatásoktól.

A sejtekben lezajló sugárvédő hatás nem csupán egyszerü fiziko-kémiai folyamat. Erre KOHN és GUNTER utaltak először 1959-ben.
1966-ban HERNÁDI és munkatársai megállapitották, hogy az SH tartalmu sugárvédők, de főleg a cisztein hatása két összetevőre bontható, az előbb emlitett

1/ fiziko-kémia-, és
2/ metabolikus hatásra.

A fiziko-kémia hatás szerintük független a sejt fiziológiai állapotától. Akkor is kifejlődik, ha a sugárvédő anyagot közvetlen a besugárzás előtt adják.

A metabolikus hatás már függ a fiziológiai állapottól, és akkor jön létre, ha a sugárvédő anyagot - jelen esetben a ciszteint - a vizsgálat, illetve a besugárzás megkezdése előtt 60 perccel adjuk.

JELLUM /1966/ KOLLMAN /1967/ kimutatták, hogy az SH tartalmu anyagok az aminocsoporton át kötődnek a DNS foszfátjához, s igy tulajdonképpen a DNS van védve a sugárhatás ellen.
Igy beigazolódott GRAEVSKY azon feltételezése, hogy a biomolekulák regenerálódását nem gátló tiolok, hanem az igen lebilis SH csoportok okozzák, melyek a tiol

gátlószerek hatására bekövetkező diszulfid redukció eredményei.

A sejt energiaközpontjául szolgáló mitochondriumok igen érzékenyen reagálnak a diszulfidokra. DACQ /1965/ vizsgálatai szerint hatásukra a mitochondriumok morfológiai változást szenvedhetnek /duzzadás/. Korábbi elképzelések során azt go ndolták, hogy a diszulfidok áthatolása a mitochondriális hártyán egyszerüen végbemenő folyamat. Erre a jelenségre irányuló vizsgálatok alapján megállapitották, hogy a mitochondriális hártyák csak bizonyos körülmények között járhatók át a diszulfidok számára. Energiagazdag vegyületek nagy koncentrációja esetén a diszulfidok nem képesek áthatolni, látszólag nincsenek hatással a mitochondriumokra, nem látszik duzzadás.

Ha a mitochondrium kis energiaállapotba kerül, /melyet az éheztetéssel értünk el/ az áthatolási gát megszünik, s a hártyáján való áthatolás lehetővé válik. Ennek következtében a diszulfid kölcsönhatásba lép a hártya SH csoportjával, s azt még áteresztőbbé teszi. A diszulfidok mitochondriumok által megfelelő szubsztrát jelenlétében gyorsan redukálódnak megfelelő tiolokká. A diszulfid redukció mechanizmusa a lipidsavak tiolcsoportjainak kémiai cserélődésével kapcsolatos, mely a mitochondriumok α -keto-glutarátq és piruvát dehidrogenáz komplexeinek része. Ezek a dehidrogenázok

hatásosan redukálják a különböző diszulfidokat.
A kénvegyületek sugárzásgátlóképessége, és a mitochondriumokra való hatása között párhuzam áll fenn. A gátlószerek tiol formája ellentétben a diszulfid formával kicsi, vagy semmilyen hatást nem mutat a mitochondriumokra. Ezekből az adatokból az a következtetés vonható le, hogy a mitochondriumok fontosak a sugárzásgátló anyagok biokémiai mechanizmusának felderitésében. Valószinünek tartják, hogy a sugárrezisztencia fokozódása azoknak az anyagcsere - változásoknak, fehérje, nukleinsavanyagcsere, enzimfunkciók reverzibilis gátlása következményeként jön létre, melyek a sugárvédő jelenlétében létrejönnek /FILIPPOVICH és munkatársai 1970, 1971/.
Ezeket a változásokat pedig a cisztein már kis mennyiségben is létrehozza.

IX.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Korábbi kutatások /BICZÓK 1969/ és saját vizsgálataim is azt mutatták, hogy a Tetrahymena pyriformis GL egyedeit a fény erősen befolyásolja. Ennek legjellemzőbb megnyilvánulása a mozgássebesség megváltozása. A változást grafikusan kétcsucsu görbe fejezi ki a legvilágosabban. Ez némileg GIESE és munkatársa által UV hatásra a Paramecium caudátumnál nyert görbére emlékeztet /1966, 1967/. Mivel a görbe alakjából messzemenően következtetni lehet a sejtben végbemenő molekuláris változásokra, valamint a fizikai és kémiai folyamatokra, fontosnak tünik annak hangsulyozása,hogy Giese-ék UV aktivált mozgássebességi görbéje egycsucsu. /GIESE,SAIER 1966/. Annak ellenére, hogy a nevezettek kitünő metodikával dolgoztak, hogy vizsgálataikat stroboszkópos megfigyelésekkel egészitették ki, az a benyomásunk, hogy a második mozgássebességi maximum "a nyomjelzős" módszer statikus értékelése közben "sikkadt el". Ez a feltételezésünk annál inkább jogos, mert LÁBAS /1966/ a kagyló lárvák fényindukált héj nyitódásának és záródásának tanulmányozása közben a záróizmok kontrakciójánál szintén kétcsucsu görbét nyert.

A mozgássebességi görbe alakulását érzékenyitők, igy az általam használt bengálveres, erősen befolyásolta, kifejezettebbé tette, igy annak természete jobban megérthető, megközelithető. Figyelemreméltó, hogy az erősen fotodinam festék a használt magasnyomásu higanygőzlámpa fénye mellett a tulélést gyakran 15-20 percre csökkentette, s a mozgássebességi görbe leszálló ágát feltünően meredekké tette. Az emlitett második maximumot nem tüntette el, azonban megrövidült az elős maximum kialakulásának ideje. A görbének ilyen alakulása az időintervallumok alapján semmikép sem magyarázható fotoindukált membránpotenciál változásokkal. Az izom és ideg fotoindukált jelenségeinél/HERTEL és PANGELOVA 1904, CHALAZONITIS, 1964; LYUDKOVSKAJA, 1966; VOLPE, 1966; LÁBAS 1966/ főként a membrán jelenségekre hivják fel a figyelmet, bár a szenzitor és a citochrom rendszer kapcsolatán keresztül már a mitochondrium funkciója s a kontrakció összefüggésének kérdését is érintik /LÁBAS 1966/. Ilyen korreláció lehetősége a csillangó mozgása és a mitochondrium szerkezete, valamint müködése között is lehetséges. Ezt a lehetőséget kisérleti tények támasztják alá. A fotodinamikus festékkel kezelt Tetrahymenáknál ugyanis nemcsak a citoplazmában, hanem a mitochondriumokban is károsodások léptek fel /BICZÓK és PÁRDUCZ, 1970/, s annak mértéke kapcsolatban hozható

a mozgássebesség változásával /BICZÓK, 1969/.
Ezek a kisérleti eredmények arra késztetnek, hogy a Tetrahymena pyriformis csillós fényindukált mozgássebességváltozását befolyásoló tényezők hatásmechanizmusának értelmezésénél különös figyelemmel legyünk a mitochondriumokra.

1. A pH hatása a mozgássebességre

Régóta ismert megállapitás, hogy a Protozoák mozgása és a pH értékek változása között szoros összefüggés van. Megfigyelték, hogy az Amoeba proteus pl. megfelelő sókeverék mellett pH 6,2 és pH 7,5-nél mozog maximális sebességgel, de ha a sókeverék kationjai Na^{+}, K^{+} és Ca^{++}-ból álltak, akkor csak egy pH-tól függő maximum alakult ki. Ilyen pH-tól függő kettős maximumról a csillósoknál nem tudunk, s magunk sem tudtunk kimutatni. Viszont több olyan adatot nyertünk, hogy a csillók tevékenysége is nagyban függ a külső médium pH-jától, sokkal inkább, mint más ionok koncentrációjától. A növekvő H-ion koncentráció a csillók tevékenységét bizonyos határon túl teljesen megbénitja /YONGE, 1925; CHASE és GLASER, 1930; NOMURA, 1933/. ROBERTIS kézikönyve hangsulyozza /1965/, hogy a mitochondriumok savanyu pH mellett hajlamosak a széttöredezésre, s ilyenkor vesikuláris alakban jelennek meg.

Amikor az általam észlelt pH-tól függő mozgássebesség-változásokra utalok, nem is annyira ezekre a durva elváltozásokra gondolunk, bár egyáltalán nem lehetetlen, hogy a pH 7 alatti savasabb értékek fokozhatják a mitochondriumok károsodását. Tény az, hogy a legkedvezőbb, illetve legmagasabb mozgássebességi görbéket pH 7 és körülötte lévő értéknél nyertem. Ettől az értéktől a savas és a lugos irányba távolodva a mozgássebesség fokozatosan csökkent. A pH 4 alatti és a pH 9 feletti értékeket a Tetrahymenák már képtelenek voltak tolerálni. Nem pusztultak azonnal el, de érzékelhető mozgást már nem mutattak.

Közismert, hogy a mitochondriumok az egysejtűek szervezetében is tartalmazzák a Szentgyörgyi - Krebs trikarbonil ciklus valamennyi enzimjét, s azokat, mint fehérje természetű anyagokat a pH változások erősen befolyásolják /SÖRENSEN, 1909/. PAULING és COREY ezt a hatást a polipeptid konformációk megváltozásával hozzák összefüggésbe. Megváltozik az enzimek disszociációs készsége is.

A fehérjék konformációs változásának és a mozgássebesség alakulásának kapcsolata az enzimhatásokon keresztül érvényesül. Az enzimeknek ugyanis megvan a maguk pH optimuma, melynél legkedvezőbben tudják hatásukat érvényesíteni. Nyilván ezzel függ össze az, hogy a pH 7-es értéknél mértem a legkedvezőbb mozgássebességet. Az érzé -

kenyitett állatok reakcióinál természetesen nem hagyható figyelmen kivül a festék kötödésének pH-tól való függése sem. Az enzimek, polipeptidek konformációváltozásával ugyanis jelentősen megváltozik a festék adszorbciós képessége /HAUROWITZ, 1950; GOLDACRE, 1950; JONES, 1966/, s ezzel az energiagerjesztés és tovaterjedésének lehetősége is van. E tekintetben a nukleinsavak sem hagyhatók figyelmen kivül, főleg az RNS. Ennek a kapcsolata a mozgássebességgel azonban távolabbi kutatási cél lehet.

2. Az ATP hatása a mozgássebességére

Az élők mozgásának alapja az az energia, amely az ATP molekulákban halmozódik fel. Ez képviseli azt a hajtóerőt, mely az ATP-nek az Amoebába való iniciálása után fokozza a citoplazma áramlási sebességét, és ezáltal fokozódik helyváltoztatási sebessége is. /KRISZAT, 1949, 1954/.

Az ATP közvetlenül befolyásolja a csillók működését is. Ha ugyanis glicerinnel extrahált csillókhoz ATP-t adtak azok percekig, néha órákig ritmikusan ütöttek.

10^{-5}, vagy 10^{-4} Mol. conc.-ju ATP hatására a Paramecium multimicronucleatum mozgássebessége nőtt, mivel fokozódott a csillók ütésének sebessége. 10^{-3} Mol. conc.-ju oldata ugyanakkor csökkentette a csillók ütésének sebességét.

Az itt emlitett eredmények kétségtelennné teszik, hogy a csillós szervezeteknek, igy a Tetrahymena pyriformisnak tartós mozgásához, mozgássebességének fokozásához ATP szükséges. Ezt igazolja az is, hogy ha az ATP-ase-t chloralhidráttal bénitották a Tetrahymena mozgása inaktiválódott./BURNASHEVA, 1967/. Mindebből az következik, hogy a mitochondrium állapota és a csillosok mozgássebessége között joggal kereshetjük az összefüggést. A már emlitett mitochondrium károsodás kizárja annak a lehetőségét, hogy a felhasznált ATP utánpótlására uj ATP reszintetizálódjék. Ez a feltevésünk részben igazolódott. Az adott koncentrációju szubsztráthoz adagolt ATP némileg fokozta a mozgássebességet. Ez a megfigyelésünk más szempontból is fontosnak tünik. Feltételezhető volt, hogy a fotoindukált mozgássebesség csökkenése a csillók, vagy az ATP-t a csilló nyelére transzferáló kinetoszómák fotooxidativ károsodásából eredhet. Ilyenről Biczókék /1970/ nem tesznek említést. Ha ilyen változás valóban létezne, az ATP hozzáadás hatástalan maradna az állat helyváltoztató mozgására.

3. <u>A cisztein hatása a mozgássebességre</u>

Az aminosavak közül az L-cisztein nagy jelentőségre tett szert a fotobiológiában, mivel kivédi, vagy legalább is

csökkenti a különböző sugárzások károsító hatását.

Kisérleteink során egyöntetüen abban mutatkozott a cisztein hatása, hogy a fotoindukált mozgássebesség a kontrollokhoz képest csökkent. Ez a nativ állatoknál éppugy megnyilvánult, mint a bengálveressel érzékenyitetteknél. A másik szembetünő hatás az ételési idő jelentős meghosszabbodásában jutott kifejezésre.

A tapasztalt jelenség hatásmechanizmusának ma még nincs kielégitő magyarázata. Feltehető, hogy a cisztein -SH csoportja a fehérjék hasonló csoportjával reverzibilis diszulfidokat alkot, amelyek a sugárzás alkalmával keletkező aktiv gyökök hatására felhasadnak, s igy a fehérjék -SH-csoportjai regenerálódnak. Ujabb vizsgálatok szerint a cisztein jelentős szerepet tölt be a DNS degradációjában is /ROSENKRANZ - ROSENKRANZ, 1971/. Ez az ut számunkra alig járható, hogy megértsük a mozgássebesség csökkenését. Sokkal valószinübb az, hogy a képzödött diszulfidok a mitochondriumok főbb anyagcsere - folyamataiban gátlóhatást fejtenek ki. Elsősorban az enzim funkciók reverzibilis gátlására gondolok itt. /FILIPPOVICH és munkatársai 1970-71/. Igaz, hogy ez kedvezőtlenül befolyásolja az ATP reszintézisét, viszont előnyös lehet az ATP készlet felhasználása szempontjából. A hosszabban elnyült kevésbé meredek grafikonok arra

engednek következtetni, hogy a tartalék ATP készlet hosszabb ideig áll a mozgás szolgálatára. A bengálveres érzékenyitő hatásának mérséklődése jelzi, hogy a cisztein vázolt hatását a szenzitor nem függeszti fel.

IRODALOMJEGYZÉK

BACQ, Z.M.: Chemical Protection Against Ionizing Radiation.,
Charles C., Thomas Publisher, Springfield, III. /1965/

BELLIN, J.S.: Properties of pigments in the state a review.,
Photochem. Photobiol., 4., 33-44./1965/

BICZÓK,F.; NEMES, Z.; BIHARI, O.:
Csillós egysejtü fényindukált mozgásváltozásainak mikrokinematografiás vizsgálata.,
MTA Müszerü. Szolg. Közl. 5., 37-39, /1968/

BICZÓK, F.: Photoaktivierte Bewegungen und Stoffwechseluntersuchungen an sensibilisierten Tetrahymena pyriformis LG.,
In Progr. in Protozool. III. Internat. Protozool. Kongr. Leningrad. 166-167, /1969a/

CHALAZONITIS, N.: Light energy conversion in neural membranes.,
Photochem.and Photobiol. 3., 539-559, /1964/

CHASE, A.M.; GLASER, O.:

H-ion concentration and ciliary activity.,

J.Gen. Physiol., 13., 627-636, /1930/

Mc.CONELL, H.M.: Molecular Biophysics.

Acad. Press. N.Y. London.

ELEY, D.D.; LESLIE, R.B.:

Nature, 197, /1963/

FILIPPOVICH, J.V. és mtsai:

Dokl. Akad. Nauk. SzSzSzR, 195., 222, /1970/

FILIPPOVICH, J.V. és mtsai:

Biochem. Pharmacol., 20, 135, /1971/

GARAY, K.: Sugárzások hatása ATP-ra

Kandidátusi értekezés /1958/

GIESE, A;C.: Effects of radiation upon Protozoa.

In: Research in Protozoology. Vol. 2, Tze-Tuan Chen. Perg. Pr. 267-356, /1967/

GOLDACRE, R.J.: The folding and unfolding of proteins molecules as a basis of osmotic work.,

Internat. Rev. Cytology I., 135-, /1952/

GRAEVSKY, E.Y.; KONSTANTINOVA, M.; NAKRASOVA, I.V.; SOKOLOVA, O.M.; TARASENKO, A.G.:
Nature, 212., 475, /1966/

GROSSWEINER, L.I.: Senzitization of Chemical and Photoconductive Processes by the Fluorescein Dye Triplet States In Physical Processes in Radiation Biology.,
Ed. L. Angenstein, R.Mason, B. Rosenberg, AP. New-York 287-308, /1964/

HAUROWITZ, E.: The Chemistry and Function of Proteins.,
Acad. Press. New-York. /1963/

HERNÁDI, F.; NAGY, ZS.; KOVÁCS, P.; MUCSI, O.:
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 13., 1, /1966/

HERTEL, E.: The contractions in light of Sipunculus muscle in the presence of eosin.,
Z. Allg. Physiol., 6., 44-51, /1906/

Mc.ILWAIN, A. /1937/: idézi BRUCKNER:
Szerves Kémia, III/1, 621. oldal,
Tankönykiadó, Budapest /1964/

JELLUM, E.: Int.J. Radiat. Biol., 10., 577, /1966/

JONES, P. C. T.: Contractile protein modell for cell adhesion.,
Nature, 212., 365-369, /1966/

KASHA, M.: Paths of Molecular Excitation.,
Radiation Research Supplement.,
2., 243-275, /1960/

KASHA, M.: The Nature and significance of $n \longrightarrow \pi$ transitions.,
A Sympsium on Light and Life.
Ed. Mc.Elroy and Glass /1961/

KAUZMANN, W.: Adv. in Protein Chemistry.,
14., 1, /1959a/

KOHN, H.J.; GUNTER, S.E.:
Radiat. Res., 11., 732, /1959/

KOLLMAN, G.: Radiat. Res., 31., 721, /1967/

KRISZAT, G.: Arkiv. Zool., 1., 81-86, /1949/
6., 195-201,/1954/

KUHN, H.: A Quantum Mechanical Theory of Light Absorption of Organic Dyes and Similar Compounds.,
J. of. Chemical Physics., 17., /12/ 1198-1212, /1949/

LADIK, J.: Acta. Phys. Acad. Sci. Hung.,
15., 287, /1963/

LADIK, J.: Nature., 202., 1208, /1964/

LADIK, J.: Kvantumbiokémia.,
Gondolat. Budapest 1967

LÁBAS, E.: Effect of indolylalkylamines, BOL-148 and other comounds on the photosenzitized contraction by xanthenedyes in Glochidia of Anodonta.,
Comp. Biochem. Physiol., 17.,
1057-1064, /1966/

LEHNINGER, A.L.: Biochemistry. -
The Moleculas Basis of Cell Structure and Function.,
Johns H. Unio School of Med. 1970

LIPMANN, F.: Adv. in Enzymology., 6., 231, /1941/

LYUDKOVSKAJA, R.G.; PANGELOVA, T.K.:
Light stimulation of oxidative - reductive reaktions and autogenic rhytmic activity of crayfish ganglia.,
Biofiz., 11., 1013-1021, /1966/

MITCHELL, P.; MOYLE, J.:
Translocation of some anions, cations and acids in rat liver mitochondria
Eur. J. Biochem., 9., 149, /1969/

MITCHELL, P.; MOYLE, J.:

Estimation of membrane potential and pH difference across the christae membrane of rat liver mitochondria.,

Eur. J. Biochem., 7., 471, /1969/

NOMURA, S.: H-ions and ciliary movement. O_2 consumption of cilia.,

Protoplazma., 20., 85-89, /1933/

de ROBERTIS, E.D.P.; NOWINSKI, W.W.; SAEZ, F.A.:

Cell Biology.,

Saunders Comp. Philadelphia, London 1965

ROSENKRANZ, H.S. - ROSENKRANZ, S.:

Degradation of DNA by cysteine.,

Arch. Biochem. Biophys., 146., 483-487, /1971/

Mc.RAE, E.G.; KASHA, M.:

Enhancement of phosphorescense ability upon aggregation of dye molecules.,

J. Chem. Phys., 28., 721, /1965/

SAIER, F.L.; GIESE, A.C.:

Action of ultraviolet radiation upon ciliary movement in Paramecium.,

Exp. Cell. Res. 44., 321-331, /1966/

SÖRENSEN,/1909/: idézi E.M.J. JOHNSON and H.A. LARDY:
Respiratory Enzymes.,
Rev. Ed. Burgess Publishing CO.
Minneapolis 1949

SZAZONYENKÓ, M.K.: Electron spin resonance /ESR/ of free radicals in photostimulated skeleton muscle.,
Biofizika, 10., 252-260, /1965/

SZENT-GYÖRGYI, A.: Nature, 148., 157, /1941/

SZENT-GYÖRGYI, A.: Nature, 157., 875, /1946/

VOLPE, P.: Natural photosenzitivity of Spirographis muscle.,
Comp. Biochem. and Physiol., 17., 319-325, /1966/

WIRTZ, A.: Z. für Naturforschung., 26., 94, /1947/

YONGE, C.M.: H-ions and ciliary movement.,
J.Mar. Biol. Ass., 13., 938-952, /1925/

SZEGED