

József Attila Tudományegyetem

Biofizikai Tanszék

LIPID METABOLIZMUST MÓDOSÍTÓ VEGYÜLETEK HATÁSA
A FOTOSZINTÉZIS MÁSODIK FOTOKÉMIAI
RENDSZERÉNEK AKTIVITÁSÁRA

Doktori értekezés

Gyulai Gábor

Szeged

1984



B 2365

T A R T A L O M J E G Y Z É K

	Oldal
1. Bevezetés és a disszertáció célkitűzése	1
2. Irodalmi összefoglaló	2
2.1. A fotoszintetizáló membránok felépítése és működése	2
2.2. A <i>Chlorella pyrenoidosa</i> alga lipid és zsírsav összetétele	7
2.3. Az alkalmazott szerek ismertetése	14
3. Kísérleti módszerek	19
3.1. A <i>Chlorella pyrenoidosa</i> tenyésztése, gátlószerek alkalmazása, sejtszámolás	19
3.2. Fluoreszcencia szinképek felvétele	20
3.3. Elektronmikroszkópos vizsgálatok	21
3.4. A lipidek extrahálása, a zsírsavak mennyiségi és minőségi meghatározása	22
3.5. A fotoszintetikus aktivitás meghatározása; oxigéntermelő kapacitás, oxigén-indukció és fluoreszcencia indukció mérésével	24
4. A kísérleti eredmények ismertetése és megvitatása	26
4.1. Az alkalmazott szerek hatása a <i>Chlorella pyrenoidosa</i> szaporodására, elektronmikroszkópos szerkezetére és alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinképére	26

	Oldal
4.2. Az alkalmazott szerek hatása a <i>Chlorella</i> <i>pyrenoidosa</i> lipíd-és zsírsav összeté- telére	38
4.3. Az alkalmazott vegyületek hatása a <i>Chlorella pyrenoidosa</i> fotoszintetikus aktivitására	46
5. Összefoglalás	84
6. Irodalomjegyzék	1-14

RÖVIDÍTÉSEK

- FA - Fenetilalkohol: /fenil-etanol/
 MA - Metronidazol : 1-/2'-hidroxi-etil/-2 metil-5- nitro-
 imidazol/
 CER - cerulenin : 2,3-poxi-4-oxo-7,10-dodékadienolamid
 /Ms:223 D/
 SAN 6706 - 4-kloro-5-/dimetilamino/-2-/α,α,α -
 trifluóro-m-tolil/-3/2H/-piridazinon
 /Ms:317,5/
 SAN 9785 - 4-kloro-5-/dimetilamino/-2-fenil-3/
 2H/-piridazinon
 SAN 9789 - 4-kloro-5-/metilamino/-2-/α,α,α tri-
 fluóro-m-tolil/-3/2H/-piridazinon. =
 norflurazon
- DCMU - 3-/3,4-diklorfenil/-1,1-dimetilurea
 DGDG - digalaktózil diglicerid
 MGDG - monogalaktózil diglicerid
 PL - foszfolipid
 SL - szulfolipid
 NL - neutrális lipid
 PG - foszfatidil glicerol
 PE - foszfatidiletanolamin
 PC - foszfatidilkolin
 16:0 - palmitinsav
 16:1 - palmitoleinsav
 16:3 - hexadekatriénsav
 17:0 - margarinsav
 18:0 - sztearinsav
 18:1 - olajsav
 18:2 - linolsav
 18:3 - linolénsav
 PS 1. - első fotokémiai rendszer
 PS 2. - második fotokémiai rendszer
 Q - a PS 2. első elektronakceptora
 PQ - plasztokinon

1. BEVEZETÉS ÉS A DISSZERTÁCIÓ CÉLKITÜZÉSE

A kloroplasztisz membránoknak meghatározó szerepük van a fotoszintézis primer folyamataiban: a fényelnyelés, a töltés szétválasztás, a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatai a fotoszintetikus membránokban játszódnak le. A modern fotoszintézis kutatások egyik alapvető célkitűzése a kloroplasztisz membránok szerkezetének, illetve a szerkezet funkcionális vonatkozásainak mind teljesebb megismerése. A kloroplasztisz membránok alkotó elemei közül a lipidek, ill. zsírsavak szerepének felderítésére az utóbbi években intenzív kutatások kezdődtek, mivel a kloroplasztiszok jellemző lipid és zsírsav összetétele speciális strukturális és funkcionális szerepet feltételez.

Dolgozat általános célkitűzése a lipidek és zsírsavak szerepének tanulmányozása a fotoszintetizáló membránok szerveződésében és a második fotokémiai rendszer működésében. Kutatási módszerünk a következő: zsírsav vagy lipid szintézist gátló, illetve módosító vegyületekkel, *in vivo* körülmények között módosítjuk a kloroplasztisz membránok lipid összetételét majd meghatározzuk a módosítás következményeit; a második fotokémiai rendszer funkcionális paramétereinek mérésével.

A dolgozat a fenetilalkohol, a metronidazol, a cerulenin és három piridazinon vázas vegyület hatását vizsgálja a *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga fotoszintetikus membránjainak szerveződésére és működésére.

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

2.1. A fotoszintetizáló membránok felépítése és működése.

A biológiai membránok alapstruktúrája az egész élővilágban általános érvényű egység membrán /1/. A membránok finom szerkezetét, mai tudásunk szerint legjobban a folyadék-mozaik modell írja le, mely elmélet szerint a membránokat egy kettős lipidrétégből álló alapváz, és az ehhez a lipidrétéghez kapcsolódó, illetve abba belemerülő fehérjepartikulumok építik fel /2/. Az egyes sejtorganellek membránjainak lipid fehérje összetétele nagy eltérést mutat.

A fotoszintetizáló tilakoid membránoknak a lipidtartalma megközelítően 40 % /3/, a tilakoid membránok további sajátága a speciális lipid-illetve zsírsavösszetétel /magas galaktolipid és telítetlen zsírsav tartalom/.

Egy fotoszintetizáló sejt membránviszonyaira jellemző, hogy a sejt össz membrán mennyiségének 90 %-át a tilakoid membránok képezik /4/.

Ebben a nagymennyiségű tilakoid membránban játszódnak le a fotoszintézis primer folyamatai: a fényelnyelés, az elnyelt fényenergia pigment rendszerben való vándorlása a reakció centrumig, a primer fotokémiai reakciók; a töltés szétválasztás, vízbontás, elektrontranszport folyamatok. Ezekhez a reakciókhoz kapcsolódnak, mintegy szekunder folyamatként a sötétben is lejárló, sztróma működéshez kapcsolt sötét enzimikus folyamatok.

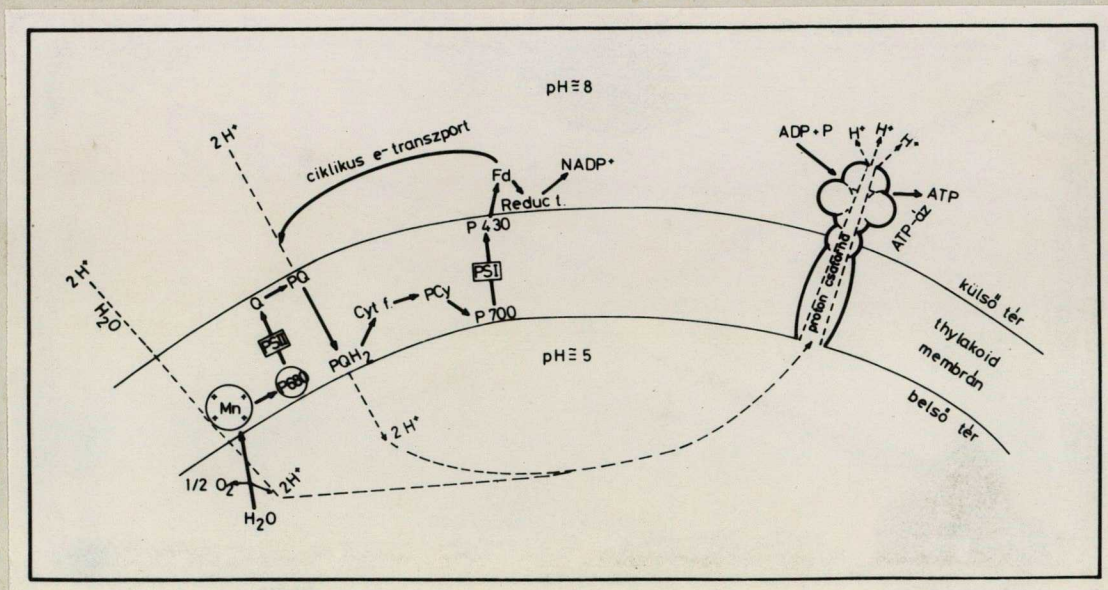
A fotoszintézis kutatás biofizikájának feladata elsődlegesen a fény jelenlétében lejátszódó primér fotofizikai és fotokémiai folyamatok vizsgálata /5,6/. A következőkben rövid áttekintést adunk ezekről a folyamatokról.

A fotoszintetizáló szervezetek képesek a 400-800 nm hullámhosszuságú fénysugarak energiáját kémiai energiává alakítani. A fényenergia elnyelése a fotoszintetikus pigmentek /klorofilok és járulékos pigmentek/ segítségével történik. Ezek a pigmentek pigmentrendszerbe tömörülnek /7/, az első /PSI/ és a második

/PS II/ fotokémiai rendszert alkotva /8/. Mindkét pigmentrendszer hozzávetőlegesen 300 klorofill molekula tartalmaz. E nagyszámu klorofill molekula közül azonban közvetlenül csak néhány, a reakciócentrumban található klorofill-a molekula vesz részt a fotokémiai folyamatban, a többi klorofill molekula fénygyűjtő /"antenna"/ szerepet tölt be. Az első fotokémiai rendszer reakció centruma 700 nm-nél /P 700/ a második fotokémiai rendszer reakció centruma 680 nm-nél mutat jellemző abszorpciós maximumot /P 680/. A két pigmentrendszert a fotoszintetikus elektrontranszport lánc kapcsolja össze funkcionális egységgé /9/. A fotoszintetikus elektrontranszport-lánc egyes tagjait és a tilakoid membránban való lokalizációjukat az 1. ábrán mutatjuk be /10/.

Fényenergia hatására az elektronok a + 0.8 V redoxpotenciálú víz oxigén rendszerből a -0,32 V redoxpotenciálú NADPH/NADP⁺ rendszerbe emelkednek. A NADP⁺ redukálásához szükséges 2 elektron és 2 proton a víztől származik. A redukcióhoz és az elektrontranszport-hoz szükséges energiát a két pigmentrendszer által elnyelt fényenergia szolgáltatja. E folyamat mellett energetikailag lehetőség nyílik; a cilusos és a lineáris ATP szintézisre /11/.

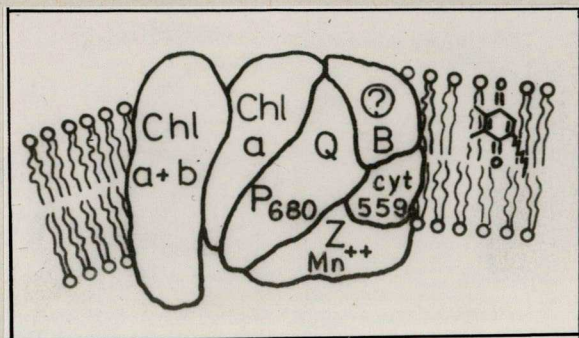




1. ábra

A fotoszintetikus elektrontranszport lánc tagjainak lokalizációja a thylakoid membránban /10/.

Vizsgálataink során elsősorban a 2. fotokémiai rendszer funkcionális paramétereinek vizsgálatával foglalkozunk. A 2. ábrán a második fotokémiai rendszer szerkezetét és membránbeli lokalizációjának egyik lehetséges változatát tüntettük fel /12/. Az ábrán látható 2. fotokémiai rendszer antenna klorofill molekulái /Chl a/ valamint a reakciócentrum /P 680/ valószínűleg egy 44-50 000 D molekulasúlyú polipeptiddel alkot komplexet, és kapcsolatban van a 25-30 000 D molekulasúlyú Klorofill-protein fénygyűjtő komplexel /az ábrán: Chl a+b/. A Q komponens a 2. fotokémiai rendszer elsőd-



2. ábra

A 2. fotokémiai rendszer szerveződése a fotoszintetizáló membránokban /12/.

leges, illetve a feofitin komponens felfedezése óta "másodlagos" elektronakceptora, feltételezhetően egy speciális plasztokinon molekula, oxidált állapotban a 2. fotokémiai rendszer fluoreszcencia kioltója /13/. A "B" komponens egy feltételezett fehérje tartalmú komponens, valószínűleg nagy szerepet játszik a herbicid hatás kialakulásában /herbicid kötő fehérje/. A cytochrom b_{559} a lineáris elektrontranszport tagja, közvetlen kapcsolatban áll a második fotokémiai rendszerrel. Az elektrontranszport-lánc működésének és az egész fotoszintézis folyamatának legkevésbé ismert területe a vízbontó enzim működése /az ábrán $Z Mn^{++}$ jelöléssel/. Impulzus megvilágítású kísérletek alapján alkotott hipotézis szerint az oxigénkiválasztás előfeltétele

négy oxidáló ekvivalens létrejötte $S^+ - S^{++} - S^{+++} - S^{++++}$ /. A mangán ion, ebben a folyamatban a pozitív töltések akkumulációjában játszhat szerepet /14/.

A Q illetve a B komponensekkel áll közvetlen redoxi kapcsolatban a plasztokinon-pool /a 2. ábrán az egyszerűsített képlete látható./ Egy elektrontranszport lánchoz 8 plasztokinon /PQ/ molekula kapcsolódik ezért az elnevezése, plasztokinon-pool /gyűjtő/. Ez a molekula nagy szerepet játszik a Q komponens B /ill. R/ komponens által közvetített reoxidálásában, valamint a tilakoidok belső tere és a sztróma közötti protongrádiens kialakításában /15/.

2.2. A *Chlorella pyrenoidosa* alga lipid és zsírsav összetétele.

Az evolúció különböző fejlettségi fokán álló fotoszintetizáló szervezetek lipid összetételüket tekintve két nagy csoportra különíthetők. A galaktolipideket tartalmazó eukariota szervezetek és a galaktolipideket nem tartalmazó prokariota szervezetek /16/.

A fotoszintetikus membránokban fontos szerepet játszó 4 fő lipidosztály a monogalaktozil diglicerid /MGDG/, a digalaktozil diglicerid /DGDG/, a foszfatidil glicerol /PG/ és a szulfolipid /SL/ eloszlása és aránya

nagy hasonlóságot mutat az egyes eukariota szervezetekben /16/. A lipidek igen magas százalékát /40-50 %/ alkotják mind a növényi kloroplasztiszoknak, mind a zöldalgák szárazanyag súlyának /16/. Ismert tény továbbá, hogy a fotoszintetizáló sejtek ill. az egysejtű zöldalgák kloroplasztisz membránjai a sejt összmembrán mennyiségének közel 90 %-át alkotják /4/.

A fotoszintetizáló *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga lipidjeinek megoszlása a következő: MGDG-25 %, DGDG-12 %, PL-14 % SL-3% és kis százalékban neutrális lipid /NL/.

Az egyes lipidosztályok strukturális és funkcionális szerepéről egyre több adat válik ismertté napjainkban. Kloroplasztisz fragmentumokon végzett galaktolipáz-enzimes vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a galaktolipidek szorosan körülveszik azokat a klorofillmolekula agregátumokat, amelyek az első fotokémiai reakciócentrumokat alkotják. A galaktolipidek enzimatikus hidrolízise csökkenti a PS I reakciócentrumokra jellemző folyamatok hatékonyságát. Ezt a hatást a reakciócentrum és az elektrontranszport lánc donor oldala közötti távolság növekedésével, illetve az elektrontranszport lánc tagjainak az optimálistól eltérő ori-

entációjával magyarázzák /17/.

A galaktolipideknek, mint nagy mennyiségű telítetlen zsírsavat tartalmazó lipideknek jelentős szerepet tulajdonítanak az optimális membránfluiditás kialakításában. /18/. Feltételezik továbbá, hogy a galaktolipidekben nagymennyiségben előforduló többszörösen telítetlen zsírsavak kettőskötéseik révén kapcsolatba léphetnek a klorofill molekula fitol lánccal s így módon stabilizálhatják a klorofill molekulák térbeli orientációját /19/.

Fotoszintetikus membránnak egyes frakcióinak vizsgálatával megállapították, hogy a grána tilakoidokban ott is a marginális részeken magasabb a galaktolipidek előfordulása, mint a tilakoid membránok egyéb régióiban. Ennek a jelenségnek hipotetikus magyarázata szerint a galaktolipid molekulák sajátos térszerkezete teszi lehetővé a grána membránok sűrű hajlatait /20/. Erre a szerveződésre a Singer féle membránelmélet nem tudott magyarázatot adni.

A monogalaktozil diglicerid molekulák strukturális szerepéről a fénygyűjtő komplexben /LHC/, feltételezik, hogy az MGDG molekulák fejcsoportjai a protein molekulák polipeptidláncaiba illeszkedhetnek bele, a

lipidmolekula zsírsavláncai pedig a membránok lipidoldékony komponenseihez /pigmentek/ kapcsolódva stabilizálhatják a klorofil-protein fénygyűjtő komplexet /21/.

A galaktolipidek fontos szerepet játszanak a fotoszintetikus membránok transzportfolyamataiban, mivel a galaktolipid molekulák gyors metabolikus átalakulásuk révén képesek a fotoszintetikus úton képződött primer termékeket átszállítani az envelop membránba, onnan pedig a plazmába /22/.

A foszfolipidek a legáltalánosabb alkotóelemei a lipoprotein membránoknak /23, 24/. Az egyes foszfolipid osztályok a következő összetételt mutatják a Chlorella zöldalgában: foszfatidil glicerol /PG/-66 %, foszfatidiletanoamin /PE/-11 %, foszfatidil kolin /PG/-22 %, foszfatidil inozitol /PI/-12 %. /16/.

A foszfolipidek membránbeli asszimetikus elhelyezkedéséből arra lehet következtetni, hogy a foszfolipideknek is jelentős szerepük van a membrán transzport folyamatokban, a membránhoz kapcsolt fehérjék enzimaktivitásának biztosításában /25/.

A Chlorella sejtekben nagy koncentrációban előforduló

difoszfatidil glicerol bipoláris tulajdonságait jelentős membránstabilizáló funkcióval hozzák kapcsolatba /26/.

A legújabb kutatások szerint a PG-nek rendkívül nagy szerepe van a primér fotokémiai folyamatok biztosításában /27/. Foszfolipáz-enzimes vizsgálatokkal kimutatták, hogy a foszfolipid elvonás hatására gátlódik a PS II-re jellemző folyamatok aktivitása. A fluoreszcencia indukciós görbék vizsgálatából megállapították továbbá, hogy a foszfatidil-glicerol jelenléte szükséges a feofitin /feltételezhetően még a Q komponens előtt működő elektronakceptor/ és a Q /a PS II elektronakceptora/ közötti hatékony elektrontranszport folyamat biztosításához.

A kloroplasztiszokban található PG- molekulák különlegessége, hogy csak bennük fordul elő a transz-hexadecénsav /16:1/. Ennek a ritka zsírsavnak a funkcionális szerepéről amely a kloroplasztiszben lokálisan fordul elő, még keveset tudunk, nem sikerült még e zsírsav jelenlétéhez kapcsolt speciális funkciót kimutatni /28/.

A szulfolipidek strukturális, funkcionális szerepe

kevésbé felderített területe a lipidkutatásnak. Feltetelezik, hogy ez a lipidosztály a fotoszintetikus úton redukált szulfátok fő tartaléka /22/. Megfigyelték továbbá, hogy a kénhiányos táptalajon nevelt algasejtekben a szulfolipidek felhasználódhatnak a szulfoproteinek szintéziséhez /29/.

A lipidek funkcionális tulajdonságait a bennük előforduló zsírsavak típusa határozza meg döntő mértékben. A legegyszerűbb fotoszintetizáló szervezetekben a fotoszintetizáló baktériumokban csak a kis szénatomszámú, telítetlen zsírsavak fordulnak elő /16/. A fotoszintézis további evolúciója során jelentek meg a nagyobb szénatomszámú és több telítetlen kötést tartalmazó zsírsavak. A zöldalgák és magasabbrendű növények zsírsavösszetétele között már csak mennyiségi különbségekben van eltérés. A *Chlorella* alga zsírsaveloszlására a következő adatok jellemzők; palmitinsav 15 %, telítetlen palmitinsavszármazékok 27 %, olajsav 9 %, linolsav 5 %, linolénsav 38 %, - a növényi kloroplasztiszokban a linolénsav az összzsírsavtartalom 70 %-t teszi ki - /16/. Sokáig közvetlen kapcsolatot tettek fel a magas linolénsavtartalom és a 2. fotokémiai rendszer aktivitása között /a linolsav - lino-

lénsav átalakulást irányító dehidratáz enzim működéséhez O_2 jelenléte szükséges /30/, amit közvetlenül a 2. fotokémiai rendszerhez kapcsolt vizbontó enzim szolgáltatna, azonban ezt a feltételezést az újabb kísérletek nem igazolták /31/.

Megállapították továbbá, hogy a kloroplasztisz morfogenezise, a galaktolipidek képződése, valamint a palmitoleinsav szintézise párhuzamosan halad az etiolálás során, növényekben, algákban egyaránt /32/.

A polién zsírsavakat tartalmazó lipidek általános szerepéről feltételezik, hogy sajátos strukturális elrendeződésük révén /a telített zsírsavakat tartalmazó lipidek lamelláris szerveződésűek, a telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipidek hengerpalást mentén rendeződnek/ alakítják ki az egyes membránokra jellemző optimális membrán fluiditás mértékét /18/. Feltételezik, hogy éppen ennek a molekuláris szerveződésnek köszönhetően van nagy szerepük^a polién zsírsavakat tartalmazó lipideknek a gyors membrántranszport folyamatok biztosításában. A fotoszintetikus membránokban nagy mennyiségben előforduló polién zsírsavaknak fontos szerepet tulajdonítanak továbbá a fehérjék szabad gyököktől való védelmében is /33/.

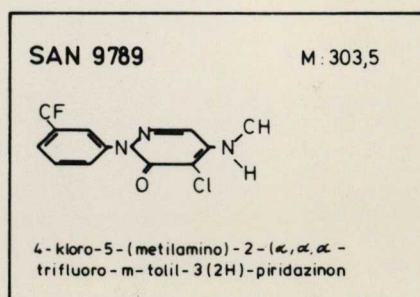
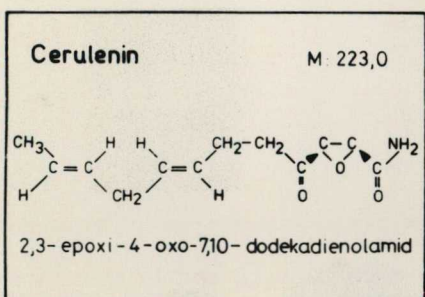
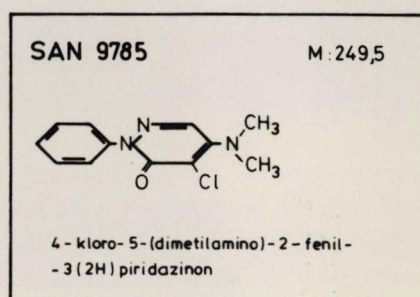
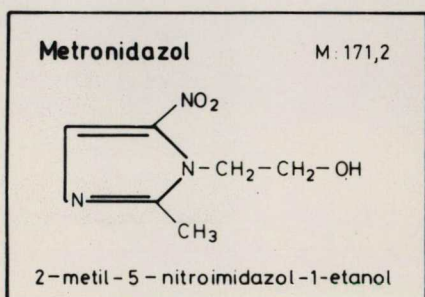
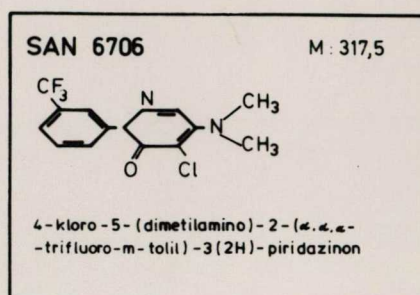
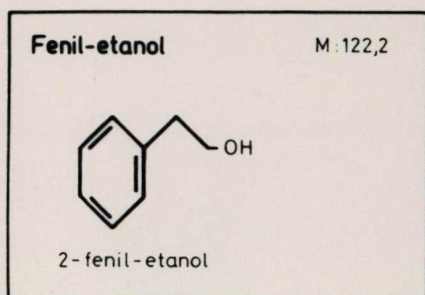
2.3. Az alkalmazott gátlószerek és hatásuk ismertetése.

Dolgozatomban a fenil-etanol, a metronidazol, a cerulenin és 3 piridazinon vázas herbicid, a SAN 6706, SAN 9785, SAN 9789 hatását vizsgáltam.

A 3. ábrán az alkalmazott vegyületek szerkezetét tüntettük fel.

Irodalmi adatok szerint az alkalmazott vegyületek közös tulajdonsága az, hogy lipid, illetve zsírsavmetabolizmust módosító hatással rendelkeznek. Vizsgálataink során a szereknek ezt a hatását használtuk fel a fotoszintetikus membránok in vivo lipid-és zsírsav összetételének megváltoztatásához.

A fenetilalkohol /FA/a természetben is előforduló aromás vegyület, többféle hatását is leírták az irodalomban. Korábbi vizsgálatok arról számoltak be, hogy a FA gátolja a bakteriofágok replikációját /34/. A FA *Escherichia coli* baktériumra gyakorolt hatása alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a FA hatékony gátlószere a baktériális elektrontranszport folyamatoknak /35/. A FA foszfolipid szintézisre gyakorolt hatásából megállapították, hogy drasztikusan megváltoztatja a baktérium membránok lipidösszetételét, erősen gá-



3. ábra

A lipid-illetve zsírsavmentabolizmust módosító vegyületek szerkezeti képlete

tolva a foszfolipidek szintézisét /36/. Részletes elemzés foglalkozik a Tetrahymena sejtek FA-okozta a membránkárosodásával. A szerzők kimutatták, hogy a FA ke-

zelés hatására megnő a Tetrahymena sejtek PC- tartalma, és ezzel párhuzamosan csökken a PE mennyisége. A sejtmembránokban a FA kezelés hatására megnő a több telítetlen kötéssel rendelkező /18:2, 18:3/ zsírsavak mennyisége, míg a palmitoleinsav /16:1/ mennyisége csökken. A FA hatásmechanizmusáról feltételezik, hogy a palmitinsav palmitoleinsav átalakulást szabályozó dehidratáz enzim működésének gátlásával fejt ki hatását /37/.

A FA *Chlorella pyrenoidosa* algára gyakorolt hatását csak rövid kezelési idő alatt vizsgálták /38/. Megállapították, hogy a 8,4 mM koncentrációban alkalmazott FA jelentős mértékben /90 %/ gátolja a sejtek növekedését, osztódását, DNS-és klorofill szintézisét. A 12 órás kezelési idő eredményeként a 21 mM koncentrációju FA már 2-3 órán belül teljes sejtnövekedés gátlást okozott, megszüntetve a sejtek fotoszintetikus folyamatait.

A metronidazol /MA/ a gyógyászatban már régóta alkalmazott antibaktériális szer. Vizsgálataink szempontjából a MA két, irodalomból ismert hatása bír jelentőséggel. Az egyik; a MA az elektrontranszport folyamatok-

ban, metilviologénszerű hatással elektronakceptorként működhet, a másik; a MA gátló hatással van a zsirsavak szintézisére.

Cukornád levelén végzett vizsgálatokkal kimutatták, hogy a MA gátolja a fotoszintetikus cukorképzést, de a Hill-reakciót csak kis mértékben befolyásolja /39/. Spenót kloroplasztiszon végzett vizsgálatokkal kimutatták, hogy a MA gátolja a ferredoxinfüggő NADP redukcióját. A gátló hatás feltételezhető magyarázata szerint a MA mint elektronakceptor képes a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc elektronjait befogni a NADP^+ redukálódása előtt. A MA-nak a ferredoxinnal közel azonos redoxpotenciál értéke ezt lehetővé teszi /40/.

A MA zsirsavszintézisre gyakorolt hatását in vivo és in vitro körülmények között elemezve megállapították, hogy a MA gátolja a sztearinsavnak olajsavvá történő átalakulását, valamint a palmitinsavnak sztearinsavvá történő elongációját /41/.

A cerulenin /CER/ a *Cephalosporium caerulens* gomba által termelt antibiotikum ; az irodalmi adatok szerint specifikus de novo zsirsav bioszintézist gátló hatás-

sal rendelkezik /42/.

Megállapították továbbá, hogy a ceruleninnek a lipid, illetve pigmentösszetételre gyakorolt metabolikus gátló hatása jól kontrolálható vizsgálati körülményeket nyújt a fotoszintetikus membránok struktúrális és funkcionális sajátosságainak megismeréséhez /43, 44, 45, 46/.

A cerulenin kezelés hatására DCMU rezisztens oxigén termelő képesség alakul ki a Chlorella algában /47/. A ceruleninnek a Chlorella alga fotoszintetikus folyamatokra kifejtett hatásáról feltételezik, hogy a Cerulenin kezelés a megváltoztatott lipid összetételű fotoszintetikus membránok szerveződésében bekövetkezett változásoknak tulajdoníthatók /45,48/. A legújabb eredmények azt mutatják, hogy cerulenin kezelés hatására kialakult membránstruktúra változás közvetlen hatást fejt ki a 2. fotokémiai rendszer donor oldalán lévő vízbontó enzim működésére /49/.

A piridazonon vázas herbicideket széles körben alkalmazzák a fotoszintetikus folyamatok mélyebb részleteinek kutatásában. A dolgozatban vizsgált három vegyület a SAN 6706, SAN 9785 és SAN 9789, az irodalmi adatok szerint sokoldalú gátló hatással rendelkezik.

A gátló hatás egyaránt kiterjed a 2. fotokémiai rendszer donor és akceptor oldalának gátlására /50,51/. A két trifluorometil származék /SAN 6706, SAN 9789/ erős karotenoid szintézis gátlónak bizonyult a magasabb rendű növényeken végzett kísérletekben /52,53/. Mindhárom piridazinon vegyület jellemző hatást fejtett ki^a kloroplastisz lipidek összsírsav eloszlásának megváltoztatásában; nagy mértékben megnövelve a linolsav arányát a linolénsav arányához viszonyítva /54, 55/.

Elemelve a piridazinon vázas vegyületek hatását a *Chlorella* alga fotoszintetikus oxigénkiválasztására, megállapították, hogy az $1 \cdot 10^{-5}$ M-nál kisebb hatóanyag-koncentrációkban serkentő, ennél magasabb koncentrációkban gátló hatást fejt ki az algasejtek oxigénevolúciójára. Az oxigén evolúcióban kialakult gátlást a szerzők a PQ-pool csökkent működésének tulajdonítják /51, 56/.

3. KISÉRLETI MÓDSZEREK

3.1. A *Chlorella pyrenoidosa* zöldalga tenyésztése, gátlószerek alkalmazása, sejt számlálás.

Kísérleteink során a *Chlorella pyrenoidosa* szinkronizált tenyészetét használtuk. Szinkronizálás során 16/8 órás fény-sötét ciklust alkalmaztunk. A fényintenzitás 10 W/m^2 , a hőmérséklet 24°C volt. Táptalajként a kereskedelemben kapható VUXAL növényi tápoldat 0,2 %-os oldatát használtuk. A tenyészeteken folyamatosan levegőt áramoltattunk át /57/.

A kísérletek kezdetén az algatenyészeteket azonos sejtszámra, 4×10^6 db/ml, állítottuk be. Az algasejtek számlálását Bürker-kamrával végeztük. Minden mérésnél 10-10 kis téglatestben / $1/5 \times 1/10 \times 1/20$ mm/ számoltuk meg a sejteket, az értéket átlagoltuk. A sejtszámlálás mérési hibája $\pm 10 \%$ volt.

A lipidmetabolizmust módosító szerek különböző mennyiségét közvetlenül /előzetes feloldás nélkül/ adtuk a 100 ml térfogatú algatenyészetekhez, a szinkronizáció fényszakaszának 3-3,5 órájában. Méréseinket 24,48 és 72 órás kezelési időpontokban végeztük. Kísérleteinket legalább ötszörös ismétlésben végeztük.

3.2. Fluoreszcencia-szinképek felvétele.

Az alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia-szinképek felvétele PERKIN-ELMER MPF 44/A típusu spektrofotométer

alacsony hőmérsékletű feltétjével történt. Ennek Dewarpalackját folyékony nitrogénnel töltöttük meg az alacsony hőmérséklet -196°C / biztosítására. Az algamintákat megfelelően kialakított rézpálca mélyedésébe csepegtettük, majd a folyékony nitrogénnel töltött mintatartóba helyeztük. A fluoreszcencia-szinképek felvételét az emisszió 650-790 nm hullámhossz tartományában végeztük, 480 nm gerjesztő fény mellett. A gerjesztési monokromátort 8-10 nm, a megfigyelőt 2-3 nm sáv szélességre állítottuk. A mérésekhez megfelelő keresztetű szűrőket alkalmaztunk. Az algamintákat - ha szükséges volt - hígítással úgy állítottuk be, hogy optikai sűrűségük 0,2-nél kisebb legyen $d = 1$ cm-es rétegvastagságban 680 nm-es hullámhossznál.

3.3. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A chlorella sejteket centrifugálás után glutáraldehides - paraformaldehides fixálóval kezeltük /58/, majd 1 %-os OsO_4 és Millonig-oldat /59/ 1:1 arányú keverékével kezeltük. A minták víztelenítését növekvő koncentrációjú alkoholsorozatban /30-50-70-90-100 %/ végeztük. 70 %-os alkoholnál uranilacetátos kezelést végeztünk. A víztelenített mintákat propilénoxidral kezelve aralditba, un. blokkba ágyasztuk /60/.

A blokkokból 800 Å vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket Pb-citrátos kezelés után hártásított rézrostélyra helyezve vizsgáltunk JEOL 100 B típusú elektronmikroszkópban.

3.4. A lipidek extrahálása, a zsírsavak mennyiségi és minőségi meghatározása.

A lipidek extrahálása. Az egyes algatenyészetekből meghatározott térfogatú /sejtszámú/ mennyiséget lecentrifugáltunk, majd a mintákat kloroform; metanol = 2:1 arányú elegyében szuszpendáltuk /6l/. A kicsapódott nem lipid természetű anyagokat szüréssel eltávolítottuk. A kloroform-metanolos oldathoz 20 tf%-ban 0,1M KCl-oldatot adtunk, a felső vizes-metanolos fázist dekantáltuk, az alsó kloroformos fázist, amely a lipideket tartalmazta, bepáróltuk, majd 5 ml tiszta kloroformban felvettük. A későbbi vizsgálatokhoz ezt a kloroformos oldatot használtuk fel.

A lipidfrakciókat "Reasil" Szilika gél G lapokon választottuk szét. A kromatografáló lapokat hőkezeléssel aktiváltuk, majd az egyes minták kloroformos oldataiból vett azonos mennyiségeket a lapokra felvettük. A futtatást aceton: benzol: viz = 91:30:8 elegyében vé-

geztük, majd Rhodamin G oldattal lefűjtük /62/. Az egyes lipidosztályokat UV fény alatt azonosítottuk, majd 3 ml sósavas metanolba felvettük.

A zsírsavak gázkromatográfiás meghatározásához a lipidek zsírsavait metilészterré alakítottuk az alábbi módon: a sósavas metanolba felvett mintákat 80°C-on, 2 óráig inkubáltuk, leforrasztott kémcsövekben. Inkubálás után a mintákhoz 2 ml petroléter: deszt.viz = 1:1 arányú elegyét adtuk. Összerázás után a zsírsavak metilészterei a petroléteres fázisba kerültek. A vizes fázis dekantálása után a petroléteres fázist bepároltuk és 6 μ l benzolba fölvtettük.

Ebből a benzolos mintákból vittünk fel a gázkromatográfba 2-2 μ l-t.

A minták össz-foszfolipid tartalmát a kloroformos oldatok foszfolipidtartalmának mérésével határoztuk meg. 100 μ l kloroformos oldathoz 0,65 ml perklorsavat adtunk és 30 percig, 180°C-on inkubáltuk. Ezután 0,5 ml 2,5 %-os ammonium-molibdenátot, 0,5 ml 10 %-os aszkorbinsavat és 3,3 ml vizet adtunk a mintákhoz, 5 percig, 100°C-on történő forralás után megmértük a minták fényelnyelését 790 nm-nél /63/. Ismert mennyiségű Na_2HPO_4

felhasználásával standard görbét készítettünk. A foszfortartalom ismeretében a foszfolipid mennyiségét számítással határoztuk meg.

3.5. Fotoszintetikus aktivitás meghatározása oxigén termelés, oxigénindukció és fluoreszcencia indukció mérések alapján.

Az oxigéntermelés aktivitását Clark-típusú oxigén elektródával határoztuk meg. A minta térfogata 3 ml volt, a mintatartót 24°C-on termosztáltuk és mágneses keverővel kevertük.

A megvilágítást 650 W-os halogén lámpa fehér fényével végeztük, így a fotoszintézis szempontjából telítési fényintenzitást tudtunk biztosítani. A fényforrás és a minta közé hőszűrőt helyeztünk. Minden mérési sorozat előtt meggyőződünk az elektródát takaró teflonmembrán állapotáról, és felvettük a mennyiségi kiértékeléshez szükséges kalibrációs görbét; Na-ditionit ismert térfogatú desztillált vízhez való adásával. Az oxigén termelés mértékét nM O₂/sejt számra számítottuk ki.

Az oxigénindukciós méréseinket Joliot típusú oxigén elektródával végeztünk /64/.

A cellára $-0,7$ V polarizáló feszültséget kapcsolunk házilag előállított berendezéssel /65/.

A cella áramjelét kis bemenő ellenállású I-U konverterrel alakítottuk át feszültség jellé, ezt a jelet szükség szerint tovább erősítettük, majd regisztrálóval irattuk ki. A cella platina elektródáján egy sejtsor *Chlorella* réteget hoztunk létre az $5 \cdot 10^8$ sejt/ml koncentrációra beállított alga tenyészetekből. Az algaréteget cellofán-hártyával fedtük be. A cellofán hártya és az Ag/AgCl elektróda között $0,2$ M koncentrációjú KCl oldatot áramoltattunk.

A cellát 15 perc sötét adaptáció után 55 W-os halogénlámpával világítottuk meg. A 100 %-os fényintenzitás értéke $12,7$ W/cm² volt. A különböző fényintenzitásokat a lámpa és a minta közötti távolság változtatásával érték el. Az egyes lámpa-minta távolsághoz tartozó fényintenzitásokat fényintenzitás mérővel /Spectra Physics 404 Power Meter/ határoztuk meg.

A fluoreszcencia indukció méréseket a JATE Biofizikai Tanszékén összeállított berendezésen végeztük. A fényforrás 450 W-os xenon lámpa volt, és BG-12 üvegszűrővel választottuk ki a fluoreszcencia indukció aktiválására alkalmas $= 410$ nm hullámhossz tartományú és 5 ± 1

mW/cm² intenzitású gerjesztő fényt. A klorofill fluoreszcenciáját 675 nm-es interferenciál szűrőn keresztül, EMI 9558 A típusu fotoelektronsokszorozóval detektáltuk, amelyből az elektromos jelet házi előállítású tranziens rekorderbe vittük, amely az időben gyorsjelet tárolta, majd x-y - rekorderen a gyorsjelet kiirattuk, előtte oszcilloszkópon a tárolt görbét megjelentítettük. A minta megvilágítását fényképezőgép fényzárával valósítottuk meg, amelynek nyitási ideje 1 ms, az elektronikus rész felfutási ideje pedig 200 μ s volt.

A mérőberendezés gyors és lassú felbontású fluoreszcencia indukció mérésére is alkalmas volt.

4. A KISÉRLETI EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

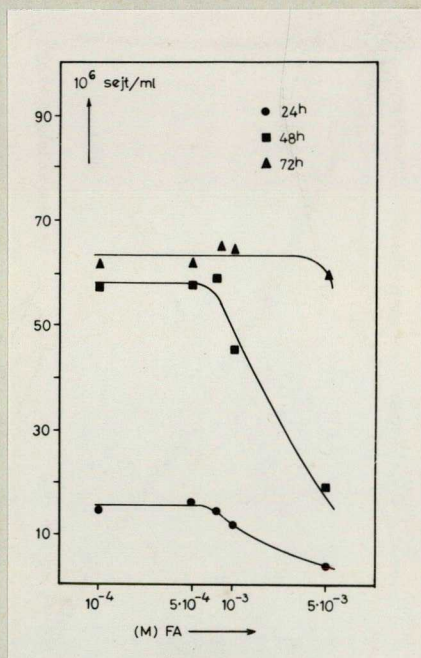
4.1. Az alkalmazott vegyületek hatása a Chlorella pyrenoidosa sejtek szaporodására, elektronmikroszkópos szerkezetére és alacsonyhőmérsékletű fluoreszcencia szintjére.

A sejtszaporodás gátlásának vizsgálata.

A sejtszaporodás görbéiből általános felvilágosítás nyerhető az egyes vegyületek lipid metabolizmusra kifejtett hatásáról, hiszen a sejtosztódás folyamatai

csak natív membránstruktúra mellett mehetnek végbe. A dózishatásgörbék felvételével sikerült meghatározni azokat a koncentráció értékeket amelyek alkalmazásától jól értékelhető eredmények voltak várhatók további kísérleteinkben.

A 4. ábrán a fenetilalkohol különböző koncentrációinak sejtszaporodást gátló hatását tüntettük fel a kezelési idő függvényében.



4. ábra

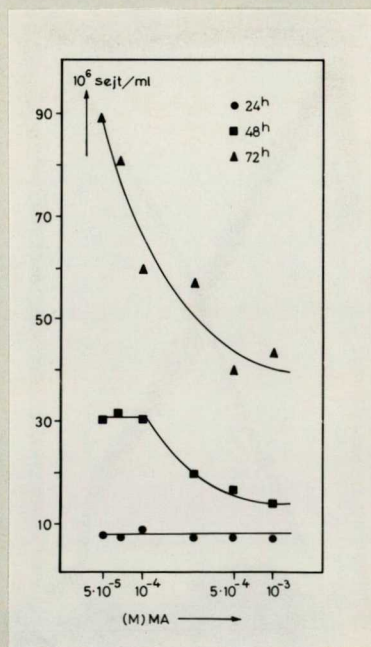
A fenetilalkohol különböző koncentrációinak hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek szaporodására, 24, 48 és 72 órás kezelési idő után

A fenetilalkohol sejtszaporodásra kifejtett gátló hatása csak a $7,5 \times 10^{-4}$ M-nál nagyobb FA koncentrációk-



ban figyelhető meg. Megállapítható, hogy ez a küszöbérték nagy mértékben függ a kezelés időtartamától. A $7,5 \times 10^{-4}$ M-nál kisebb FA koncentrációk esetén a tenyészetek a kontrolhoz hasonló mértékben szaporodtak. A 72 órás kezelés hatására a FA gátló hatása a sejtszaporodás kisebb koncentrációiban is erősödött, a sejtszaporodás gátlás éles határkoncentrációja pedig az 5×10^{-3} M FA értékre tolódott el.

A FA-hoz hasonló szaporodás görbéket kaptunk a MA kezelések során is, a kezelés 24 és 48 órájában. /5. ábra/.

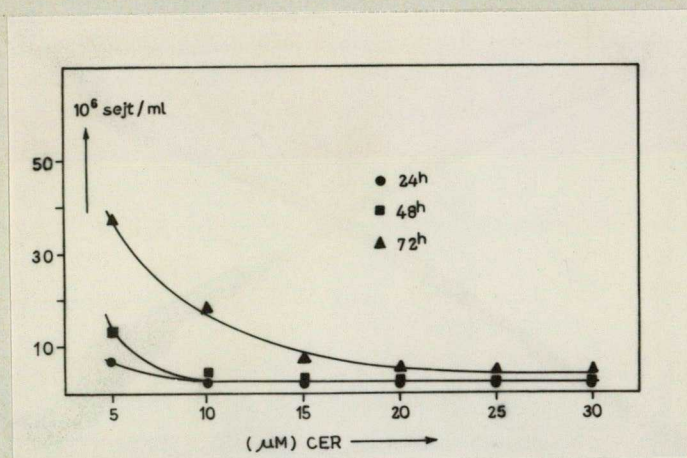


5. ábra

A metronidazol különböző koncentrációinak hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek szaporodására, 24,48 és 72 órás kezelési idő után

Lényeges változást tapasztaltunk azonban a 72 órás kezelési időben ; a kisebb koncentrációkban gyengült a MA gátló hatása, és ennek eredményeként jött létre a 72 órás kezelés exponenciális jellegű szaporodás görbéje.

A 6. ábrán a különböző koncentrációjú cerulenin kezelésekre dózis hatás görbéit mutatjuk be a kezelési idő függvényében.

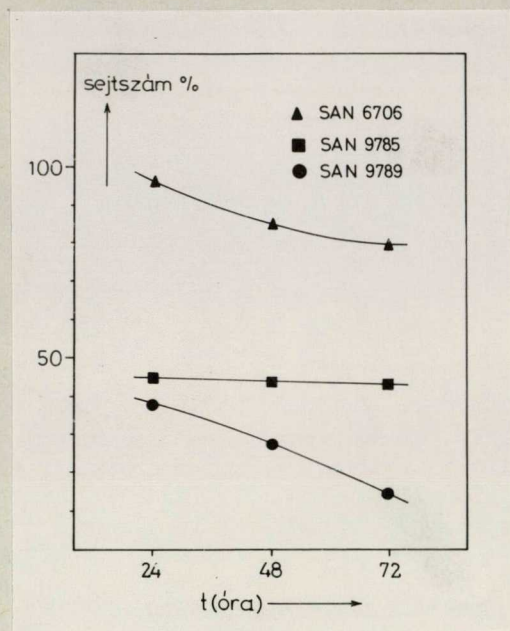


6. ábra

A cerulenin különböző koncentrációinak hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek szaporodására 24, 48 és 72 órás kezelési idő után

A cerulenin sejtszaporodást gátló hatásmechanizmusáról megállapíthatjuk, hogy az exponenciális jellegű gátló hatás már a kezelés első 24 órájában kialakul, és a gátlás jellege nem változik a kezelési idő előrehaladtával.

A 7. ábrán a 4×10^{-5} M koncentrációban alkalmazott piridazinon vázas vegyületek sejtszaporodást gátló hatását tüntettük fel a kezelési idő függvényében.



7. ábra

A $4 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú piridazinon vázas vegyületek hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek szaporodására, a 24, 48 és 72 órás kezelési idő után. A sejtszám értékei a kontroll %-ban vannak kifejezve.

Az ábrából kitűnik hogy a legerősebb sejtosztódást gátló hatást a SAN 9789-es vegyület okozta, a legenyhébb hatást pedig a SAN 6706 fejtette ki a *Chlorella* sejtek szaporodására.

A fenti eredmények alapján a további kísérleteinkben a FA-t és a MA-t 10^{-3} M koncentrációban, a CER-t és

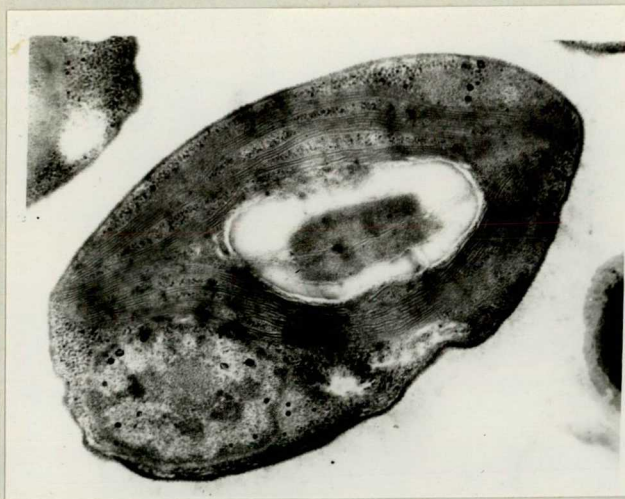
a három SAN vegyületet $4 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációban alkalmaztuk.

Az elektronmikroszkópos szerkezet vizsgálata.

A cerulenin és a piridazinon vázás herbicidek hatását a Chlorella sejtek ultrastruktúrájára korábban vizsgálták /45, 46, 48/.

Ezért dolgozatomban csak a fenetil alkohollal és a metronidazollal kezelt Chlorella sejtek elektronmikroszkópos szerkezetváltozását mutatom be.

A 8. ábrán a kontroll Chlorella pyrenoidosa sejt elektronmikroszkópos képe látható.

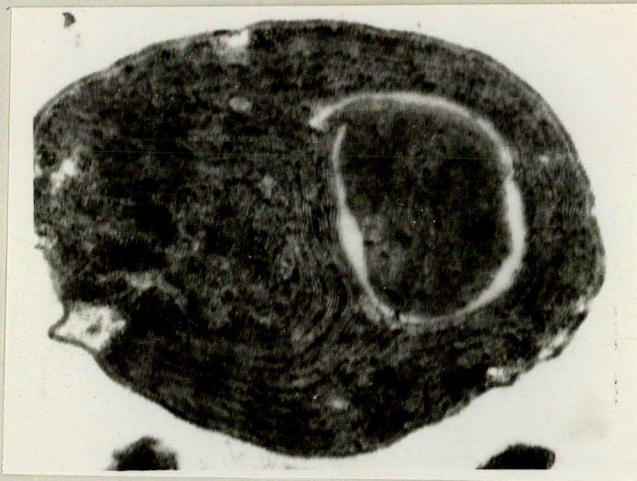


8. ábra.

A kontroll Chlorella pyrenoidosa sejt elektronmikroszkópos szerkezete. Nagyítás : 30 000-szeres.

A sejt kívülről sejtfallal és külső membránnal határolt. A szabályos lefutású kloroplasztisz membránok között látható a kettős rétegű, tápanyag raktározó pyrenoid rög. A sejt alapi részében jól kivehető a maghártyával burkolt sejtmag.

A 9. ábrán az 1×10^{-3} M fenetilalkohollal 72 órán át kezelt *Chlorella* sejt elektronmikroszkópos képe látható.



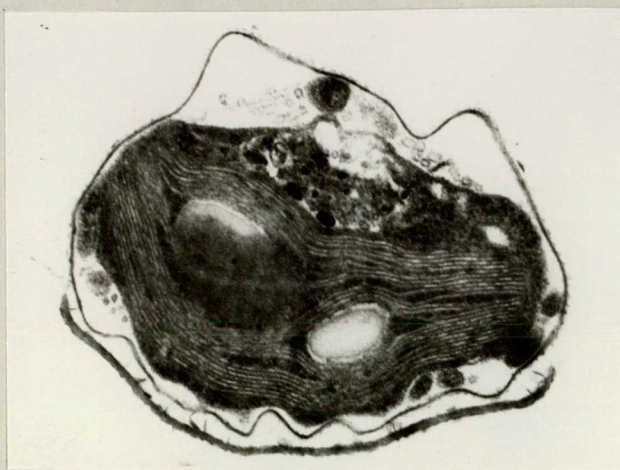
9. ábra

Az $1 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációjú fenetilalkohollal 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejt elektronmikroszkópos szerkezete. Nagyítás 31 000

Megállapíthatjuk, hogy a FA hatására az egész sejt szerkezete kompakt, tömör szerkezetűvé válik; a kloroplaszt membránok sűrű rétegződése együtt jelentkezik a tápanyag raktározó pirenoid rög /különösen a keményítő

tartalmú külső, fehér burok/ mennyiségének nagy mértékű csökkenésével.

A 10. ábrán az $1 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációjú metronidazollal, 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejt elektronmikroszkópos képe látható.



10. ábra

Az $1 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációjú metronidazollal 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejt elektronmikroszkópos szerkezete. Nagyítás: 44 000

A kezelés nagymértékben károsította a sejtfalakat, a kloroplasztisz lamellák rétegződésében enyhe mértékű fellazulás tapasztalható. Jellemző változás a pyrenoid rög földarabolódása.

A fluoreszcencia szinképek vizsgálata.

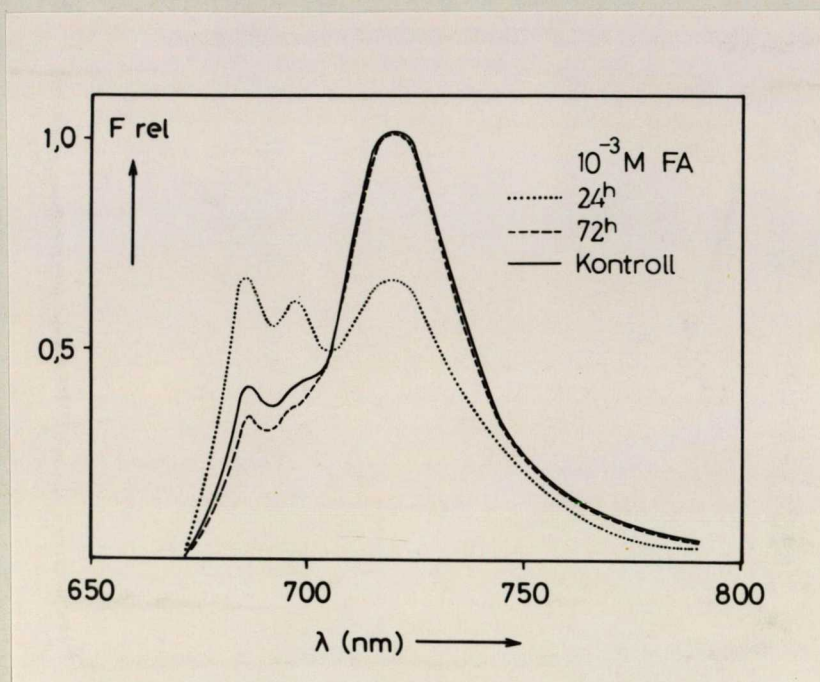
A mélyhőmérsékletű fluoreszcencia szinképek segítségével felvilágosítás kapható azokról a változásokról

amelyek az egyes kezelőszerek hatására jelentkeztek a fotoszintetikus membránok szerveződésében, az egyes pigmentformák kialakulásában, illetve az egyes pigmentformák között lezajló energiaátadó folyamatok hatékonyságában.

A *Chlorella* zöldalgára jellemző mélyhőmérsékletű fluoreszcencia szinképek három diszkrét fluoreszcencia sávval jellemezhetők /66/. Ezek a 685, 695 és a 720 nm-nél jelentkező fluoreszcencia sávok. Az egyes fluoreszcencia sávokhoz jellemző klorofill-a formák rendelhetők: a 685 és a 695 nm-es fluoreszcencia sávok a második fotokémiai rendszer, míg a 720 nm-es fluoreszcencia sáv az első fotokémiai rendszer klorofill-a formáinak fluoreszcenciájától származik.

A 11. ábrán az 1×10^{-3} M koncentrációju FA hatását láthatjuk a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinképeire, a kezelési idő függvényében. A szinképről megállapítható, hogy a FA kezelés első 24 órájában jelentős mértékben megnő a rövidebb hullámhosszú klorofill-a formák fluoreszcencia intenzitása, viszont a 720 nm-es sáv fluoreszcencia intenzitása megközelítően ilyen arányban csökken. A 72 órás kezelés hatására helyreáll a 720 nm-es sáv

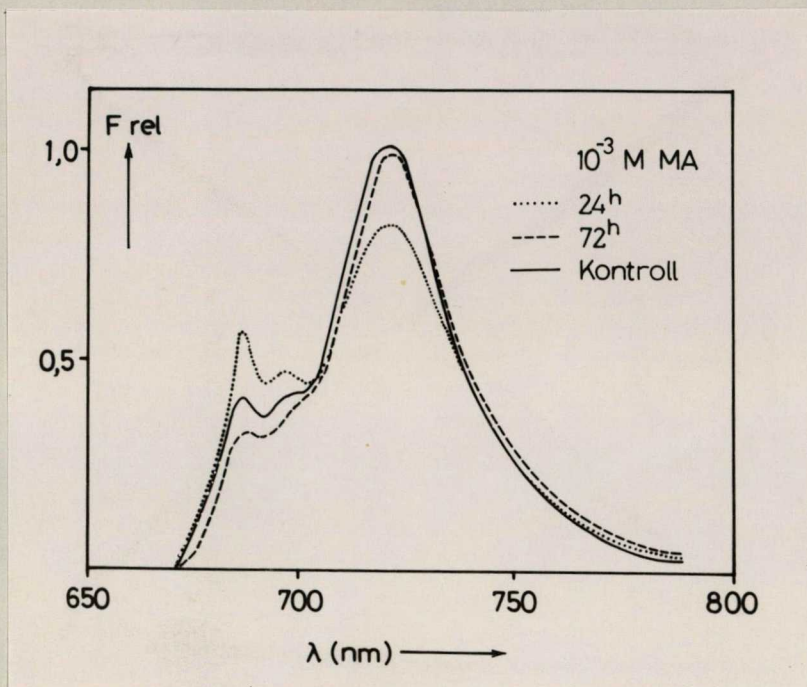
intenzitása, míg a 2. fotokémiai rendszer klorofill-a formáinak fluoreszcenciájától származó 685 és 695 nm sávok intenzitása alacsonyabb értéken stabilizálódik.



11. ábra

Az $1 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációjú fenetilalkohol hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinképeire a kezelési idő függvényében

A MA kezelés hatására kisebb mértékű változás volt tapasztalható a mély hőmérsékletű fluoreszcencia szinképek alakulásában /12. ábra/. A MA-hatás a kezelés első 24 órájában érvényesül intenzívebben: jellemző változás a MA kezelés esetében is a 685 nm-es sáv fluoreszcenciájának nagy mértékű növekedése a kezelés

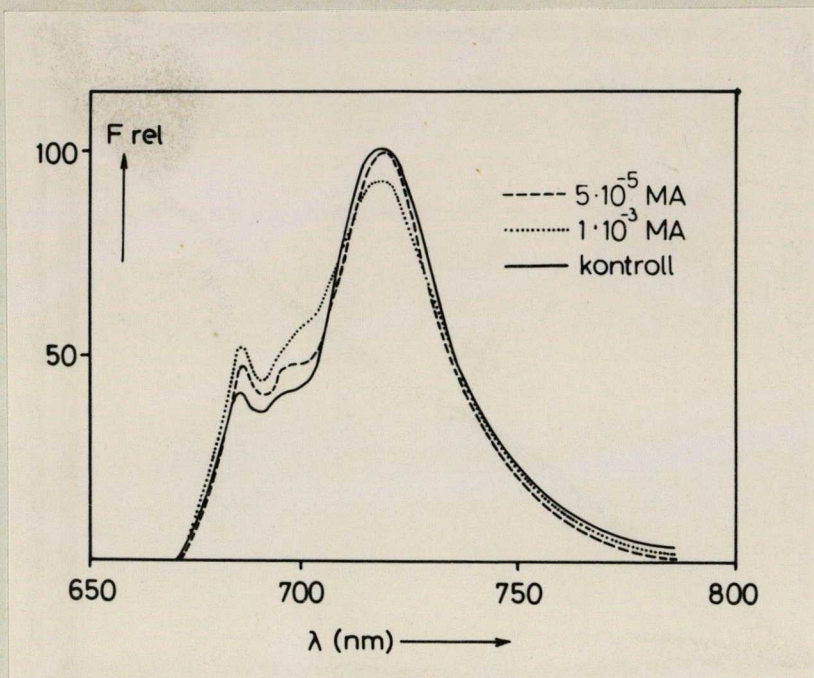


12. ábra

Az $1 \cdot 10^{-3}$ M koncentrációjú metronidazol hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia szinképre, a kezelési idő függvényében

első 24 órájában. A MA kezelés 72 órájában a rövidebb hullámhosszú fluoreszcencia sávok intenzitása alacsonyabb értéken állandósul.

A MA-hatás kialakulásának tendenciáját jól nyomon követhetjük a koncentráció függés arányában mért fluoreszcencia szinképeken /13. ábra/. Az erősödő szerkoncentráció hatására fokozatosan nő a rövidebb hullámhosszú fluoreszcencia sávok intenzitása, míg a 720 nm-es sáv intenzitása ennek arányában csökken.



13. ábra

A különböző koncentrációjú metronidazol kezelés hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek alacsonyhőmérsékletű fluoreszcencia szinképére, 48 órás kezelési idő után.

Összefoglalva a FA és MA vegyületek hatását a *Chlorella pyrenoidosa* mély hőmérsékletű fluoreszcencia szinképére a következőket állapíthatjuk meg. A FA és MA kezelés hatására a szinképek spektrális eloszlásában bekövetkezett változások a 685-, és a 695 nm-es sáv intenzitásának növekedésében, valamint a 720 nm-es sáv fluoreszcencia intenzitásának csökkentésében nyilvánultak meg.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az alkalma-

zott lipid metabolizmust befolyásoló szerek megváltoztatják a pigment molekulák szerveződését, a pigmentmolekulák közötti energiaátadási folyamatok hatékonyságát. Ezek a változások, munkahipotézisünk szerint a lipid és zsírsav összetételükben módosított tilakoid membránok megváltozott fizikai-kémiai tulajdonságainak következményei.

4.2. Az alkalmazott vegyületek hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek lipid- és zsírsav összetételére.

Vizsgálataink során meghatároztuk azokat a jellemző lipid illetve zsírsavösszetételbeli változásokat amelyek végbementek a különböző vegyületekkel 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtekben. Ismert tény, hogy az egysejtű zöldalgák kloroplasztisz membránjai a sejt összmembrán mennyiségének közel 90 %-át alkotják, ezért mondhatjuk, hogy a lipidosztályok zsírsavösszetételében előidézett változások a fotoszintetizáló membránokban végbement változásokat tükrözik /4/.

Mérési eredményeinket és az egyes zsírsavak %-os eloszlásában bekövetkezett változásokat az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

		<u>MGDG</u>	<u>DGDG</u>	<u>PG</u>	<u>PE</u>	<u>TOTÁL</u>
16:0	Kontroll	0,7	25,3	86,6	67,6	28,2
	FA	0,7	19,6	56,4	63,8	18,1
	MA	3,0	24,9	40,9	96,6	25,0
	SAN 6706	32,0	0,1	-	0,1	33,0
	SAN 9785	15,0	41,0	63,2	-	38,0
	SAN 9789	5,6	77,8	-	83,1	43,3
16:1	Kontroll	2,0	2,4	0,1	0,1	3,2
	FA	2,9	3,4	4,6	2,0	8,5
	MA	9,8	6,5	10,8	3,3	4,6
	SAN 6706	0,3	0,1	-	0,1	1,4
	SAN 9785	3,3	2,0	0,1	-	1,6
	SAN 9789	3,1	1,7	-	0,1	0,5
16:3	Kontroll	8,9	9,8	0,1	0,1	4,3
	FA	22,3	18,1	0,4	0,8	15,5
	MA	27,5	25,5	4,1	0,1	16,2
	SAN 6706	1,2	5,1	-	14,5	1,2
	SAN 9785	6,8	4,2	0,1	-	3,1
	SAN 9789	6,0	1,5	-	0,1	3,5
18:0	Kontroll	2,3	0,9	2,7	3,6	6,0
	FA	0,1	0,1	0,8	0,1	0,2
	MA	0,1	0,1	0,4	0,1	0,5
	SAN 6706	5,6	39,3	-	64,2	3,8
	SAN 9785	8,2	1,5	5,1	7,3	3,1
	SAN 9789	5,7	2,8	-	-	3,6
18:1	Kontroll	17,1	25,1	4,4	10,3	18,0
	FA	30,8	22,2	15,0	9,0	15,0
	MA	19,8	9,4	6,8	0,1	16,6
	SAN 6706	14,9	5,3	-	8,2	14,6
	SAN 9785	10,1	14,2	13,3	-	13,2
	SAN 9789	10,1	5,8	-	4,5	13,5
18:2	Kontroll	9,0	11,4	3,7	8,4	11,6
	FA	18,8	24,8	15,2	10,5	19,2
	MA	25,8	27,6	31,6	0,1	24,7
	SAN 6706	14,7	31,0	-	8,2	15,8
	SAN 9785	8,6	10,2	7,9	-	8,5
	SAN 9789	6,6	3,2	-	3,0	5,3
18:3	Kontroll	60,0	25,1	2,4	10,2	28,7
	FA	24,4	11,8	7,6	13,8	23,5
	MA	14,0	6,0	5,4	0,1	12,4
	SAN 6706	31,3	19,1	-	4,7	30,2
	SAN 9785	48,0	27,0	10,3	-	32,5
	SAN 9789	62,9	6,3	-	2,2	30,3

Gátlószerek hatása a *Chlorella pyrenoidosa* lipidosztályainak és totál lipidjeinek %-os zsirsaveloszlására
72 órás kezelés után

A mérési eredmények szerint a palmitinsav /16:0/ tartalom jelentős mértékben megnőtt a SAN kezelések hatására, a SAN 9789 esetében a növekedés mértéke közel 80 %-os volt. Ez a megnövekedett palmitinsav tartalom elsősorban a galaktolipidek palmitinsavtartalmának növekedésében jelentkezett. A FA és a MA hatására kisebb mértékű változást tapasztaltunk a palmitinsav tartalom eloszlásában.

A FA kezelés hatására megkétszereződött a palmitoleinsav /16:1/ mennyisége, elsősorban a PG-ban való nagyobb mértékű fülhalmozódás révén. A MA kezelés hasonló, de kisebb intenzitású változást okozott. A SAN vegyületek hatására a palmitoleinsav szintézis általános gátlása alakult ki.

A többszörösen telitetlen hexadekatriénsav /16:3/ részarányát közel háromszorosára növelte meg a FA és MA. A megnövekedett hexadekatriénsav szinte teljes mértékben a galaktolipidekben halmozódott fel. A piridazinon vázas vegyületek közül csak a SAN 6706 okozott nagyobb változást a hexadekatriénsav eloszlásában; a PE-ban kiugróan megnő ennek a zsirsavnak a részese.

A sztearinsav /18:0/ tartalomban bekövetkezett változások azt mutatják, hogy a FA és a MA kezelés jelentős mértékben, a SAN kezelések csak kisebb mértékben csökkentik a Chlorella sejtek sztearinsav tartalmát.

Az olajsav /18:1/ tartalomban bekövetkezett kisebb mennyiségi változások ellenére jelentősen megnő az MGDG lipidek olajsav tartalma a FA kezelt Chlorella sejtekben. A MA, SAN 6706, SAN 9789 kezelések hatására csökken a DGDG lipidek olajsav tartalma.

A linolsav /18:2/ tartalmát közel kétszeresére növelte meg a FA és MA, kisebb mértékű növekedést tapasztaltunk a SAN 6706 kezelés esetében. A megnövekedett linolsav mennyiség a MGDG, DGDG, és PG lipidekben halmozódik fel. A SAN 9785, SAN 9789 gátló hatást fejtett ki a linolsav szintézisére.

A fotoszintetizáló membránok legjelentősebb lipidalkotóinak a galaktolipideknek jellemző tulajdonsága a magas linolénsav /18:3/ tartalom. A vizsgált vegyületek közül a FA és a MA fejtett ki gátló hatást a linolénsav szintézisére. A SAN vegyületek hatására csak kisebb mértékben változott meg az egyes lipidosztályok linolénsav tartalma.

A zsírsavak relatív mennyiségi viszonyai mellett további felvilágosítást nyújtanak a zsírsav szintézisben bekövetkezett változásokról a jellemző zsírsavarányok viszonzyszámai /2. táblázat/.

2. táblázat

		<u>MGDG</u>	<u>DGDG</u>	<u>PG</u>	<u>PE</u>	<u>TOTÁL</u>
18:3/18:2	Kontroll	6,67	2,20	0,64	1,21	2,47
	FA	1,30	0,48	0,50	1,31	1,22
	MA	0,54	0,22	0,17	0,00	0,50
	SAN 6706	2,13	0,62	-	0,57	1,91
	SAN 9785	5,57	2,65	1,30	-	3,82
	SAN 9789	9,53	2,00	-	0,73	5,71
<u>telített</u> <u>telítetlen</u>	Kontroll	0,031	0,36	8,50	2,50	0,52
	FA	0,008	0,25	1,34	1,80	0,22
	MA	0,032	0,33	0,68	29,30	0,34
	SAN 6706	0,600	0,65	-	1,80	0,58
	SAN 9785	0,300	0,74	2,15	-	0,70
	SAN 9789	0,130	4,40	-	9,60	0,88

A fotoszintetizáló membránok jellemző lipidosztályainak és a totál lipididek zsírsavarányainak változásai a vizsgált vegyületek 72 órás alkalmazása után.

A linolénsav/liholsav arányból az egyes vegyületek zsírsavdehidratációs folyamatokra gyakorolt hatására következtethetünk. A MA kezelés során kialakult linolénsav/linolsav arány értékének jelentős csökkenése a gátolt linolénsav szintézis eredménye. A SAN 6706 és a FA hatására csak kisebb mértékben csökkent a linolénsav/linolsav arány. A SAN 9785 és a SAN 9789

hatására a hányados értéke megnőtt a kontrollnál magasabb értéket vett fel. Ennek oka, hogy a linolsav szintézise kis mértékben gátlódott, míg a linolénsav mennyisége megnőtt a kontroll értékekhez viszonyítva.

A membrán-lipidek fizikai-kémiai tulajdonságaira, elsősorban fluiditására jellemző telített/telítetlen zsírsav arány a következőképpen változott az egyes kezelések során /2 táblázat/. A FA és MA kezelések esetében lecsökkent hányados értéke arra utal, hogy e két szer hatására a fotoszintetikus membránok rigiditása megnövekedett. A SAN vegyületek esetében a membránfluiditás mutatója magasabb értéket mutat a kontroll értéknél. A SAN vegyületeknek ez a membrán fluiditást növelő hatása a SAN 9789 vegyület hatására a legerőteljesebb.

A FA és MA kezelések után meghatároztuk a minták összzsírsav és összfoszfolipid tartalmát is.

A 3. táblázat adatai szerint a FA serkentő a MA gátló hatást fejtett ki a Chlorella sejtek zsírsav szintézisére. A foszfolipid tartalomban a MA kezelés nem okozott változást, míg a FA jelentős stimuláló hatást fejtett ki a Chlorella sejtek foszfolipid tartalmára. A FA kezelés hatására megnövekedett össz zsírsav tartalom és a telített/telítetlen zsírsav arány értékének.

3. táblázat

	zsírsav %		PL _{totál} %	
	/mg x 10 ⁻⁹ sejt/		/mg x 10 ⁻⁹ sejt/	
Kontroll	2,5	100	0,23	100
FA /1 mM/	3,5	140	0,52	226
MA /1 mM/	1,7	68	0,23	100

A *Chlorella pyrenoidosa* sejtek zsírsav és foszfolipid tartalma 72 órás FA- és MA- kezelés után

igen alacsony volta /a kontroll érték fele/ arra utal, hogy az intenzívebb zsírsav szintézis mellett a zsírsavak dehidratációs reakciói is fokozódtak. A MA kezelés esetében az össz zsírsav-tartalom csökkenése mellett a telítetlen zsírsavak relative magasabb mennyisége a jellemző. /2,3. táblázat/

A *Chlorella pyrenoidosa* zsírsavösszetételében előidézett változásokat összegezve más biológiai objektumon tapasztalt hatásokhoz képest a következő megállapításokat tehetjük.

1. Az 1 mM FA hatására megkétszereződik a tilakoid

membránokban a foszfolipidek mennyisége. Az össz zsírsavtartalom 140 %-os növekedést mutat, közel kétszeresére növekszik a palmitoleinsav és négyszeresére a hexadekatriénsav tartalom. A galaktolipidekben a linolsav mennyiségének megkétszereződése együtt jár a linolénsav mennyiségének több mint 50 %-os csökkenésével.

2. Az 1 mM metronidazol kezelés 40 %-al csökkenti a *Chlorella* sejtek össz zsírsavtartalmát, serkenti a hexadekatriénsav és a linolsav, valamint gátolja a linolénsav százalékos részesedését. A FA és a MA hatására csökkenő telített/telítetlen zsírsavarány a membránok fluiditásának csökkenését jelzi mindkét vegyület esetében.
3. Mindhárom piridazinon vázas vegyület hatására megnő a membránok fluiditása, a linolsav tartalom csökkenésével a linolénsav tartalom egyidejű növekedése figyelhető meg. Ezek az eredmények ellentmondanak a magasabbrendű növényeken mért szerhatásoknak /54/. A zsírsaveloszlásban előidézett további SAN- hatásokra jellemző a palmitinsav százalékos eloszlására kifejtett serkentő hatás.

A lipid- és zsírsav összetételbeli változásokra kapott kísérleti eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy sike-

rült előállítani olyan módosított lipidösszetételű *Chlorella* sejteket, amelyek alkalmasak voltak a további kísérleteinkben arra, hogy megvizsgáljuk milyen funkcionális változásokat okoz a fotoszintetikus membránstruktúra lipidkomponenseinek megváltozása a fotoszintézis 2. fotokémiai rendszerének működésében .

4.3. Az alkalmazott vegyületek hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek fotoszintetikus aktivitására.

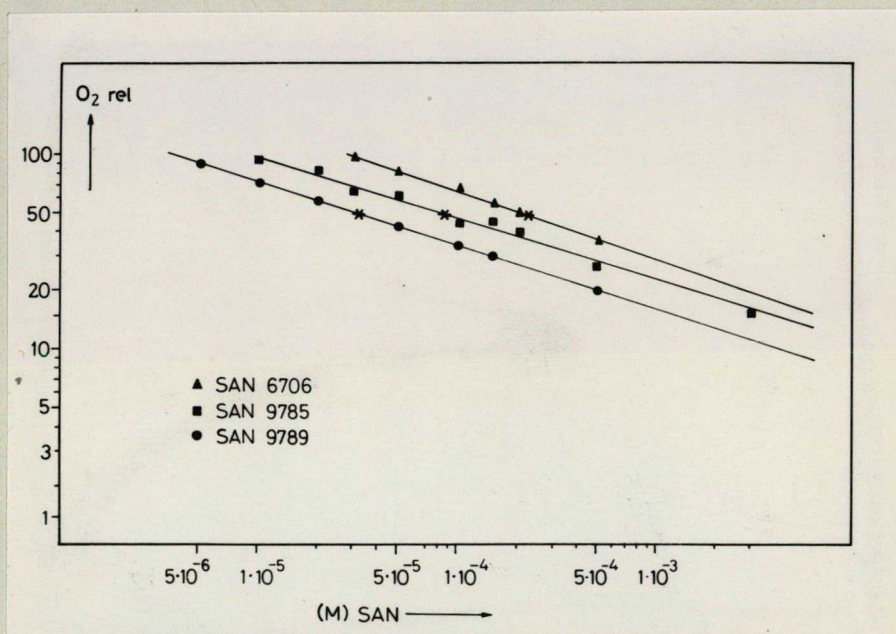
Az oxigéntermelés aktivitásának mérése.

A fotoszintetikus folyamatok aktivitásának egyik közvetlen mutatója az egyensúlyi oxigén termelő képesség mértéke. Méréseink során meghatároztuk az alkalmazott vegyületekkel kezelt *Chlorella* tenyészetek oxigén termelését a kezelési idő és a szerkoncentráció függvényében. Először azonban meggyőződünk arról, hogy a vizsgált vegyületek rendelkeznek-e azonnali /prompt/ hatással a *Chlorella* sejtek oxigéntermelésére.

Ezeknek a vizsgálatoknak a célja elsősorban az volt, hogy el tudjuk választani a vizsgált vegyületek fotoszintetikus elektrontranszport láncra kifejtett azonnali /prompt/ hatását a tilakoid membránok lipid, illetve zsírsavösszetételének megváltozásából eredő foto-

szintetikus aktivitásbeli változásoktól.

Az alkalmazott anyagok közül a három piridazinon vázas vegyület mutatott prompt hatást a fotoszintetikus elektrontranszport lánc gátlásában. Ezeket az eredményeket mutatjuk be a 14. ábrán.



14. ábra

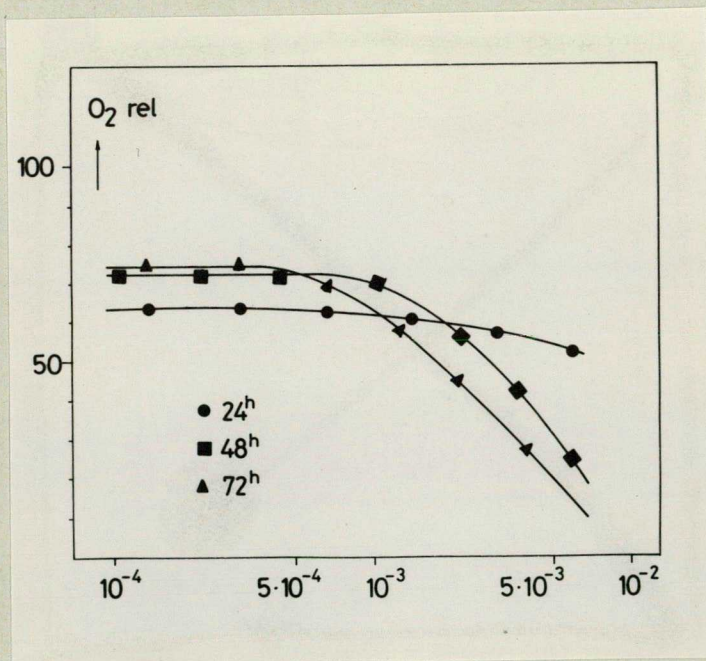
A különböző koncentrációjú piridazinon vázas vegyületek azonnali hatása a *Chlorella pyrenoidosa* sejtek kontroll %-ban kifejezett egyensúlyi oxigéntermelő képességére.

Az ábra alapján grafikus módszerrel meghatároztuk az oxigén kiválasztás 50 %-os gátlásának /I50/ értékeit: SAN 6706 = $2,5 \times 10^{-4}$ M, SAN 9785 = 9×10^{-5} M, a SAN 9789 = $3,5 \times 10^{-5}$ M.

Méréseink szerint a FA, MA, és a cerulenin prompt hatásban nem befolyásolták az algasejtek oxigéntermelő képességét.

A hosszabb idejű kezelések után a fotoszintetizáló membránjaik lipid, illetve zsírsavösszetételében módosított *Chlorella* sejtek oxigén termelő képessége a következőképpen alakult.

A 15 ábra a fenetilalkohol kezelés különböző koncentrációinak hatását mutatja be a *Chlorella* sejtek oxigéntermelő képességére.



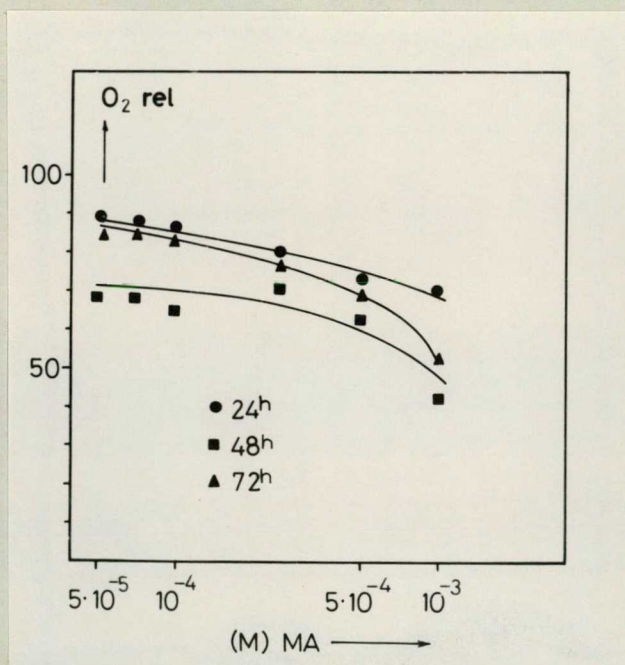
15. ábra

A különböző koncentrációjú fenetil alkohol hatása a *C. pyrenoidosa* sejtek kontroll %-ban kifejezett egyensúlyi oxigéntermelő képességére; 24, 48 és 72 órás FA-kezelés után



Az egyes kezelési időkhöz tartozó dózishatásgörbékről megállapíthatjuk, hogy a FA a kezelési idő első 24 órájában 40 %-os gátlást okozott az algasejtek oxigén-evolúciójára, a vizsgált FA koncentráció tartományában. A 48 és a 72 órás kezelési időben jellemző küszöbérték mutatkozott az oxigéntermelés gátlásában a $7,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ FA koncentrációnál. A 10^{-3}M FA-koncentrációban a 72 órás kezelés után az algasejtek egyensúlyi oxigéntermelő képessége 35 %-ban károsodott.

A MA kezelés különböző idejű és koncentrációjú hatását a *Chlorella* sejtek egyensúlyi oxigéntermelésére a 16. ábrán mutatjuk be.

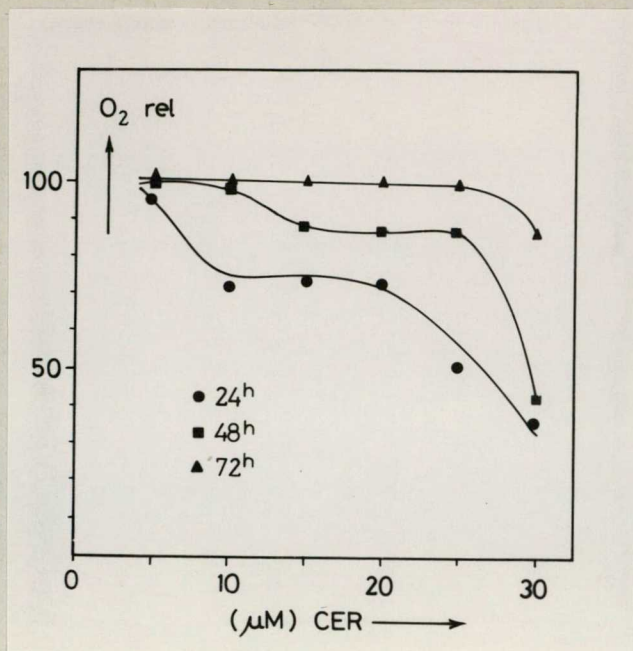


16. ábra

A különböző koncentrációjú metronidazol hatása a *C-pyrenoidosa* sejtek kontroll %-ban kifejezett egyensúlyi oxigéntermelő képességére, 24, 28 és 72 órás MA-kezelés után

A MA kezelés három időpontjában felvett dózishatás-görbe megközelítően lineáris lefutású. A MA-hatás jellemző sajáttsága, hogy a 10^{-3} M MA koncentrációban még meglévő 50 %-os oxigéntermelő kapacitás a növekvő MA-koncentráció igen szűk tartományában 10^{-3} - $8 \cdot 10^{-2}$ M/ nulla értékre zuhan /az ábrán nem jelöltük/. A cerulenin kezelés okozta lipid és zsírsavösszetételbeli változások jellemző módon befolyásolták a Chlorella sejtek oxigéntermelő kapacitását. Az irodalmi adatok szerint a 22,5 μ M koncentrációban alkalmazott cerulenin hatására, a 72 órás kezelési idő elteltével a Chlorella sejtek még a kontrollhoz hasonló mértékű oxigéntermelésre képesek a jelentősen dezorganizált sejtstruktúra ellenére /47/. A cerulenin-hatás másik speciális sajáttsága, hogy a tilakoid membránok lipidösszetételének megváltoztatásán keresztül DCMU-rezisztens oxigéntermelő képességet indukál a CER-kezelt Chlorella sejtekben /47/. Méréseink során ennek a csak egy CER-koncentrációban kimért hatásnak a kezelési időtől és a CER-koncentrációtól való függését határoztuk meg /17.ábra/.

A mérési adatokból megállapítható, hogy csak a 25-30 μ M-nál magasabb CER-koncentrációkban érvényesül a DCMU-rezisztens oxigén termelő képességet indukáló



17. ábra.

A különböző koncentrációjú cerulenin hatása a *C. pyrenoidosa* sejtek DCMU-rezisztens egyensúlyi oxigéntermelő képességére; 24, 48 és 72 órás cerulenin kezelés után.

hatás, a 72 órás kezelési idő elteltével. A 24, és a 48 órás kezelések során a kisebb CER-koncentrációban még nagyobb mértékben jelentkezik ez a hatás, ami a *Chlorella* sejtek lipid-metabolikus folyamataira kifejtett speciális hatással magyarázható /42/.

A $4 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú SAN vegyületek hatására a 4. táblázatban közöltek szerint alakult a *Chlorella* sejtek oxigéntermelő képessége.

4. táblázat

	Kontroll		SAN 6706		SAN 9785		SAN 9789	
	$\frac{\text{nM O}_2}{\text{h} \cdot 10^6 \text{sejt}}$	%	$\frac{\text{nM O}_2}{\text{h} \cdot 10^6 \text{sejt}}$	%	$\frac{\text{nM O}_2}{\text{h} \cdot 10^6 \text{sejt}}$	%	$\frac{\text{nM O}_2}{\text{h} \cdot 10^6 \text{sejt}}$	%
24 ^h	142,0	100	132,4	93,1	156,2	110,0	46,4	32,7
48 ^h			92,1	65,3	112,0	78,2	5,0	3,5
72 ^h			113,8	80,0	131,3	92,5	3,0	2,1

A $4 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú pirodazinson vázas vegyületek hatása a *C. pyrenoidosa* sejtek egyensúlyi oxigéntermelő képességére, 24, 48 és 72 órás kezelés után. A több ismétlésben elvégezett mérések eredményei 5 %-os szórástartományon belül vannak.

A 4. táblázat adatai szerint a SAN 6706 és a SAN 9785 vegyületekkel 72 órán át kezelt *Chlorella* sejtek igen magas oxigénprodukciónak képesek /80-90 %/, míg a SAN 9789-el kezelt minta minimális aktivitást mutat /2,1%/.

Ha összevetjük a 4. táblázat és a 14. ábra eredményeit, érdekes összefüggést állapíthatunk meg a SAN vegyületek oxigénevolúcióra kifejtett gátló hatását illetően. A 4×10^{-5} M koncentrációjú SAN 6706 vegyület hatására jellemző, hogy az azonnali hatásban okozott /14. ábra/, és a 72 órás kezelés során kialakult gátlás /4. táblázat/ közel azonos mértékű /10-20 %/.

A 4×10^{-5} M koncentrációjú SAN 9785 vegyület azonnali hatásban okozott 35-40 %-os gátló hatása /14. ábra/ a 72 órás kezelés során 8-10 %-ra csökkent. Feltételezésünk szerint a fotoszintetikus membránok szerkezetében és működésében olyan irányú változások mentek végbe amelyek segítségével, az alkalmazott vegyületekkel előidézett külső stressz hatáshoz az algasejt egy autoregulative megváltozott zsírsavösszetételű membránnal képes volt alkalmazkodni,

A 4×10^{-5} M koncentrációjú SAN 9789 kezelés a Chlorella sejtek oxigéntermelésére kifejtett gátló hatása, az azonnali gátló hatás 50-55 %-os értékéről, a 72 órás kezelés végén 98 %-os értékre emelkedett. A három SAN vegyület közül ennek a legerősebb hatást mutató SAN 9789 vegyületnek a hatására olyan mély változások következtek be a tilakoid membránok szerveződésében amelyek szinte teljes mértékben meggátolták az oxigénki választó rendszer működését. A fenti megállapításainkat igazolják a 2. táblázatban közölt adatok: a SAN 9789 kezelés hatására kialakult rendkívül fluid membránokban /telített/telítetlen zsírsavarány: 0,88 a kontrollénak közel kétszerese/ már nem mehetnek végbe a fotoszintézis primer folyamatai.

Az oxigén indukció mérése.

Az oxigén indukciós mérések elsősorban a 2. fotokémiai rendszer donor oldaláról, az oxigén kiválasztó rendszer működéséről adnak felvilágosítást. Az oxigénindukciós jelenséget /66/, széles körben alkalmazzák a primer fotoszintetikus folyamatok kutatásában. Maguk az indukciós görbék sokszor fajra jellemző kinetikai átmeneteket mutatnak /67, 68, 69/.

A megvilágítási fény spektrumának változtatásával nyert indukciós görbék a két fotoszisztéma működési kapcsolatáról is felvilágosítást nyújtanak /70, 71/.

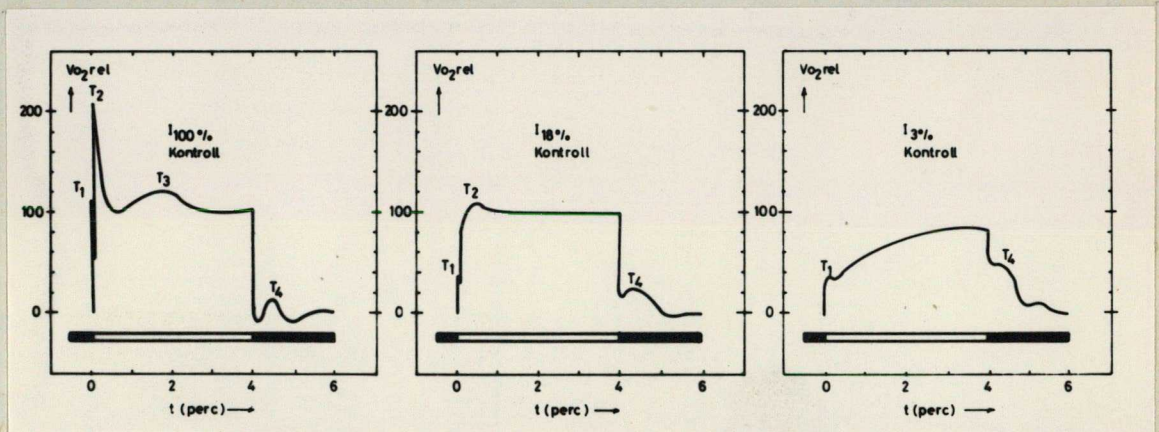
Az oxigénindukciós görbék egyes pontjainak megfeleltetésére eddig még nem sikerült biztos elméletet kidolgozni /72, 73, 74/. A görbék értelmezésének legkevésbé feltárt részlete a fénykikapcsolás után mérhető sötét oxigén produkció /75, 76, 77/.

Oxigén indukciós méréseink során az oxigénkiválasztás kinetikai vizsgálatát három jellemző fényintenzitás alkalmazásával végeztük el.

Ezt követően meghatároztuk a kezelt minták fényintenzitástól függő egyensúlyi oxigéntermelő képességének változását. A kapott telítési görbék lineáris transz-

formációjával számolt relatív telítési sebességi mutatóval jellemeztük az egyes minták 2. fotokémiai rendszerének fényhasznosító képességét.

Az előzetesen sötétre adaptált algasejt oxigéntermelő folyamatának megindulása háromféle kinetika szerint mehet végbe a megvilágítási fényintenzitástól függően /18. ábra/.



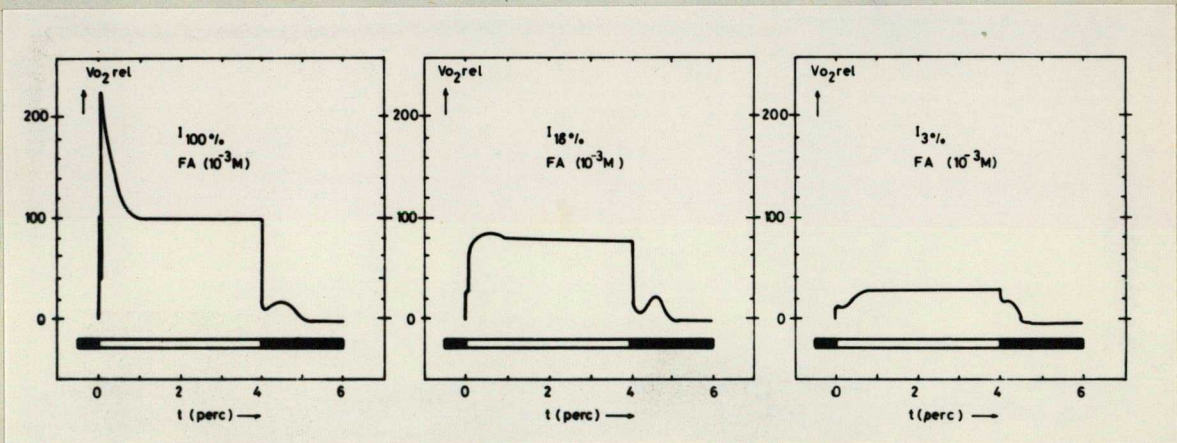
18. ábra

A *Chlorella pyrenoidosa* oxigén indukciós görbéi különböző fényintenzitásoknál.

Erős fényintenzitáson /esetünkben $12,7 \text{ mW/cm}^2$ / az algatenyészet a 18. ábrán látható nagy oxigén indukciós átmenet / T_1 , T_2 csucs/ után éri el az oxigéntermelés egyensúlyi szintjét /ábráinkon minden esetben ezt az egyensúlyi értéket vettük 100 %-nak/.

Közepes fényintenzitáson $/2,3 \text{ mW/cm}^2/$ a T_2 oxigén indukciós csúcs nem jelentkezik. Gyenge fényintenzitás alkalmazása mellett $/0,4 \text{ mW/cm}^2/$ az oxigén kiválasztás indukciós jelensége teljesen elmarad.

A FA-al kezelt sejtek három különböző fényintenzitáson felvett oxigén indukciós görbéit a 19. ábrán mutatjuk be.



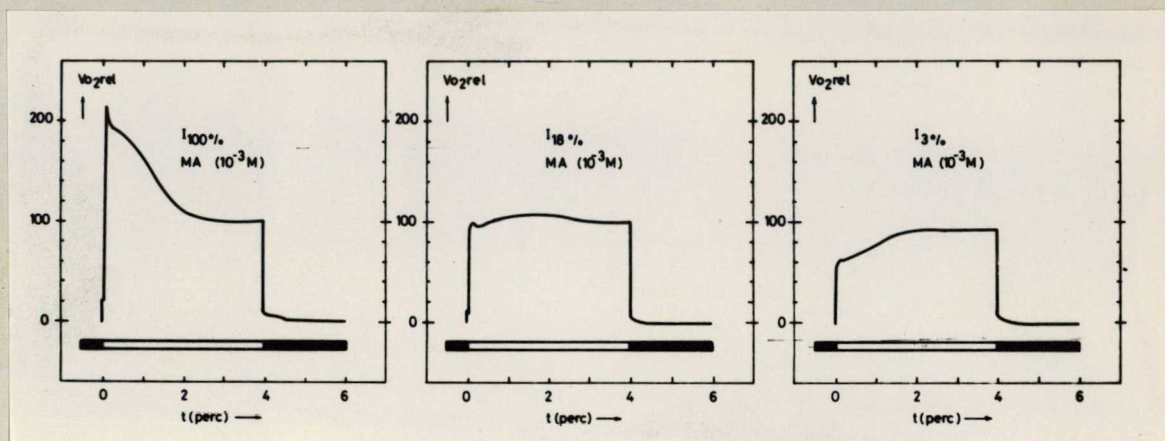
19. ábra

Az 1 mM koncentrációjú fenetilalkohollal 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* három jellemző fényintenzitáson mért oxigén-indukciós görbéi.

Az oxigén kiválasztás megindulásának kinetikai jellemzői a kontroll mintához hasonlóak, eltérés a különböző fényintenzitáson mért egyensúlyi oxigén termelés mennyiségében mutatkozik. A FA-al kezelt sejtek 3 % fényintenzitáson csak 20-30 %-os oxigénevolúcióra ké-

pesek, a kontroll esetében ez az érték 80 % fölött van.

A MA kezelés hatására jellemző módon változik meg az oxigén kiválasztás sebessége.



20. ábra.

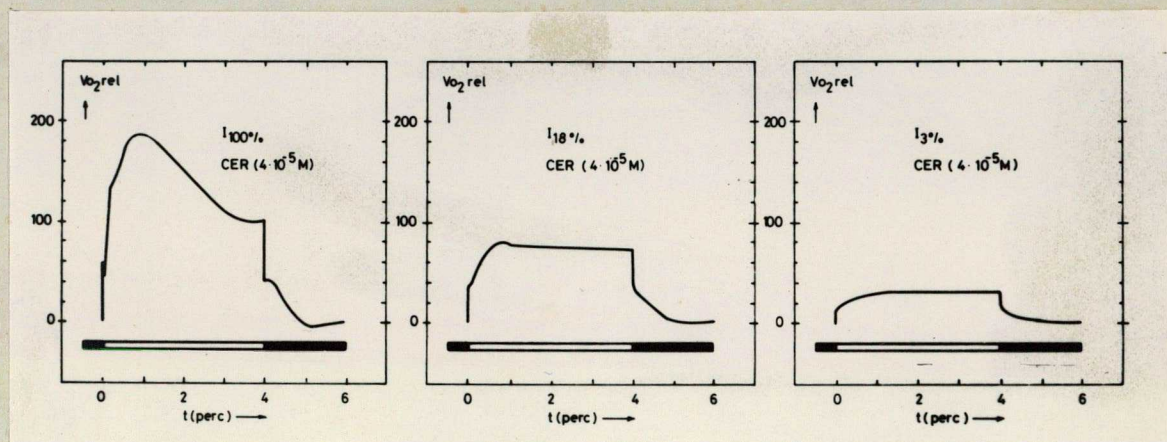
Az 1 mM koncentrációjú metronidazollal 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek három jellemző fényintenzitáson mért oxigénindukciós görbéi.

A 100 %-os fényintenzitáson mért intenzív oxigén indukció / T_2 csúcs/ időben eltolódik a megvilágítást követő 1,5-2 percig. A gyengébb fényintenzitáson mért oxigénkiválasztás sebességi jellemzői a kontrolléhoz hasonlóak.

A MA kezelés különleges sajátága, hogy eltűnik a sötét konverziós oxigén többlet / T_4 csúcs/.

A Ceruleninnel kezelt sejtek kezdeti oxigén kiválasztás-

tása sajátos gátló hatásról tanuskodik /21. ábra/, a T_2 oxigénindukciós csucs lelassulásával és időben való eltolódásával.

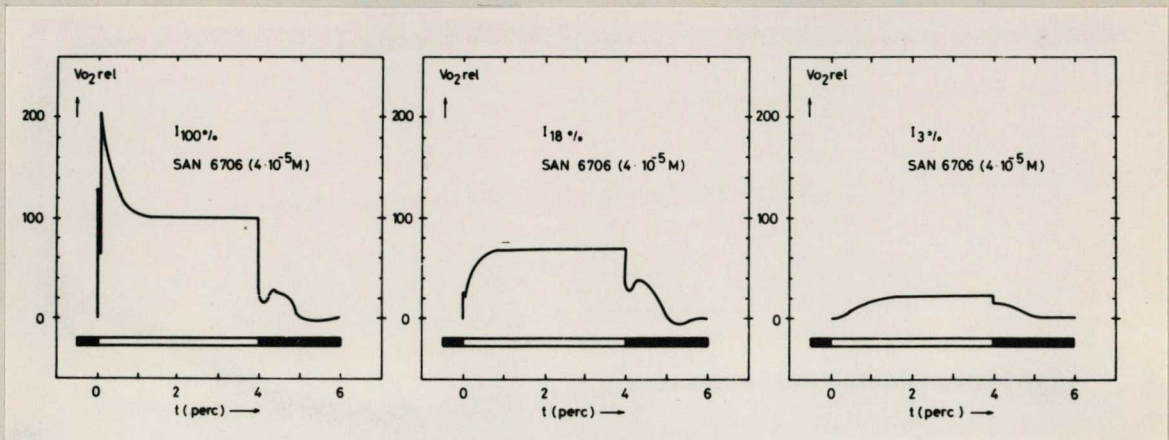


21. ábra

A $4 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú ceruleninnal 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* három jellemző fényintenzitáson mért oxigén indukciós görbéi

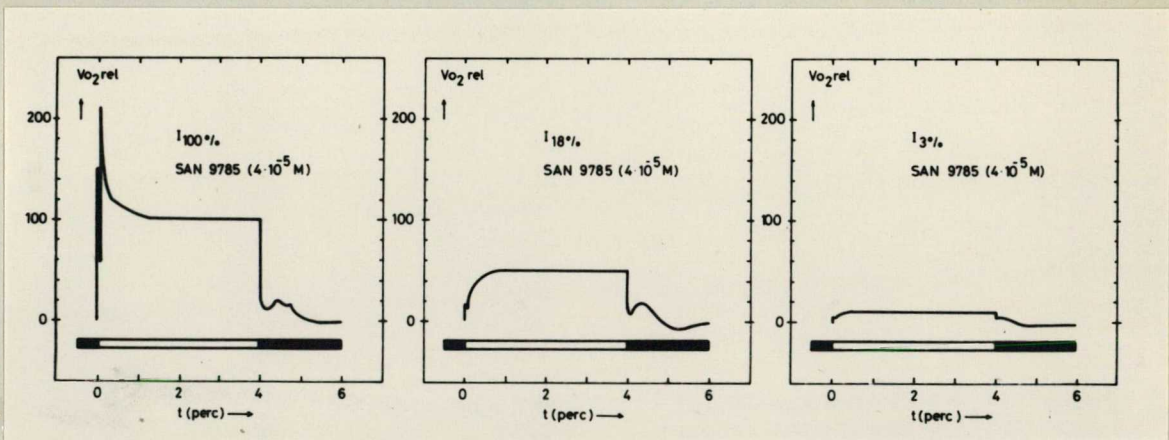
Az alacsonyabb fényintenzitások esetében is megmarad ez a lassult indukciós jelenség.

A piridazinon vázas vegyületek hatására kialakult oxigén indukciós görbék egymáshoz hasonló kinetikájú oxigén kiválasztó mechanizmusról tanuskodnak. /22, 23, 24 ábra/.



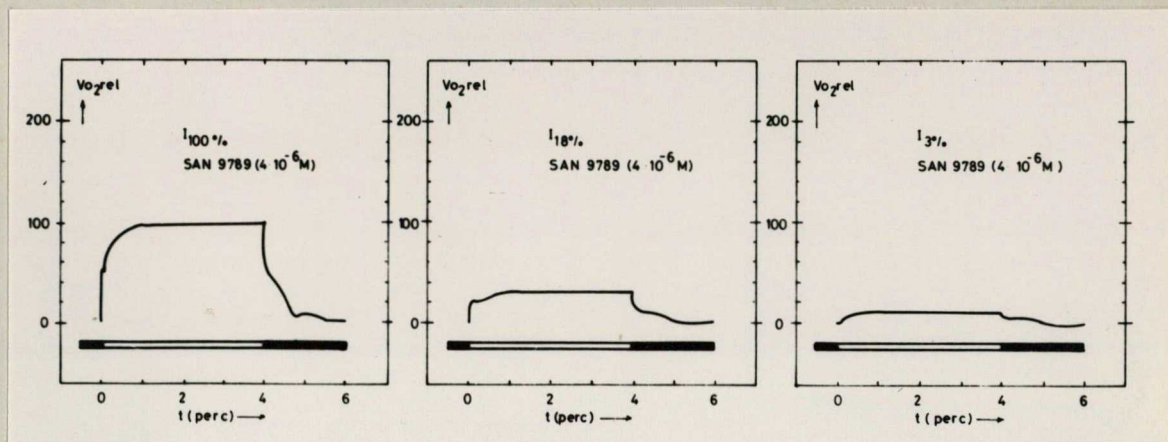
22. ábra

A $4 \cdot 10^{-5} M$ koncentrációjú SAN 6706-al 72 órán át kezelt *Chlorella* három jellemző fényintenzitáson mért oxigén indukciós görbéi.



23. ábra

A $4 \cdot 10^{-5} M$ koncentrációjú SAN 9785-al 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* három jellemző fényintenzitáson mért oxigén indukciós görbéi.



24. ábra

A $4 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú SAN 9789-al 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* három jellemző fényintenzitáson mért oxigén indukciós görbéi.

Két jellemző sajáttságot kell kiemelnünk. A SAN 9789-el kezelt *Chlorella* sejtek oxigénkiválasztó rendszere olyan mértékben károsodott, hogy 100 %-os fényintenzitáson sem tudott kialakulni indukciós jelenség /24. ábra/. A SAN 6706 kezelt sejtek esetében a 3 %-os fényintenzitás már nem volt elegendő az oxigén indukciós jelenség kialakulásához /22/c. ábra/.

A 100 %-os fényintenzitásnál kapott indukciós jelenségekből összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a FA kezelés hatására kis mértékű lassulás következett be a *Chlorella* sejtek kezdeti oxigén termelő sebességében. A MA hatására az oxigén kiválasztás sebessége megnő,

és időben elhúzódik. A CER kezelés hatására egyértelműen lelassult a kezdeti oxigénevolúció sebessége.

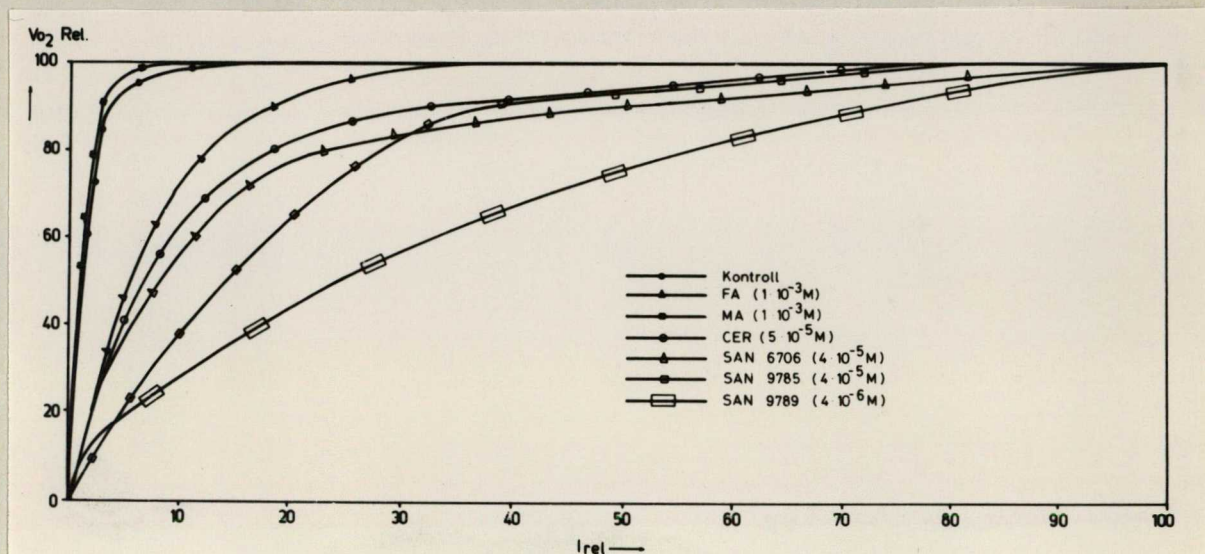
A SAN 6706, és a SAN 9785 kezelések hatására a kezdeti gyors oxigén indukció sebessége nem csökkent. A SAN 9879 kezelés nagymértékű károsodást okozott az oxigén kiválasztó rendszerben; oxigén indukció hiányában az oxigén termelés mennyisége csak lassan tudta elérni az egyensúlyi oxigén termelés szintjét.

Az alacsonyabb fényintenzitásokon kapott eltérő oxigén indukciós átmenetek azt bizonyítják, hogy az egyes kezelőszerek által módosított fotoszintetikus membránok fényhasznosító képességében eltérő mértékben következett be károsodás. Ennek a károsodásnak a mértékét határoztuk meg a további méréseink során.

Az oxigén indukciós mérésekkel a vizsgált vegyületekkel, 72 órán át kezelt *Chlorella* sejtek kezdeti oxigén termelő sebességének kinetikai sajátosságait vizsgáltuk meg. A fényintenzitás függő egyensúlyi oxigéntermelés meghatározásával mennyiségi mutatót kerestünk arra vonatkozóan, hogy hogyan változott meg a kezelt *Chlorella* sejtekben a 2. fotokémiai rendszer működéséhez rendelhető oxigénkiválasztás aktivitása.

A 25. ábrán a vizsgált szerekkel 72 órán át kezelt

Chlorella sejtek egyensúlyi oxigén termelő képességének alakulását tüntettük fel a fényintenzitás függésében.



25. ábra.

A vizsgált vegyületekkel 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* sejtek egyensúlyi oxigén termelő képességének változása a megvilágítási fényintenzitás függvényében.

Az eredmények azt mutatják, hogy a MA kezelés hatására javult a fotoszintetikus oxigén kiválasztó rendszer hatásfoka, mivel az alacsonyabb fényintenzitási értékek mellett is aktívabb oxigéntermelésre volt képes a MA-kezelt *Chlorella* tenyészet, mint a kontroll minta.

A vizsgálataink során alkalmazott többi szer a következő sorrendben fejtette ki egyre erősödő gátló hatását;

FA, CER, SAN 6706, SAN 9785, SAN 9789.

A 25. ábrán látható mérési eredményekből megállapítható, hogy a fényintenzitás és az egyensúlyi oxigén termelés között telítési jellegű függvénykapcsolat áll fenn. Ezért az egyes szerek gátlás erősségének meghatározására elvégeztük a 25. ábrán látható telítési görbék lineáris transzformációját, majd meghatároztuk az egyes regressziós egyenesek relatív telítési sebességét /78/. Ezzel a mutatóval, illetve a kontroll %-ában kifejezett százalékos értékekkel jellemeztük a fotoszintetizáló membránok fényhasznosító képességének, az alkalmazott vegyületek hatására bekövetkezett változását.

5. táblázat

	K	FA	MA	CER	SAN 6706	SAN 9785	SAN 9789
-c	0,367	0,124	0,602	0,041	0,033	0,023	0,013
%	100,0	33,8	164,1	11,0	9,0	6,3	3,6

A vizsgált vegyületekkel 72 órán át kezelt Chlorella sejtek egyensúlyi oxigéntermelő képességének fényintenzitástól függő telítési görbéiből /25. ábra/ lineáris transzformációval számolt relatív telítési sebességek /-c/ és a kontroll %-ban kifejezett értékei.

Az 5. táblázat adataiból megállapíthatjuk, hogy a MA

kezelés nagy mértékű serkentő hatást fejtett ki a Chlorella sejtek fotoszintetizáló membránjainak fényhasznosító képességére /közel 160 %-os serkentés/. A többi vegyület gátlólag hatott, legnagyobb mértékben a SAN 9789 vegyület amelynek hatására alig 3,6 %-os aktivitás volt tapasztalható a 72 órás kezelés után.

Abból a mérési eredményből következően továbbá, hogy az egyes vegyületekkel kezelt Chlorella tenyészetek eltérő fényintenzitáson érték el a maximális fotoszintetikus oxigén termelő képességük fényteltési állapotát az alábbi következtetést vonhatjuk le.

A lipid metabolizmust befolyásoló szerek hatására olyan szerveződési változások mentek végbe a fotoszintetizáló membránokban, amelyeknek eredményeképpen romlott, illetve a metronidazol kezelésekre hatására javult a 2. fotokémiai rendszer működésének határfoka.

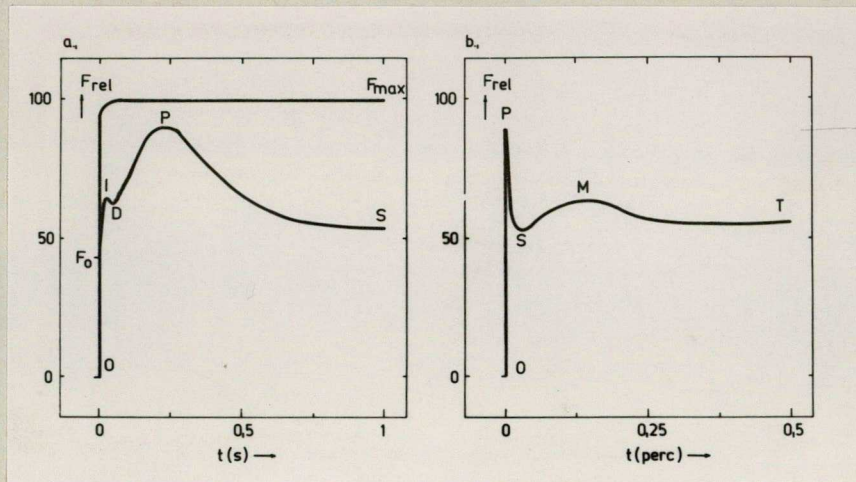
Ez a membránstruktúrában előidézett változás eredményezte az előbbieken ismertetett egyensúlyi oxigéntermelés mennyiségi mértékének csökkenését is. A metronidazol esetében különleges hatást tapasztaltunk. Az egyensúlyi oxigéntermelés mennyiségi meghatározásával megállapítottuk, hogy a 72 órán át kezelt sejtek oxigén produkciója közel 40 %-ban csökkent /16. ábra/. Az oxigénindukciós vizsgálatok viszont a vegyület serkentő

hatását igazolják a Chlorella sejtek oxigénkiválasztó rendszerére. Ez a kettős eredmény azt igazolja, hogy a fotoszintetizáló szervezetek esetében két fotoszintetikus sajátsággal; a sötétre adaptált /oxigén indukció/ és a fényre adaptált /egyensúlyi oxigén termelő/ fotoszintetikus folyamatokkal kell számolnunk. Határesetekben /amint ezt a MA-kezeléssel előidéztük/ a két folyamat élesen elkülöníthető.

A fluoreszcencia indukció mérése.

A 2. fotokémiai rendszer aktivitásának és a fotoszintetikus elektron-transzportlánc vizsgálatának egyik érzékeny módszere a fotoszintetizáló szervezetek klorofill-a molekuláinak fényindukált fluoreszcencia hatásmérése. A különböző típusú fotoszintetizáló rendszerek /növényi levél, izolált plasztisz, algaszuszpenzió stb/, előzetes sötét adaptálás után megvilágítva jellemző fluoreszcencia indukciós átmenetet mutatnak. A jelenséget, első leírójáról: Kautzky-effektus /79/, egy ún. fotokémiai kioltó /Q/ feltételezésével magyarázhatjuk /13/. Ez a Q /quencher/ a fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponense a 2. fotokémiai rendszer elektronakceptora, oxidált állapotban kioltja a fluoreszcenciát, redukált állapotban nem.

A 26. ábrán a *Chlorella pyrenoidosa* zöldsárgára jellemző fluoreszcencia indukciós görbéket mutatjuk be, gyors /s-os/, és lassú /perces/ időfelbontásban.



26. ábra

A *Chlorella pyrenoidosa* sejtek gyors /a/ és lassú /b/ fluoreszcencia indukciós görbéi DCMU-val és DCMU hozzáadása nélkül.

Ezek a kontroll görbék megfelelnek az irodalomban leírtaknak; egyes pontjainak megfeleltetését a következőkben foglaljuk össze.

A változó fluoreszcencia O-I-D-P-S indukciós átmenete a Q komponens redoxállapot változását tükrözi /13/. Az O-I fluoreszcencia intenzitás emelkedése a 2. fotokémiai rendszer reakciócentrumának aktivitását mutatja a Q komponens redukcióját is beleértve. Az I-D átmenet a Q⁻/a redukált Q/ plasztokinon által történő

reoxidációját tükrözi. Feltételezik, hogy a D fluoreszcencia intenzitás csökkenése egy dinamikus egyensúlyt jelez a Q oxidált és redukált állapota között /81/. Kimutatták továbbá, hogy anaerob körülmények között a D intenzitás csökkenése még kifejezettebb; karakterisztikus jelzője az anaerob körülményeknek.

A D-P fluoreszcencia intenzitás emelkedése, illetve a P csúcs fluoreszcencia maximuma a Q komponens relative maximális redukáltsági állapotát tükrözi és közel azonos αF_M -értékével /13/.

A P-S fluoreszcencia kioltás a Q komponens l. fotokémiai rendszer által történő reoxidálódását, valamint a fotoszintetizáló membránok mentén kialakuló pH gradiens kifejlődését jelzi; a P-S fluoreszcencia kioltás egyenes arányban van az intertilakoidális tér proton leadásával /82/.

A maximális fluoreszcencia F_M értéke meghatározható, ha a fluoreszcencia indukciós görbéket a $2 \cdot 10^{-5} M$ koncentrációjú DCMU oldat mintákhoz való hozzáadása után vesszük fel. A DCMU a leghatékonyabb elektrontranszport gátló, megakadályozza a Q komponens reoxidálódását /80/.

A DCMU-val gátolt és az "élő" indukciós görbe különbsége kirajzol egy komplementer területet, amely terület $F_0 - F_M - P$ nagysága arányos a fotoszintetikus elektrontranszport belső oxidáló képességével /71/. Az így kapott mutató alkalmas a rendszer fotokémiai aktivitásának mérésére.

A lassú fluoreszcencia indukciós görbék /83/ a tilakoid membránokon keresztül történő transzport folyamatokat tükrözik /26/b. ábra/. Analízisükből összefüggések állapíthatók meg a tilakoid membránok protontranszport és foszforilációs folyamatairól, valamint a tilakoidok NADP-pool állapotáról és az ADP/ATP arányáról /82/.

A lassú fluoreszcencia indukciós görbék M- fluoreszcencia maximuma még az elektrontranszport folyamatokkal kapcsolatos. Szétkapcsolók hatására /pl. NH_4Cl ,/ az M fluoreszcencia intenzitás növekedése kioltódik, CO_2 jelenlétében viszont megnő /84/.

Az M csúcs nagy felbontóképességű mérés technikával további részekre osztható /85, 86/.

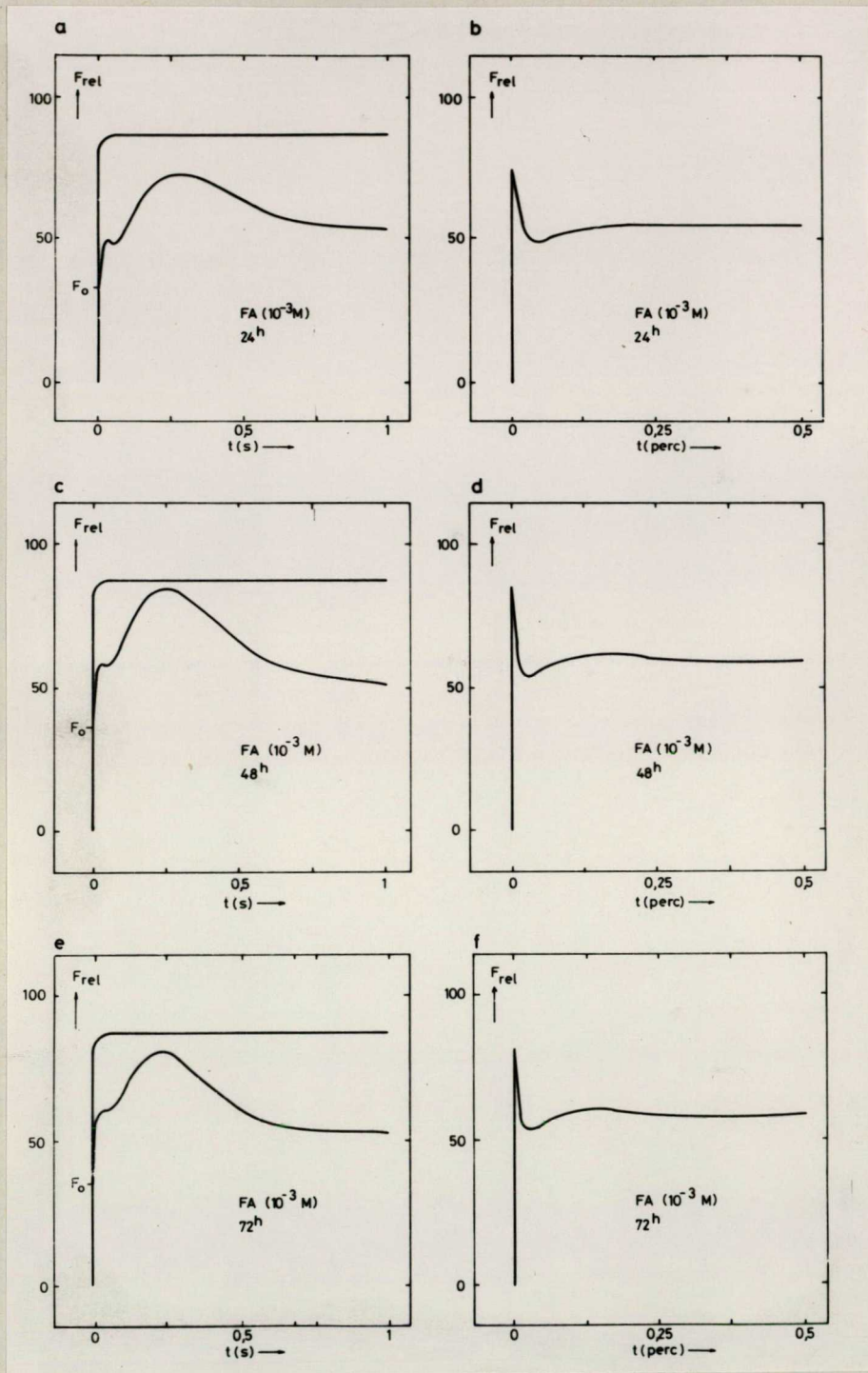
A T szint fluoreszcencia intenzitása nem állandó, megközelítőleg 1 perces periódussal változik, feltehe-

tőleg a metabolikus folyamatok periódikus működését tükrözve /82, 87, 88/.

A fenti elméleti megfontolások segítségével kerestük a választ; hogy a zsírsavösszetételükben megváltoztatott fotoszintetikus membránok milyen primer fotokémiai aktivitással rendelkeznek, hogyan változik meg a két fotokémiai rendszer együttműködése, az elektrontranszport lánc aktivitása.

A 27. ábrán az 1 mM FA kezelés hatását mutatjuk be a *Chlorella* sejtek gyors /27.a,c,e ábra/ és lassú /27. b,d,f ábra/ fluoreszcencia indukciójára, a kezelési idő függvényében.

Az adatokból megállapíthatjuk, hogy a FA kezelés hatására csak kis mértékben gátlódik az indukciós görbék kialakulása a kezelés első 24 órájában, a 48, és a 72 órás kezelés során ez a hatás állandósul. Az O-I-D-P fluoreszcencia átmenet minden esetben intenzíven jelenik meg, viszont a P csúcs intenzitásának késleltetett lecsengése arra utal, hogy a FA kezelés hatására kis mértékben lassult a fotoszintetikus elektrontranszport lánc működése, valamint, hogy gátlódott az intertilakoidális tér proton leadása. A lassú fluoreszcencia indukciós görbéken a P-S-M-T átmenetek kialakulása je-



27. ábra

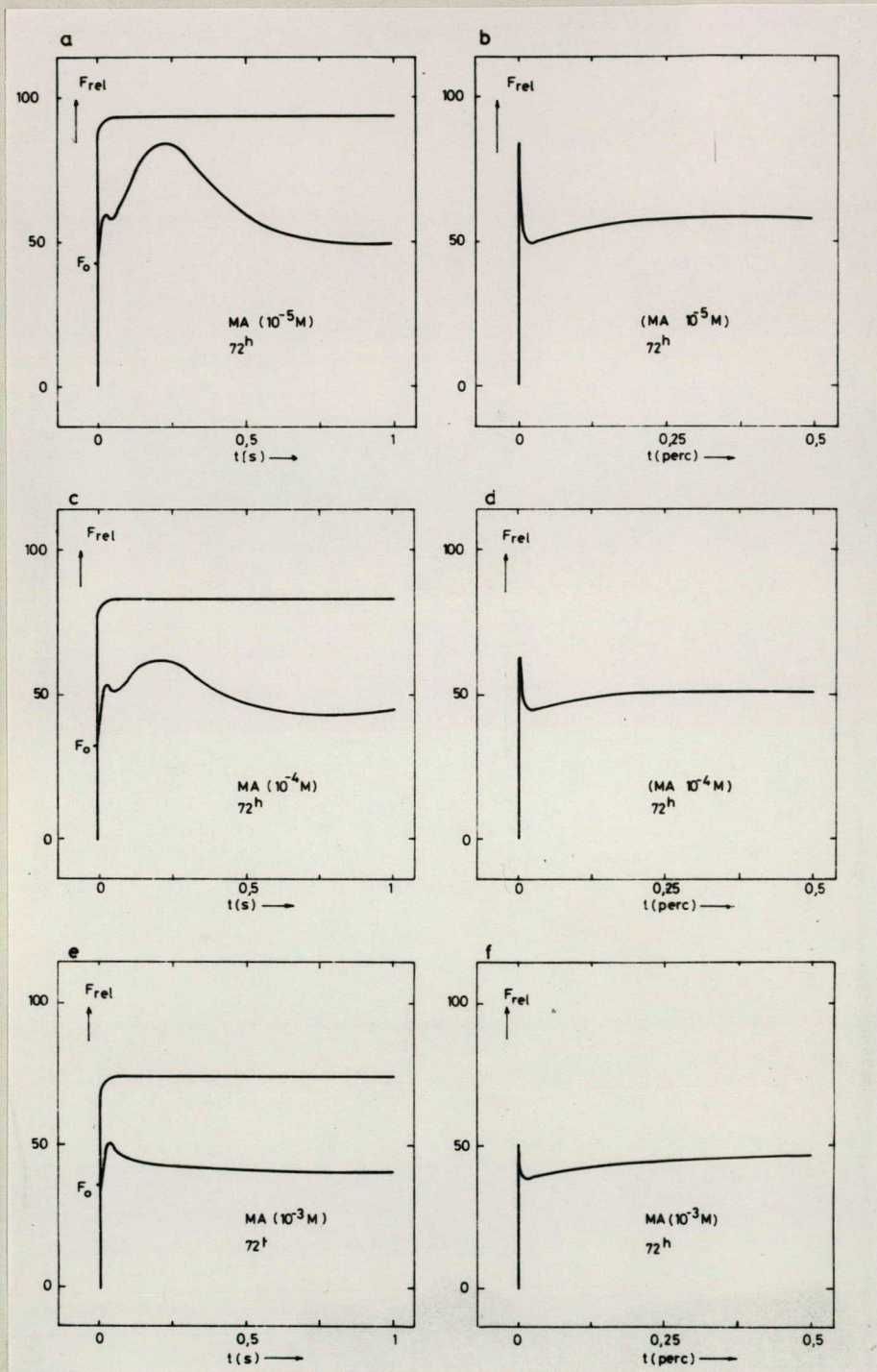
Az 1 mM koncentrációjú fenetil alkohollal 24, 48 és 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* gyors /a,c,e/ és lassú /b,d,f/ fluoreszcencia indukciós görbéi.

lentős mértékben gátlódott a kezelési idő első 24 órájában. Ez a gátló hatás csökkent a kezelés 48 és 72 órájában. Ebből az eredményből arra következtetünk, hogy a membrántranszport folyamatokban bekövetkezett gátló hatáshoz a FA-al kezelt *Chlorella* sejt egy a kezelés során megváltoztatott struktúrájú membránrendszerrel adaptálódni tudott.

A lassú és gyors fluoreszcencia indukciós görbék menetéből megállapítható, hogy a FA kezeléssel előidézett membránszerkezeti változások csak kis mértékben gátolták a fotoszintetikus elektrontranszport lánc működését.

A MA kezelés hatására bekövetkezett membránfunkcióbeli változások más természetű károsodásról tanuskodnak. A 28. ábrán a MA kezelés különböző koncentrációinak hatását tüntettük fel a *Chlorella pyrenoidosa* gyors és lassú fluoreszcencia indukciós átmeneteire, a kezelési idő 72. órájában.

Korábbi eredményeink ezt a dózis-hatás vizsgálatot tették szükségessé, mert 28/e ábrán látható gyors fluoreszcencia indukciós átmenet az irodalmi adatok szerint nagymértékű elektrontranszport-lánc gátoltságra utal, oxigén evolúciós méréseink viszont azt



28. ábra

A különböző koncentrációjú metronidazollal 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* gyors /a,c,e/ és lassú /b,d,f/ fluoreszcencia indukciós görbéi.



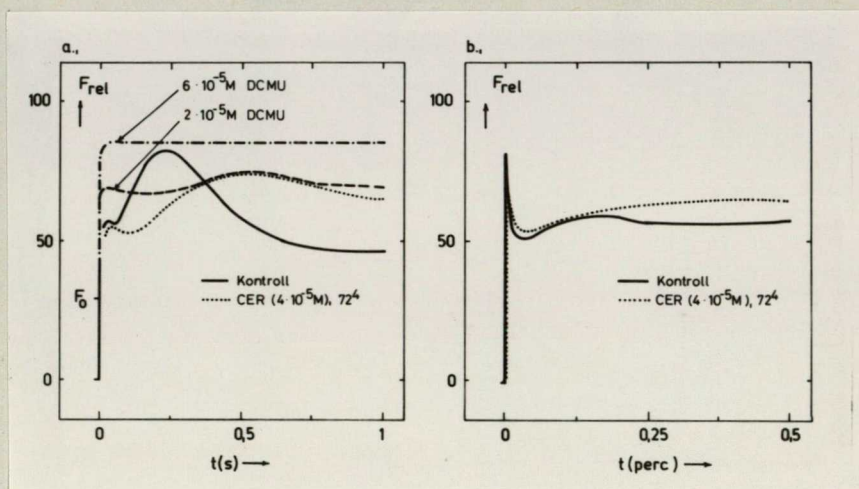
mutatták, hogy az 1mM-os MA kezelés után még jelentős /50-60 %-os/ oxigén termelésre képesek a MA-kezelt Chlorella sejtek /16. ábra/. Ezt az ellentmondást oldja fel a komplementer területek, F_0-F_M-P pontokkal határolt terület, figyelembe vétele /71/. A komplementer terület az elektrontranszport lánc aktivitásának effektív mutatója, még abban az esetben is /89/, amikor a Q-komponens nem tud teljes mértékben redukálódni /a P csúcs intenzitása alacsony értéken marad/. Ilyen esetben a komplementer terület nagysága mutatja meg, hogy az elektrontranszport lánc működésében milyen irányú változások következtek be.

Az 1 mM MA-al kezelt Chlorella minták gyors fluoreszcencia indukciós átmenetiből megállapíthatjuk, hogy a fotoszintetikus membránok összetételében bekövetkezett változások, illetve a MA metilviologén-szerű hatása következtében a Q maximális redukálhatósági szintjének gátlódása mellett nagy mértékű komplementer területtel kell számolnunk.

Abból az eredményből kiindulva, hogy a lassú fluoreszcencia indukciós görbék T-szintjének fluoreszcencia intenzitása magas értéken marad, továbbá, hogy az M-T átmenet intenzitása csökken: arra következtetünk, hogy

a tilakoid membránokon keresztül történő transzport folyamatok is jelentős mértékben károsodtak a MA-kezelés során.

A cerulenin kezelt *Chlorella* sejtek fluoreszcencia indukciós átmeneteit a 29. ábrán mutatjuk be.



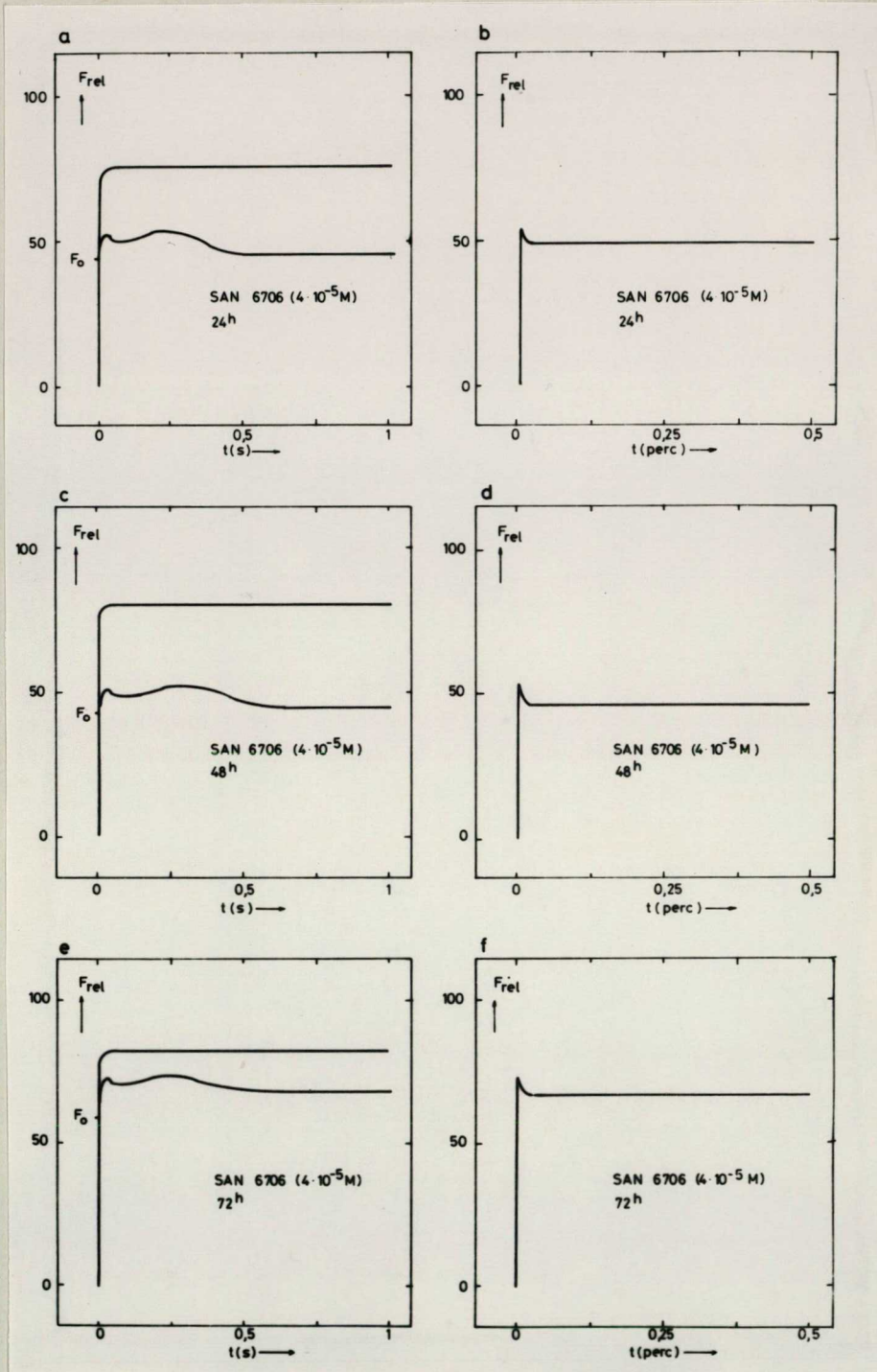
29. ábra.

A $4 \cdot 10^{-5}M$ koncentrációjú ceruleninnel 72 órán át kezelt és a kontroll *Chlorella pyrenoidosa* gyors /a/ és lassú /b/ fluoreszcencia indukciós görbéi.

Az irodalmi adatokból ismert /47/ a cerulenin kezelt *Chlorella* sejtek DCMU rezisztenciája, ezért tüntettük föl az ábrán a DCMU két különböző koncentrációjának hatását az indukciós görbék menetére. A $2 \cdot 10^{-5}M$ koncentrációjú DCMU kezelés hatására a kontroll sejtek teljes elektrontranszport gátlást szenvedtek; a 72 órás

cerulenin kezelt *Chlorella* sejtek esetében, ilyen DCMU koncentráció mellett még jelentős, közel 30 %-os elektrontranszport működés volt tapasztalható. Teljes blokkolást csak a $6 \cdot 10^{-5}$ M DCMU okozott. A ceruleninnel kezelt *Chlorella* sejtek gyors fluoreszcencia indukciós görbéről megállapítható, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc jelentős mértékben lelassult; a P csúcs fluoreszcencia intenzitási maximuma megközelítően 0,2 secundummal később jelent meg. Ennek a lassult elektrontranszport folyamatnak a hatását láttuk az oxigénindukciós görbék esetében is /21. ábra/. A perces felbontású fluoreszcencia indukciós görbék menetében bekövetkezett változások /az M-T átmenet hiánya, és a T magas fluoreszcencia intenzitási értéke/ azt mutatják, hogy a tilakoid membránok transzport folyamataiban a CER hatására jelentős gátló hatás érvényesült .

A SAN vegyületek közül a legenyhőbb hatást a fotoszintetikus elektrontranszport lánc gátlásában a SAN 6706 fejtette ki. /30. ábra/. A kezelési idő függvényében mutatott gyors fluoreszcencia indukciós görbék lefutása azt bizonyítja, hogy az elektrontranszport lánc működése erősen gátlódott; a komplementer területeknek a kezelés 24, 48 órájában mutatott magas értéke



30. ábra

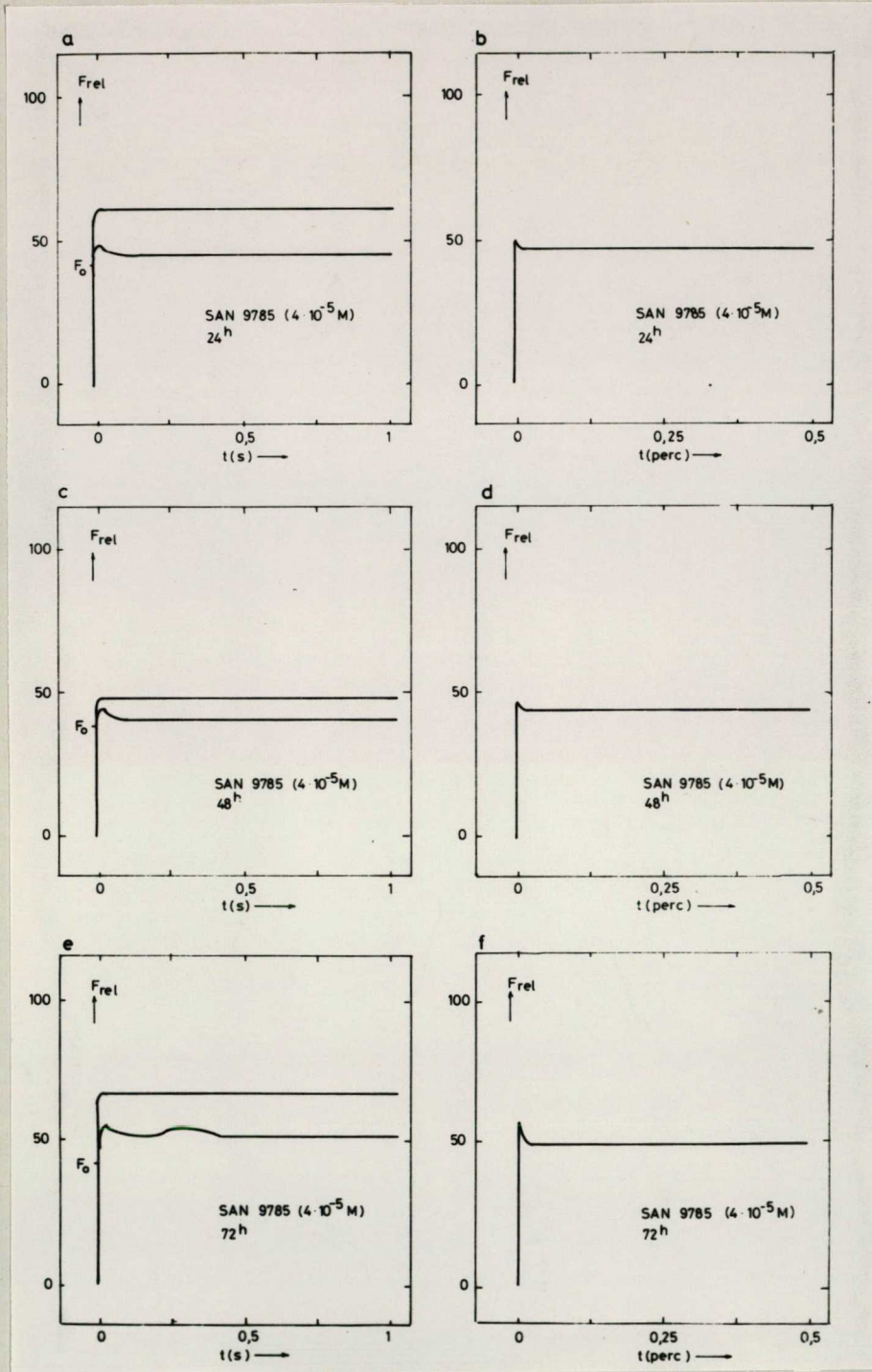
A $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ koncentrációjú SAN 6706-al 24, 48 és 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* gyors /a,c,e/ és lassú /b,d,f/ fluoreszcencia indukciós görbéi.

mellett. A maximális gátló hatás a kezelés 72. órájában következett be: ezt jelzi a differenciálatlan indukciós görbe, és a görbék kis komplementer területe /30/e ábra/.

A SAN 9785 kezelés során a jellemző gátló hatás már a kezelés első 24 órájában kialakult. Az indukciós görbék átmenetei /31/a, c, e ábra/ a többi SAN vegyület hatásmódjához hasonló gátló mechanizmus feltételezésére engednek következtetni.

A SAN vegyületekkel kezelt minták gyors fluoreszcencia indukciós görbéit elemezve /30, 31. a, c, e ábrák/ megállapíthatjuk, hogy mind a három piridazinon vázas vegyület hatásmódjában azonos jellegű gátlást okozott a Chlorella sejtek fluoreszcencia indukciós átmeneteiben. /A SAN 9789 alkalmazásával nyert közel 98 %-ban gátolt indukciós görbék nem mutatjuk be/. A $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$ koncentrációban alkalmazott SAN-vegyületek közül a legerősebb elektrontranszport gátló hatást a SAN 9789 okozta.

A piridazinon vázas vegyületekkel kezelt Chlorella sejtek lassú fluoreszcencia indukciós görbéi /30, 31. b, d, f ábrák/ a membrántranszport folyamatok azonos jel-



31. ábra

A $4 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú SAN 9785-el 2,48 és 72 órán át kezelt *Chlorella pyrenoidosa* gyors /a,c,e/ és lassú /b,d,f/ fluoreszcencia indukciós görbéi.

legü károsodásról tanuskodnak. Az S-M-T átmenetek teljes hiánya jellemző mindhárom vegyület alkalmazásakor kapott lassú indukciós görbére.

A fluoreszcencia indukciós görbék kinetikai elemzése után meghatároztuk a kezelt Chlorella sejtek 2. fotokémiai rendszerének aktivitását a Malkin által javasolt mutató ; $Q = 1 - \frac{F_0}{F_M}$, ahol az F_0 "holt" fluoreszcencia, F_M a DCMU mintákhoz való hozzáadásával kapott maximális fluoreszcencia értéke, felhasználásával /90/.

A 6. táblázat adataiból, a 72 órás kezelés során nyert eredményeket figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy a FA, és a MA közel azonos mértékben /15 %/ gátolta a Chlorella sejtek 2. fotokémiai rendszerének aktivitását, a cerulenin, a SAN 6706 és a SAN 9785 közel 50 %-os gátlást okozott, míg a SAN 9789 hatására szinte 100 %-os gátlás alakult ki.

A MA-al kezelt Chlorella sejtek fluoreszcencia indukciós görbéinek analízisének említettük, hogy a kevésbé differenciált indukciós görbe még nem biztos mutatója a fotoszintetikus elektrontranszport lánc gátlásának, abban az esetben ha az indukciós görbe kiegészítő területe még nagy aktivitást mutat. Ilyenkor.

6. táblázat

	óra	$\frac{F_o}{F_{max}}$	$\phi = 1 - \frac{F_o}{F_{max}}$	%
FA / $10^{-3}M$ /	24	0,38	0,62	95,2
	48	0,48	0,52	95,1
	72	0,46	0,54	87,4
MA 72 ^h	$10^{-5}M$	0,39	0,61	111,4
	$10^{-4}M$	0,41	0,59	94,2
	$10^{-3}M$	0,48	0,52	87,3
GER / $4 \cdot 10^{-5}M$ /	24	0,41	0,59	95,2
	48	0,45	0,55	93,4
	72	0,57	0,43	50,3
SAN 6706 / $4 \cdot 10^{-5}M$ /	24	0,61	0,49	86,2
	48	0,56	0,44	78,3
	72	0,69	0,31	55,4
SAN 9785 / $4 \cdot 10^{-5}M$ /	24	0,57	0,43	75,2
	48	0,69	0,31	55,3
	72	0,64	0,36	64,4
SAN 9789 / $4 \cdot 10^{-5}M$ /	24	0,80	0,20	35,3
	48	0,92	0,08	1,5
	72	0,93	0,07	1,4

A vizsgált vegyületek különböző időpontokban mért hatása a *Chlorella pyrenoidosa* fotokémiai aktivitására / ϕ /. A MA esetében, a különböző koncentrációk 72 órás alkalmazása után kialakult fotokémiai aktivitás értékeit tüntettük fel. /az értékek a kontroll %-ban is ki vannak fejezve/

arról lehet szó, hogy az elektrontranszport lánc Q-komponense nem tud maximális mértékben redukálódni /a Q preredukált állapotából következően, illetve másodlagos elektronakceptorok hatására/. Ennek igazolására meghatároztuk a komplementer területek fluoreszcenciájának arányát a maximális fluoreszcenciához viszonyítva. A kapott eredményeket és a kontroll %-ban kifejezett értékeket a 7. táblázatban mutatjuk be.

A 7. táblázat adataiból megállapíthatjuk, hogy a Q^-/Q állapota, illetve más összefüggésben: az elektrontranszport-lánc belső oxidáltságának mértéke /72/, a FA-al kezelt mintákban gyakorlatilag a kontrollóval megegyező mértékű, a MA-al kezelt minta esetében a 72 órás kezelési időben ez az érték közel kétszeresére nő. A SAN 6706 esetében a komplementer terület maximális csökkenése csak a 72 órás kezelés során alakul ki, a SAN 9785 kezelés során a fluoreszcencia indukciós görbe átmeneteinek és a Q redoxállapotát mutató index értékeinek együttes csökkenése tapasztalható. A SAN 9789 esetében mutatkozik a legerősebb gátló hatás, a kezelési idő 72 órájában.

7. táblázat

	óra	$\frac{Q^-/Q}{F_{\max}} \times 100$	%
FA / 10^{-3} M/	24	7,8	99,1
	48	4,4	62,3
	72	5,7	110,4
MA 72 ^h	10^{-5} M	5,4	116,3
	10^{-4} M	7,3	155,6
	10^{-3} M	9,2	196,4
SAN 6706 / $4 \cdot 10^{-5}$ M/	24	8,4	131,1
	48	8,6	126,4
	72	4,6	60,8
SAN 9785 / $4 \cdot 10^{-5}$ M/	24	7,1	92,3
	48	3,6	64,0
	72	5,3	70,5
SAN 9789 / $4 \cdot 10^{-5}$ M/	24	5,9	92,3
	48	1,3	23,6
	72	1,7	4,4

A $2 \cdot 10^{-5}$ M koncentrációjú DCMU-val gátolt és alkalmazott vegyületek hatására kialakult fluoreszcencia indukciós görbék különbségéből számított komplementer területek nagysága és a kontroll %-ban kifejezett értékei.

Összefoglalva a fluoreszcencia indukciós méréseink tapasztalatait megállapíthatjuk, hogy a lipid, illetve zsírsavösszetételükben megváltoztatott fotoszintetikus membránok 2. fotokémiai rendszerének aktivitása a FA és MA kezelések hatására gyakorlatilag 15 %-os gátlást szenvedett /6, 7 táblázat/. A cerulenin, a SAN 6706 és a SAN 9785 kezelés esetében közel 50 %-ban csökkent a PS II aktivitása. A SAN 9789 vegyület alkalmazása során közel 98 %-os gátlás alakult ki a kezelt sejtek 2. fotokémiai rendszerének aktivitásában. Ezek a különböző gátló hatások eltérő hatásmechanizmus útján mentek végbe, amint ezt a gyors fluoreszcencia indukciós görbék menetei mutatták.

A IA és a SAN vegyületek hatásmechanizmusában kimutattuk, hogy a kevésbé differenciált gyors fluoreszcencia indukciós görbék ellenére is jelentős fotokémiai aktivitással kell számolni abban az esetben, ha az indukciós görbék komplementer területei magas értéket mutatnak /az irodalomban hasonló összefüggés még nem volt ismeretes napjainkig/.

ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatom célja a fotoszintetikus membránok lipid-és zsírsavkomponenseinek komplex vizsgálata volt.

Munkám szorosan kapcsolódik a Biofizikai Tanszéken folyó fotoszintetizis kutatásokhoz, amelyek korábban csak a cerulenin /CER/ és a piridazinon típusu herbicidek /SAN/ Chlorella sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatára irányultak. Az értekezésemben foglaltak egyrészt a korábbi vizsgálatok folytatása, másrészt a fenetilalkohol /FA/, és a metronidazol /MA/ gátlószerekkel végzett kutatások kezdeti szakaszát jelentik.

Az alkalmazott vegyületekkel végzett előzetes vizsgálatok során meghatároztuk a FA, a MA és a CER, valamint a 4×10^{-5} M koncentrációju piridazinon vázas vegyületek Chlorella pyrenoidosa sejtek szaporodására kifejtett dozishatás görbéit, A szaporodás görbék alapján kiválasztottuk azokat a szerkoncentráció értékeket /FA és a MA esetében 1×10^{-3} M, a CER és a SAN vegyületek esetében 4×10^{-5} M, amelyek alkalmazása mellett végeztük további funkcionális kísérleteinket.

Az 1×10^{-3} M koncentrációju FA és MA, a 72 órás kezelési idő után jellemző módon változtatta meg a Chlorel-

la pyrenoidosa sejtek elektronmikroszkópos szerkezetét. A FA és a MA hatására mélyreható változások mentek végbe a tilakoid membránok fotoszintetikus pigmentjeinek szerveződésében és a Pigmentrendszerek közötti energia eloszlásában. A fluoreszcencia szinképek spektrális eloszlásában bekövetkezett változások arra engednek következtetni, hogy a FA és a MA hatására különösen a 2. fotokémiai rendszerhez tartozó pigmentformák szerveződésében történt maradandó változás.

Az alkalmazott vegyületek megváltoztatták a Chlorella pyrenoidosa fotoszintetizáló membránjainak lipid és zsírsavösszetételét. A fotoszintetikus membránok zsírsaveloszlásában történt változásokat a tilakoid membránok jellemző lipidosztályaiban /MGDG, DGDG, PG/ valamint az általánosan előforduló PE lipidosztályban vizsgáltuk meg. A FA és a MA hatására jellemző volt, hogy az MGDG, a DGDG és a PG lipidosztályokban 2-3-szorosára növelte meg a hexadekatriénsav /16:3/, valamint közel kétszeresére a linolsav /18:2/ tartalmát. A FA és a MA hatásának további közös tulajdonsága megnyilvánult a linolén-sav /18:3/ mennyiségének 50%-os gátlásában az MGDG, DGDG-ben. Ezeknek a hatásoknak az eredményeként a sejtek totál lipidjeiben a telített/telítetlen zsírsavarány értéke lecsökkent a kontroll 0,52-es értékéről;

a FA kezelés hatására 0,22-re, a MA hatására 0,34-re. A lipidek és zsírsavak mennyiségi eloszlásában bekövetkezett változásokra jellemző, hogy a FA serkentő, a MA gátló hatást fejtett ki a Chlorella sejtek zsírsav szintézisére, emellett a FA speciális stimuláló hatást fejtett ki a Chlorella sejtek foszfolipid szintézisére.

A piridazinon vázas vegyületek egymáshoz hasonló hatást fejtettek ki a fotoszintetikus membránok zsírsav eloszlására. A vegyületek hatására jelentősen megnőtt a palmitinsav /16:0/ aránya mind a négy vizsgált lipid osztályban. Kisebb mértékű stimuláló hatás érvényesült a palmatoleinsav /16:1/ arányának növelésében is. E vegyületek kis mértékű gátló hatást fejtettek ki a hexadatriénsav /16:3/, és az olajsav /18:1/ galaktolipidekben való előfordulására. Ezeknek a hatásoknak a következtében mindhárom piridazinon vázas vegyület hatására megnövekedett a totál lipidek telített/telítetlen zsírsav aránya. Ezek a hatások^a membránfluiditás jelentős mértékű növekedését mutatják, a SAN kezelések hatására, ellentétben a FA és MA hatására kialakult rigid membránokkal szemben.

A SAN vegyületek zsírsav szintézisre kifejtett hatásá-

val kapcsolatban ki kell emelnünk egy fontos saját-
got. A korábbi, magasabbrendű növényeken végzett vizsgál-
atokkal megállapították, hogy a piridazinon vázas ve-
gyületek specifikus gátló hatást fejtenek ki a linolén-
sav /18:3/ szintézisére, a linolsav szintézis egyidejű
serkentésével. Vizsgálataink szerint a SAN vegyületek-
nek ez a hatása a Chlorella zöldalgában ellentétes
irányban érvényesül; a SAN 6706 vegyület kivételével,
mind a SAN 9785, mind a SAN 9789 kezelés hatására, je-
lentős mértékben növekedett meg a Chlorella sejtek totál
lipidtartalmának linolénsav/linolsav aránya, a kont-
roll értékéhez viszonyítva.

A lipid, illetve zsírsav összetételükben módosított
Chlorella pyrenoidosa fotoszintetikus aktivitásának
vizsgálatával /az egyensúlyi oxigéntermelő képesség
mérése alapján/ megállapítottuk, hogy a 72 órás kezelés
után a SAN 9789 hatására 98%-os, a FA, LA, SAN 6706,
SAN 9785 esetében pedig 10-40%-os gátlás következett
be, az azonos sejtszámú kontroll mintához viszonyítva.

Az oxigén indukciós vizsgálatok segítségével elemzése-
ket végeztünk arra vonatkozóan, hogy a fotoszintetikus
membránok strukturális felépítésében előidézett válto-

zások hogyan hatottak a fotoszintetikus oxigénkiválasztás indukciós szakaszára. A FA kezelés hatására csak kis mértékű változást tapasztaltunk az oxigénkiválasztás kinetikájában. A MA - al 72 órán át kezelt minták indukciós görbéiből eltűnt a sötét konverziós oxigén termelés. A CER kezelés hatására egy lelassult működésű oxigénkiválasztó rendszer alakult ki, a *Chlorella pyrenoidosa* fotoszintetizáló membránjaiban. A SAN vegyületek közül a SAN 9789 hatására még 100 %-os fényintenzitás alkalmazása mellett sem tudott oxigénindukciós jelenség kialakulni, míg a másik két SAN vegyület oxigén indukciója a kontroll mintákéhoz hasonló kinetikát mutatott, 100 %-os fényintenzitás mellett.

A 2. fotokémiai rendszer és a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc működésében bekövetkezett változásokról mélyebb ismereteket a fluoreszcencia indukciós vizsgálatokkal nyertünk. A kontroll *Chlorella* gyors és lassu időfelbontású fluoreszcencia indukciós görbéi amelyek megegyeztek az irodalomban közöltekkel normális fotoszintetikus elektrontranszportláncot és O_2 -kiválasztó rendszert tükröznek.

A lipid metabolizmust módosító szerekkel történt kezeléseket után a fluoreszcencia indukciós görbék minden esetben gátolt fotoszintetikus elektrontranszport-lánc mű-

ködésre utalnak, a fluoreszcencia indukció klasszikus elmélete szerint. Ennek ellenére kísérleti eredményeink azt bizonyítják /oxigén termelés és indukció vizsgálatok/, hogy a mért, gátolt fluoreszcencia indukciós jelenség ellenére a sejtek jelentős fotoszintetikus aktivitással /oxigén termelés/ rendelkeznek, a SAN 9789 kivételével, minden kezelés esetében. Ennek az irodalomban még nem ismertett anomáliának a vizsgálatát, a klasszikus fluoreszcencia indukció értelmezése alapján végeztük el. Az egyes kezelőszérekkel 72 órán át kezelt *Chlorella* sejtek 2. fotokémiai rendszere aktivitásának a kontroll %-ban kifejezett értékei a következőknek adódtak: a FA, MA kezelés hatására 80-90%, SAN 6706 kezelésre 50-60%, SAN 9785 hatására 60-70%, SAN 9789 kezelés esetében 3-4%. Mérési eredményeink azt bizonyítják, hogy az alkalmazott vegyületek elsődleges hatásukat nem a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc közvetlen működésére fejtették ki, hanem az egész fotoszintetizáló membránrendszer általános működését módosították.

Az oxigén termelésben és a fluoreszcencia indukcióban tapasztalt anomáliákra csak további részletes vizsgálatok adhatnak felvilágosítást.

A dolgozat további eredménye, hogy az alkalmazott .
módszerekkel sikerült megvalósítani olyan in vivo rend-
szert amelyben többoldaluan lehetett vizsgálni a foto-
szintetikus membránok szerveződésének és működésének
sajátosságait.

I r o d a l o m

- /1/ Robertson J.D. /1981/: Membrane structure. J.Cell. Biol. 91. 189_s-204_s.
- /2/ Singer, S.J. and G.L. Nicholson /1972/ The fluid mosaik model of the structure of cell membranes. Science, 175. 720-731.
- /3/ Leech, R.M. and O.J. Murphy /1977/: The biosynthesis of the acyl lipids of chloroplast. IN: The intact Chloroplast, ed J. Barber, pp. 379-401, Elsevier, Amsterdam-London-New-York-Oxford
- /4/ Leese, B.M. and R.M. Lech /1977/: Biosynthesis and structure of leaf lipids: lipid changes during plastid and leaf development. Biochem. Soc. Transactions 5. 1266-1269.
- /5/ Szalay, L /1977/: Fotoszintézis. In: Biofizika, ed. J. Ernst, pp 436-461, Akadémiai Kiadó, Bpest.
- /6/ Szalay, L. E.Lehoczky/1979/: A fotoszintézis biofizikájának időszerű kérdései. In: A biológia aktuális problémái 17. ed. Gy.Csaba, pp. 9-89, Medicina Kiadó.
- /7/ Emerson, R.L. and W. Arnold /1932/: The photochemical reaction in photosynthesis .J.Gen. Physiol. 16. 191.
- /8/ Duysens, L.N.M, J. Amesz and B.M. Kamp /1961/: Two photochemical systems in photosynthesis Nature, 190. 510-511.

- /9/ Hill, R. and F. Bendall /1960/: Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. Nature. 186. 136-137.
- /10/ Trebst, A and M. Auron /1977/: Photosynthesis I., In: Encyclopedia of Plant Physiology, New-Series, Vol. 5 pp. 1-4.
- /11/ Arnon, D.I., F.R. Whatley, M.B. Allen /1958/: Assimilatory Power in Photosynthesis. Science, 127. 1026-1034.
- /12/ Pfister, K. and C.J. Arntzen /1979/: The Mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant Weed Biotypes. Z. Naturforsch. 34.c., 996-1009.
- /13/ Duysens, L.N.M., H.E. Sweers /1963/: The mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: Studies on microalgae and photosynthetic bacteria, eds. Japanese Society of Plant Physiologists, pp. 353-372. University of Tokyo Press.
- /14/ Kok, B., B. Forbusch and M. McGlavin /1970/: Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution-I. A linear four step mechanism. Photochem. Photobiol. 11. 457-475.
- /15/ Mitchell, P. /1961/ Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a

chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191. 144-148.

- /16/ Kates, M./1970/: Plant phospholipids and Glycolipids. In: Advances in Lipid Research, 8., ed. R. Paoletti, D. Kritchevsky, pp. 225-267. Academic Press, New-York and London.
- /17/ Kochubei, S.M, T.M. Shadchina, A.A. Konenko, E.P. Lukashev, K.N. Timofeev and D.N. Matorin /1975/: Effect of galactolypase on photoreactions in hight chloroplast fragments. Photosynthetica, 9. 255-260.
- /18/ Gounnaris, K.and J. Barber /1983/: Monogalactosyl-diacylglycerol: the most abundant polar lipid in Nature. TIES, okt. 378-381.
- /19/ Rosenberg, A. /1967/: Galactosyl diglycerides: Their possible function in Euglena chlorepplast. Science, 157. 1191-1196.
- /20/ Murphy, D.J. /1982/: The importance of non planar bilayer regions in photosinthetic membranes and their stabilisation by galactolipids FEBS lett. 150. 19-26.
- /21/ Israelachvili, J.N, S .Marcelja and R.G. Horn/1980/: Physical principles of membrane organizati-on. Quart. Rev. Biophys. 13. 121-200.
- /22/ Benson, A.A. and I. Shibuya /1962/: Surfactant lipids. In: Physiology and biochemistry of algae. ed. R,A. Lewin pp. 371-381. Academic Press, New York, London.

- /23/ GURR, M.I., A.T. James, ed ./1980/ Lipid biochemistry: An introduction Chapman and Hall, London, New York.
- /24/ James, A. T. and B.W. Nichols /1966/: Lipids of photosynthetic systems. Nature, 210. 372-375.
- /25/ Bergelson, L.D. and L.I. Barsukov /1977/: Topological asymmetry of phospholipids in membranes. The distribution of phospholipids in biological membranes is related to that in bilayer membranes of small vesicles. Science, 197. 224-230.
- /26/ Benson, A.A. and E.H. Strickland /1960/: Plant phospholipids III. Identification of diphosphatidyl glycerol. Biochim. Biophys. Acta, 41. 328-333.
- /27/ B.R. Jordan, W-S. Chow and A.J. Baker, /1983/: The role of phospholipids in the molecular organisation of pea chloroplast membranes Effect of phospholipid depletion on photosynthetic activities BBA 725. 77-86.
- /28/ Raughan, P.6. and N.K. Boardman /1972/: Lipid composition of pea and bean leaves during chloroplast development. Plant Physiol. 50. 31-34.
- /29/ Hase, E., H. Otsuka, S. Mihara and H. Tamiya /1959/ Role of sulfur in the cell division of Chlorella, studied by the technique of synchronous culture. Biochim. Biophys Acta. 35. 180-189.

- /30/ Lehninger, A.L. /1975/: Biochemistry /The molecular basis of cell structure and function/. pp. 659-691.2 ed. Worth Publishers, Inc. New York.
- /31/ O'Brien, J.S. and A.A. Benson /1964/: Isolation and fatty acid composition of the plant sulfolipid and galactolipids. J. Lipid Res., 5. 432-436.
- /32/ Bloch, K., G. Constantopoulos, C. Kenyon and J. Nagai /1967/: Lipid metabolism of Algae in the light and in the Dark. In: Biochemistry of Chloroplast, ed. T.W. Goodwin, pp. II. 197-211, Academic Press, London and New York
- /33/ Goodwin, T.W. /1971/ Biosynthesis by chloroplast In: Structure and Function of Chloroplast, ed. M. Gibbs, pp. 215-276, Springer, Berlin-Heidelberg-New-York.
- /34/ Berrah, G. and W.A. Konetzka /1962/: Inhibition of replication of bacteriophage T2 by phenethyl alcohol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 8. 407-410.
- /35/ White J.R. and H.L. White /1964/: Phenethyl alcohol synergism with mitomycin C, porfiromycin, and streptogrinin. Science, 145. 1312-1313.

- /36/ Nunn, W.D. /1975/: The inhibition of phospholipid synthesis in *Escherichia coli* by phenethyl alcohol. *Biochim. Biophys. Acta* 380. 403-413.
- /37/ Nozawa, Y., R. Kasai and T. Sekiya /1979/: Modification of membrane lipids. Phenethyl alcohol-induced alteration of lipid composition in *Tetrahymena* membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 552. 38-52.
- /38/ Knutsen, G /1966/: Effects of Phenylethyl alcohol on *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.* 19. 142-151.
- /39/ Edwards, D.I., G.E. Mathison, And D.J. Platt /1974/: Metronidazole - an antimicrobial drug which inhibits photosynthesis. *Z. Pflanzenphysiol.*, 71. 424-427.
- /40/ Schmidt, G.W., K.S. Matlin and Nam-Hai Chua /1977/: A rapid procedure for selective enrichment of photosynthetic electron transport mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74. 610-614.
- /41/ Harwood, J.L., F. Roberto, D.J. Murphy, T.M. McKeon and P.K. Stumpf /1980/: Inhibition of fatty acid biosynthesis by metronidazole. *Biochem. Soc. Transaction.* 8. 535.-
- /42/ D' Agnolo, G I.S. Rasenfeld, J. Awaya, S. Omura and P.R. Vagelos /1973/: Inhibition of fatty

acid synthesis by the antibiotic cerulenin. Specific inactivation of B-ketoacyl-acyl carrier protein synthetase. BBA, 326. 155-166.

- /43/ Laskay, G. E. Lehoczki and L.Szalay /1980/:
Effects of cerulenin and pyridazinone herbicides on the greening of barley leaves under a low intensity of light. Acta Biol Szeged, 26. 21-31.
- /44/ Laskay, G/1981/ Lipidek szerepe a fotoszintetikus membránok szerveződésében. Egyetemi Doktori értekezés, Szeged.
- /45/ Herczeg T. E. Lehoczki , T. Farkas, I. Rojik and L.Szalay /1979/: Cerulenin-induced modification of Structural and photosynthetic characteristics in Chlorella. 2. Pflanzensphysiol. 94.s. 55-64
- /46/ Szalay.L.E. Lehoczki, T.Herczeg, G. Laskay /1982/: Photosynthetic properties of chemically modified membranes of algae and higher plants. Zagad. Biofiz. Wspolc, 7. 59-70.
- /47/ Lehoczki, E.T. Herczeg and L.Szalay/1979/: Dichlorophenylurea-resistant oxygen evolution in Chlorella after cerulenin treatment. BBA, 545. 376-380.

- /48/ Szalay, L. E. Lehoczki, T. Herczeg, G. Laskay /1981/:
The effects of inhibitors of the biosynthesis of fatty acids on the structures and functions of photosynthetic membranes. *Zagad. Biofiz. Wspólcz.*, 6. 53-66.
- /49/ Lehoczki, E. Yu. Zecinov /1982/: Unusual photosynthetic oxygen evolution I. Cerulenin-induced 3-/3,4-dichlorophenyl/-1,1- diethylurea insensitive oxygen evolution in *Chlorella pyrenoidosa*. *Photobiochem. Photobiophys.* 7.
- /50/ Hilton, J.L. A.L. Scharen, J.B. St. John, D.E. Moreland and K.H. Norris /1969/: Modes of action of pyridazinone herbicides. *Weed Sci.* 17, 541-547.
- /51/ Herczeg, T.E. Lehoczki, I. Rojik, I. Vass, T. Farkas and L. Szalay /1980/: Stimulatory effects of pyridazinone herbicides on *Chlorella*. *Plant Sci. lett.* 19.285-294.
- /52/ Bartels, P.G. and A. Hyde /1970/: Chloroplast development in Sandoz-6706-treated wheat seedlings. *Plant Physiol* 45. 807-810.
- /53/ Laskay, G. T. Farkas, E. Lehoczki, and K. Gulya /1983/: Effects of pyridazinone herbicides during chloroplast development in detached barley leaves II. Effect on Lipid content, fatty acid composition and ultrastructure of chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 38.c. 741-747.

- /54/ Laskay, G., E. Lehoczki, I. Maróti and L. Szalay
/1983/: Effect of pyridazinone herbicides
during chloroplast Development in detached
barley leaves I. Effects on pigment
accumulation and fluorescence properties.
Z. Naturforsch, 38c. 736-740.
- /55/ Lem, N.W, J.P. Williams /1981/: Desaturation of
fatty acids associated with monogalac-
tosyl diacylglycerol: The effects of
SAN 6706 and SAN 9785, Plant Physiol.
68. 944-949.
- /56/ Herczeg, T. E. Lehoczki and I. Szalay /1979/: The
prompt effect of pyridazinone herbicides
on the primary processes of photosynthe-
sis. FEBS Letters, 108. 226-228.
- /57/ Herczeg, T. /1978/ Lipidhiány hatása Chlorella sejtek
szerkezetére és fotoszintetikus aktivi-
tására, Egyetemi Doktori disszertáció,
Szeged.
- /58/ Karnovsky, M.J. /1965/: A formaldehyde-glutáralde-
hyde fixative of high osmolarity for use
in electron microscopy. J. Cell. Bio.
27. 1371-1381.
- /59/ Millonig, G /1962: Further observations on a phosph-
ate buffer for osmium solutions in fixation.
5 th Int. Congr. Electron Microscopy,
Philadelphia.

- /60/ Luft, J.H. /1961/: Improvements in epoxy resin embedding methods. J.Biophys. Biochem. Cytol. 2. 404-414.
- /61./ Folch, J., M. Lees and G.H. Sloane-Stanley/1957/: A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem 226. 497-509.
- /62/ Khan, M-U. and J.P. Williams /1977/: Improved thin-Layer Chromatographic method for the separation of major phospholipids and glycolipids from plant lipid extracts and phosphatidyl glycerol and bis /mono acylglyceryl/ phosphate from animal lipid extracts. J. Chromatography, 140: 179-185.
- /63/ Rouser, G.S. Fleisher and A. Yamamoto /1970/: Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. Lipids. 5, 494-496.
- /64/ Joliot, P. and A. Joliot /1968/: A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of Hill reagent by isolated Chloroplasts. BB \bar{A} , 153. 625-634.
- /65/ Maróti, P., G. Laczkó, A. Ringler, L. Szalay /1983/: Pulsed polarographic study of the oxygen-evolving system of photosynthesis in Chlorella. Acta Univ. Lodz. 2. 59-70.

- /66/ Blinks, L.R. and R.K. Skow /1938/: The time course of photosynthesis as shown by a rapid electrode method for oxygen, Proc. Nat. Acad. Sci. 24 420-427.
- /67/ Setlik, I. /1957/: Periodic phenomena in photosynthesis as reflected by oxygen exchange of blue-green algae. BBA, 24. 434-435.
- /68/ Setlik, I. /1957/: Light-dark transients in oxygen exchange of blue-green algae. BBA. 24. 436-437.
- /69/ Setlik, I. /1954/: Transient phenomena in photosynthesis as revealed by the production of oxygen. Rozprawy CSAV rada MPV, 64. 1-59.
- /70/ Fork, D.C. /1963: Action spectra for O₂ evolution by Chloroplasts with and without added substrate, for regeneration of O₂ evolving ability by far-red, and for O₂ uptake. Plant Physiol, 38. 323-332.
- /71/ Kok, B. and G.M. Cheniae /1966/: Kinetics and Intermediates of the oxygen evolution step in photosynthesis. In: Current Topics in Bioenergetics, ed .D.R. Sanadi, pp.1-48. Academic Press, New York and London.
- /72/ Vidaver, W. and T. Chandler /1969/: Metabolic inhibitors and Photosynthetic induction transients. In: Progress in Photosynthesis Research, I.ed: H. Metzner pp. 514-520 Tübingen.

- /73/ Ried, A. /1969/: Studies on light-dark transients in *Chlorella*. In: Progress in Photosynthesis Research, I. ed. H. Metzner pp. 521-530. Tubingen
- /74/ Zeinalov, Yu. /1977/: On the analysis of oxygen induction phenomena in photosynthesizing systems. I. Kinetics of the evolution in green algae cells. Stud. Biophys. 65. 227-238.
- /75/ Joliot, P. /1965/: Cinetiques des reactions liees a l'émission d'oxygène photosynthétique. BBA, 102.116-134.
- /76/ Zeinalov, Yu. and F.F. Litvin /1979/: Oxygen evolution after switching off the light and S_1 -state desactivation in photosynthesizing systems. Photosynthetica, 13. 119-123.
- /77/ Zeinalov, Yu /1982/: Existence of two different ways for oxygen evolution in photosynthesis and the photosynthetic unit concept. Photosynthetica. 16. 27-35.
- /78/ Sváb, J. /1967/: Biometriaai módszerek a mezőgazdasági tudományban, pp. 368-375, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
- /79/ Kautsky, M. A. Mirsch /1931/: Neue Versuche zur kohlenstoff-assimilation, Naturwissenschaften 19. 964.

- /80/ Duysens, L.N.M. /1972/ 3-/3,4-dichlorophenyl/-1,1-dimethylurea /DCMU/ inhibition of system II. and light-induced regulatory changes in energy transfer efficiency. Biophys. J. 12. 858-863.
- /81./ Munday, J.C. and Govindjee /1969/: Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll A in vivo, III. The dip and the peak in the fluorescence. Biophys. J. 9. 1-21.
- /82/ Horton, P. /1983/: Effects of changes in the capacity for photosynthetic electron transfer and photophosphorylation on the kinetics of fluorescence induction in isolated chloroplasts. BBA, 724, 404-410.
- /83/ Lavorel, J. /1959/: Induction of fluorescence in Quinone poisoned *Chlorella* cells. Plant Physiol. 34. 204-209.
- /84/ Krause, G.H, C. Vernotte and J-M. Briantais /1982/: Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. BBA, 679, 116-124.
- /85/ Walker, D.A. P.Harton, M.N. Sivak and W.P. Quick /1983/: Antiparallel relationship between O_2 evolution and slow fluorescence induction Kinetics. Photobiochem. and Photobiophys. 5. 35-39.

- /86/ Yamagishi, A., K. Satoh and S. Katoh /1978/:
Fluorescence induction in chloroplasts
isolated from the green alga *Bryopsis*
maxima III. A fluorescence transient
indicating proton gradient across the
thylakoid membrane. *Plant and Cell*
Physiol. 19: 17-25.
- /87/ Quick, W. P., and P. Horton /1984/: Studies on the
induction of chlorophyll fluorescence in
barley protoplasts. I. Factors affecting
the observation of oscillations in the
yield of chlorophyll fluorescence and the
rate of oxygen evolution. *Proc. R. Soc.*
Lond. B, 220 361-370, 371-382.
- /88/ Walker, D.A. /1981/: Secondary fluorescence Kinetics
of spinach leaves in relation to the onset
of photosynthetic carbon assimilation.
Planta, 153. 273-278.
- /89/ Laczkó Gábor/1979/: A második fotokémiai rendszer
gyorsreakcióinak vizsgálata késleltetett
fluoreszcencia módszerrel. Egyetemi dok-
tori értekezés. Szeged.
- /90/ Malkin, S. , P.A. Armond, H.A. Mooney, and D.C. Fork
/1981/: Photosystem II. Photosynthetic
unit size from fluorescence induction
in leaves, *Plant. Physiol.* 67. 570-579.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Prof.Dr.Szalai László tanszékvezető egyetemi tanár úrnak, hogy munkámat az első lépésektől kezdve figyelemmel kísérte, és hasznos tanácsaival segítette, valamint, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a Biofizikai Tanszéken végezhessem munkámat.

A fáradhatatlan, minden részletre kiterjedő figyelmét, a munka során felmerült számtalan, sokszor az irodalom számára is ismeretlen probléma megoldásában nyújtott segítségét témavezetőmnek köszönöm.

A Biofizikai Tanszék munkatársainak ezúton is kifejezem köszönetemet a munkám elvégzésében nyújtott segítségért.

Köszönöm a Növénytan Tanszék munkatársainak a dolgozat befejezéséhez nyújtott segítségüket.