

KETTŐSTÖRÉS-VÁLTOZÁSOK HARÁNTCSÍKOLT IZMON

SZŰCS GÉZA

DOTÉ Élettani Intézete, Debrecen

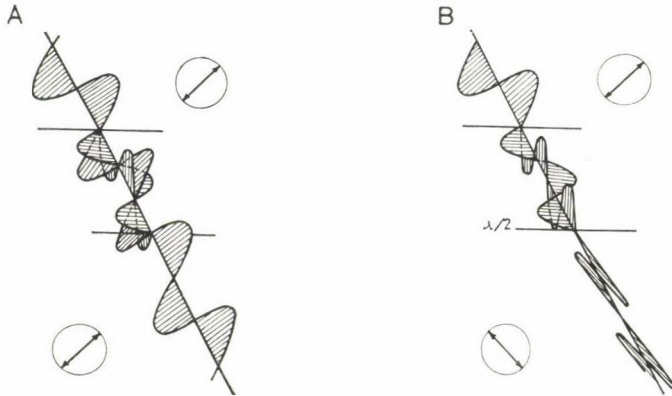
Az ingerlékeny membránok működésének tanulmányozásában az utóbbi években mind nagyobb szerepet játszanak a különböző optikai módszerekkel végzett vizsgálatok. Ezek az eljárások azon a megfigyelésen alapulnak, hogy a kettőtörés-változások, a transzparencia jelek, bizonyos festékek abszorpciós tulajdonságai, illetve a megfestett szövetek extrinsic fluoreszcenciája egyaránt membránpotenciál függést mutatnak. Ugyanakkor ezek a módszerek kiküszöbölik a hagyományos elektrofiziológiai mérések bizonyos hátrányait (például a preparátumok sérülése a mikroelektrodok intracelluláris alkalmazása esetén) és lehetővé teszik az ingerületi folyamatok követését olyan membránrendszeren, amelyek pillanatnyilag hozzáférhetetlenek más metodikák számára (például a szarkoplazmatikus rendszer membránja a harántcsíktolt izmokban).

Az alábbiakban a membránpotenciál változásait tükröző optikai jelek közül a kettőtörés változásokkal kapcsolatos legfontosabb irodalmi adatokat foglalom össze. Részletesen tárgyalom azokat a harántcsíktolt izmon végzett vizsgálatokat, melyek a DOTÉ Élettani Intézetében történtek (KOVÁCS, SCHÜMPERLI, SZŰCS 1981).

Membránpotenciál függő kettőtörés-változások idegi struktúrákon

A kettőtörésnek nevezett optikai jelenség tulajdonképpen egy adott közeg és a rajta áthaladó fény tulajdonságait tükrözi. A jelenség fizikai alapjait vázlatosan az 1. ábra szemlélteti. Az ábrán két jellegzetes helyzetet tüntettünk fel. Az *A* ábrarészen látható esetben a polarizált fénysugár optikailag izotrop, tehát nem kettőtörő közegen halad át. A törésmutatótól függően az új közegen a fény terjedési sebessége kisebb lesz, de mivel a törésmutató minden irányban azonos nagyságú, a keletkező egymásra merőleges komponensek sebességsökkenése egyforma és ezért azok végig azonos fázisban maradnak. Így az eredeti közegbe való visszalépés után az eredeti síkban polarizált fényt nyerjük vissza. Az ábra *B* részén feltüntetett esetben a polarizált fénysugár anizotrop, azaz kettőtörő közegen halad keresztül. Az ilyen közegre az jellemző,

hogy törésmutatója a különböző síkokban nem egyforma. Ezért az áthaladó fénysugár keletkező két komponense nem egyforma mértékben lassul, hanem az egyik komponens „késik” a másikhoz viszonyítva (innen a retardáció elnevezés eredete). A „késés” miatt a komponensek között fáziskülönbség alakul ki. Az ábrán látható esetben ez a különbség pontosan a hullámhossz fele, ezért az eredeti közegbe visszalépő komponensek ellenkező fázisban találkoznak és ennek következménye a fény polarizációs síkjának az eredetihez képest 90° -os elfordulása. Emiatt a jelenséget optikai forgatóképességnek is nevezik.



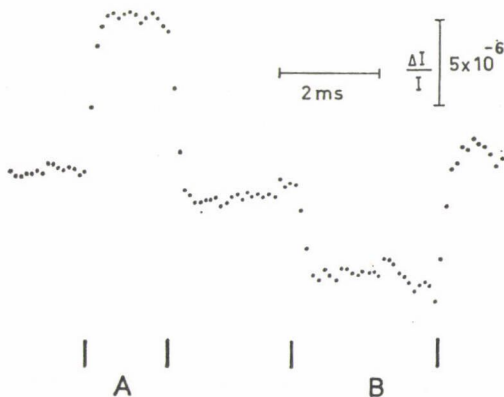
1. ábra. Polarizált fénysugár áthaladása optikailag izotróp (A), illetve kettőtörő (B) közegen. Részletes magyarázatot lásd a szövegben

A kettőtörés jelenségét először fizikai rendszerekben figyelték meg (kristályok, áramló folyadékok stb.). Később bebizonyosodott, hogy optikai forgatóképességgel bizonyos biológiai rendszerek is rendelkeznek. Ilyenek például a különböző membránok. Ezekben fehérje és lipid molekulák olyan jellegzetes szerkezetet alkotnak, amely megteremti az optikai anizotropia feltételeit. Könnyen belátható, hogy amennyiben a membránokat alkotó elemek elrendeződése az ingerületi folyamat során megváltozik, ennek tükröződnie kell az optikai forgatóképesség módosulásában is.

Az ingerlékeny membránok működésének lényegét a rajtuk végbemenő ingerületi folyamat, azaz az akciós potenciál képezi. TASAKI és mtsai (1968), valamint COHEN és mtsai (1970) kimutatták, hogy óriásaxonon az akciós potenciálokat a kettőtörés olyan változása kíséri, amelynek időbeli lefutása megegyezik a membránpotenciál-változásával. Ez a nagyfokú egyezés már önmagában valószínűvé tette, hogy a két folyamat között szoros kapcsolat állhat fenn.

A kettőtörés-változások membránpotenciál-függő jellegének bizonyítására olyan feltételeket teremtettek a feszültség-clamp technika alkalmazásával, ahol a membránpotenciál nagysága gyorsan változtatható és így különböző

irányú, nagyságú és időtartamú feszültségváltozások hozhatók létre. A kettőstörés-változások feszültség-clamp körülmények közötti analizését először óriás axonon végezték el (COHEN és mtsai 1971). A 2. ábrán látható, hogy a feszültség-clampelt óriásaxonon a kiindulási membránpotenciálról alkalmazott hiperpolarizáló (A), illetve depolarizáló (B) feszültséglépcsőket a kettőstörés megváltozása kíséri és ezek a változások meglehetősen pontossággal követik a membránpotenciál módosulásait. Az optikai változás tehát nem az ionkonduktanciák, hanem a membránpotenciál nagyságát, illetve változását tükrözi. A depolari-



2. ábra. Óriásaxonon (*L. forbesi*) mért kettőstörés tranziensek 1,5 ms-ig tartó, 48 mV-os hiperpolarizáló (A), illetve 3,0 ms-ig tartó, 52 mV-os depolarizáló (B) feszültség clamp impulzusok alatt ($T = 13\text{ }^{\circ}\text{C}$). COHEN és mtsai (1971) nyomán

záló és hiperpolarizáló impulzusok alatt ugyanis ionkonduktancia változások történtek, melyek más időbeli lefutást mutatnak, mint a membránpotenciál változásai.

Kettőstörés-változások harántcsíkolt izmon

Az ingerületi folyamatot kísérő kettőstörés-változásokat más szöveteken is tanulmányozni kezdték. Különösen fontosnak tűnt a harántcsíkolt izomrostokon megfigyelhető kettőstörés tranziensek analízise. Ennek oka az, hogy a vázizmok igen bonyolult belső membránrendszerrel rendelkeznek és az ezeken a membránokon lejátszódó ingerületi folyamatok közvetlen membránpotenciál mérésével nem követhetők. Ezért kerültek előtérbe a különféle indirekt eljárások, mint például a kísérő optikai változások mérése. A nagy belső membránfelszín előnyt jelent az optikai módszerek vonatkozásában. A 2. ábrán látható kettőstörés-változások 10^{-6} nagyságrendűek, azaz a változás az alapintenzitás egymilliomod részét teszi ki. A kapott jel igen kicsi, a jel—zaj arány kedvezőtlen. Ilyen körülmények között a változások mérését a jelátlagolási technika alkalmazása teszi lehetővé. A 2. ábrán bemutatott esetben az optikai tranziens

ezer jel átlagolásával kapták. Harántcsíkolt izomrostok esetében adott rost-hosszra vonatkoztatva a szarkoplazmatikus retikulum membránrendszerének felszíne körülbelül ötszázszor nagyobb területet képvisel, mint a felszíni membrán. Ha feltételezzük, hogy a felszínen és a belső membránokon lezajló ingerületi folyamatokat kísérő optikai változások azonos nagyságrendűek, a nagy membránfelszín a jel—zaj arány jelentős javulását eredményezi. Ez mérés technikai szempontból előnyös, mivel kevesebb jelet kell átlagolni. Fenti gondolatmenetből egyben az is következik, hogy harántcsíkolt izmon a kapott optikai változások túlnyomórészt a szarkoplazmatikus retikulum membránján végbemenő folyamatokat tükrözik. Természetesen a harántcsíkolt izmon is léteznek a felszíni membránról, illetve a transzverzális tubulusok membránjáról származó optikai jelek, ezek azonban az említett felszínkülönbségek miatt relatíve kicsik és csak speciális technikákkal választhatók el a szarkoplazmatikus retikulum membránjáról származó jelektől (BAYLOR és OETLIKER 1977).

Az ingerületi folyamattal kapcsolatos kettőtörés-változásokat harántcsíkolt izmon is megfigyelték (CARNAY és BARRY 1969). A struktúra bonyolultságát mutatja, hogy a kapott kettőtörés tranziensek több komponenst tartalmaznak (BAYLOR és OETLIKER 1975). A jel—zaj arány javulását bizonyítja az a tény, hogy szerzők már négy jel átlagolásával is megfelelő regisztrátumokat nyertek. A kettőtörés tranziensek első komponense a felszíni, illetve T-tubuláris akciós potenciállal esik egybe. A harmadik komponens az izom mechanikai aktivitásának megjelenésével függ össze. A legérdekesebb a második komponens. Időbelisége, nagysága, D_2O kezeléssel, hipertóniás közeggel való befolyásolhatósága alapján szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy ez a komponens a szarkoplazmatikus retikulum ingerületi folyamatát, esetleg membránpotenciál változását tükrözi (BAYLOR és OETLIKER 1975).

Egyéb optikai jelek ingerlékeny szöveteken

Az idegi és izomstruktúrákon lezajló ingerületi folyamatokat a kettőtörés tranzienseken túlmenően más optikai változások is kísérik (COHEN 1973). A membránpotenciál változásainak követésére sokféle festék alkalmasnak bizonyult, melyek különböznek egymástól toxicitásuk, az általuk adott abszorpció változás vagy fluoreszcencia jel nagyságának vonatkozásában. COHEN és mtsai (1980) a Nemzetközi Élettani Társaság budapesti kongresszusán számoltak be arról, hogy ganglionokon egyidejűleg mintegy száz neuron aktivitását követték extrinsic fluoreszcencia jelek mérésével. Ezt mikroelektródák alkalmazásával nem lehet megvalósítani, így érthető, hogy milyen nagy jelentőségre tehetnek szert az ilyen eljárások például neuronláncok funkcionális kapcsolatainak tisztázásában.

A különböző egyéb optikai tulajdonságokat harántcsíkolt izomrostokon is vizsgálták. Extrinsic fluoreszcencia jelet írtak le Nílus-kék-A-val festett

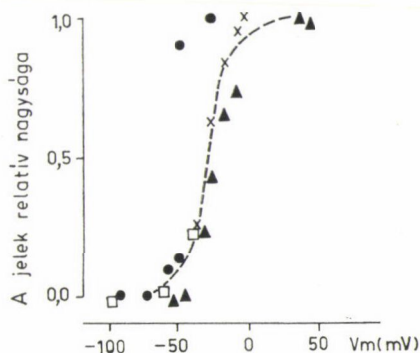
izmokon (BEZANILLA és HOROWICZ 1975). Ez a jel időben a felszíni membránon lezajló akciós potenciál és a mechanikai mozgás megjelenése közé esett; D_2O -dal és nitrát ionokkal befolyásolható volt. Később azt is kimutatták (VERGARA és mtsai 1978), hogy feszültség clamp körülmények között a depolarizáló impulzusok amplitúdóját növelve a fluoreszcencia jelek nagysága is fokozódik, azaz a Nílus-kék fluoreszcencia jelek membránpotenciál függést mutatnak. Szerzők a jel kialakulásában a szarkoplazmatikus retikulum membránján végbemenő változásoknak tulajdonítanak oki szerepet.

Feszültség-clampelt átvágott izomroston depolarizáló impulzusokat kísérő transzparencia változásokat is leírtak (KOVÁCS és SCHNEIDER 1977). A tranziensek membránpotenciál függését és időviszonyait analizálva szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a transzparencia változások valószínű eredete a szarkoplazmatikus retikulum membránjának az ingerületi folyamattal kapcsolatos megváltozása, de nem tudták kizárni a kontraktilis fehérjék küszöbalatti változásának lehetőségét sem.

Az optikai jelek eredete harántcsikolt izomroston

A harántcsikolt izomrostokon kapott optikai tranziensek rendelkeznek bizonyos közös sajátosságokkal, amelyek alapján eredési helyükre is következtethetünk. A jelek a felszíni ingerületi folyamatot követően minimálisan 6 ms-os latenciáidővel alakulnak ki, és minden esetben megelőzik a mechanikai mozgás megjelenését.

További hasonlóságokra derül fény, ha a harántcsikolt izomrostokon kapott optikai jelek membránpotenciál függését hasonlítjuk össze (COHEN és SALZBERG 1978). A 3. ábrán látható, hogy a transzparenciaváltozás, a kettős-



3. ábra. Optikai jelek és a kálium-kontraktúra membránpotenciál függése harántcsikolt izmon. Az ordinátán a különféle jelek relatív nagysága van feltüntetve. ×: transzparencia változások (KOVÁCS és SCHNEIDER 1977). □: kettőtörés jelek (BAYLOR és OETLIKER 1975). ▲: Nílus kék fluoreszcencia tranziensek (VERGARA és mtsai 1978). ●: kálium-kontraktúrák (HODGKIN és HOROWICZ 1960). COHEN és SALZBERG (1978) nyomán

törés jel és a Nílus-kék fluoreszcencia tranziens feszültségfüggése rendkívül hasonló egymáshoz. Az ábrán a mechanikai mozgás membránpotenciál függése is fel van tüntetve (HODGKIN és HOROWICZ 1960). Az optikai jelek és a mechanikai válasz feszültségfüggése némileg eltérő. A különbség oka lehet az, hogy az optikai jeleket feszültség-clamp körülmények között, depolarizáló feszültséglépcsőkkel hozták létre, a mechanikai választ ezzel szemben kálium-depolarizációval, azaz a jóval lassúbb kémiai clamppel. Ennek ellenére az optikai jelek és a kálium kontraktúrák feszültségfüggése közötti hasonlóság mindenképpen figyelmet érdemel.

Kétségtelen tény, hogy a felsorolt adatokat a szerzők sok vonatkozásban eltérő körülmények között kapták. Ennek ellenére az említett hasonlóságok alapján indokoltnak tűnik az a feltételezés, hogy a három optikai jel voltaképpen ugyanazt a folyamatot tükrözi és ez a folyamat szoros kapcsolatban van a kontraktilis rendszer aktiválásával. Ami a háttérben levő folyamatot illeti, több magyarázat is szóbajön. Gondolhatunk a szarkoplazmatikus retikulum membránjának ingerületi folyamatára, az intracelluláris ionizált kalcium koncentráció módosulásaira, a felszabadult kalcium különféle helyekre történő lekötődésére vagy a kontraktilis fehérjék mozgást még nem eredményező, küszöbalatti változásaira. A korántsem teljes felsorolás is mutatja, hogy az optikai jelek valószínű eredetét illetően olyan további vizsgálatokra van szükség, amelyekben közvetlenül össze lehet hasonlítani az optikai jelek és a feltételezett oki folyamatok kinetikai és farmakológiai tulajdonságait.

A továbbiakban azokat a vizsgálatokat ismertetem, melyek a fenti lehetőségek közül a kettőtörés tranziensek és az intracelluláris kalcium koncentráció változások között fennálló összefüggések tanulmányozását tűzték ki célul (KOVÁCS és mtsai 1981).

A preparátum és a kísérleti kád

Kísérleteinket kecskebékák (*Rana esculenta*) harántcsíktolt izomrostjain végeztük. A m. semitendinosus-ból különálló rostokat izoláltunk, a kipreparált rostok épségéről az elektromos ingerlésre kapott válasz alapján győződünk meg. A rostokat az izolálás után 20–30 percig állni hagytuk Ringer oldatban és csak azokat használtuk fel kísérleteinkben, melyek ezen idő elteltével is rágással válaszoltak az elektromos ingerlésre.

A rostpreparátum készítése és a kísérleti elrendezés felépítése során a KOVÁCS és SCHNEIDER (1978) által kidolgozott, átvágott rost technikát követjük. A preparálás befejezése után a rostot tartalmazó tálkában a Ringer oldatot Ca mentes, 120 mmol/l K^+ -ot tartalmazó K-glutamát oldatra cseréltük ki. A folyadékcsere után az izomroston kálium kontraktúra alakult ki. Az elernyedés után a rostot az inas végtől 10–12 mm távolságban átvágtuk.

arányos feszültségeket (V_I). Az átalakítási tényező $1 \text{ nA} = 1 \text{ mV}$. A preparátum és az elválasztó vazelin gap minőségét úgy ellenőriztük, hogy a nyitott végű oldal folyadékterébe az E_p áramforrásból 20 mV -os impulzust alkalmaztunk. Optimális esetben a V_p nagysága megközelítőleg 20 mV , a V_I nagysága az impulzus végén mérve $5\text{--}10 \text{ mV}$ volt ($4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, a zárt végen TEA-Rb-SO₄ Ringer).

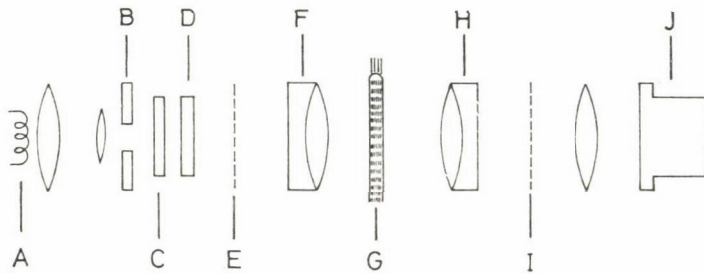
Az általunk is alkalmazott módszer egyik nagy előnye az, hogy kompenzációs áramkör segítségével lehetővé teszi a V_p és V_I jelek segítségével a V_m membránpotenciál változással azonos V'_m jel előállítását. Ennek elérésére a zárt végen a gap-hez közel konvencionális üveg mikroelektrodát vezetünk a rostba és az A3 differenciaerősítővel követtük az E_p áramforrásból alkalmazott impulzust kíséző membránpotenciál változást (V_m). Ezt követően előállítottuk a V'_m jelet úgy, hogy az oszcilloszkóp képernyőjén a két jel fedje egymást. Ezután a mikroelektrodát eltávolítottuk a rostból és a továbbiakban csak akkor alkalmaztuk, ha a membránpotenciál tényleges nagyságát vagy a kompenzálás helyességét kívántuk ellenőrizni.

Az A8 clampelő erősítőt az így előállított V'_m jellel vezéreltük. Az erősítő bemenetén a kívánt membránpotenciál érték az E_c jel formájában van jelen. Az erősítő a két jel különbségét erősíti és a membránpotenciál kívánt értékre történő beállításához szükséges áramot a nyitott végű oldal folyadékterébe juttatja. A clamp erősítése az R3 potenciométer segítségével változtatható. Kísérleteinket általában $40\text{--}80$ -szoros erősítés mellett végeztük. Mivel feszültség-clamp körülmények között az inkubáló oldat cseréje oszcillációt idézhet elő, folyadékesere előtt az áramot szolgáltató agarhidat a clampelő erősítő kimenetéről az E_p áramforrásra kapcsoltuk át. Az E_p értékét úgy választottuk meg, hogy az fenntartsa a kívánt membránpotenciál értéket (gyakorlatilag a V_p -vel azonos érték). A kísérletek során a rostok nyugalmi membránpotenciálját általában -100 mV -ra állítottuk be, az E_c értéke (a holding potenciál) az erősítés mértékétől függően $-101\text{--}-104 \text{ mV}$ volt. A feszültség clamp körülmények között alkalmazott impulzusok időzítését digitális impulzusgenerátor (TR 0360, HTSZ) végezte; ennek 5 V -os kimenő feszültsége vezérelte a házi gyártmányú impulzuskondicionáló egységet, amely a kívánt impulzusok amplitúdóját állította elő.

Az optikai mérőrendszer

A kettőtörés tranziensek mérésére szolgáló összeállítás vázlatja a 6. ábrán látható. A fényt akkumulátorról fűtött volfrám-halogén izzó (12 V , 150 W) szolgáltatja. A fényforrás elé változtatható nagyságú rést helyeztünk, ennek képét az optikai rendszert alkotó lencsék a rost magasságában fókuszálták. A rést nagyságát úgy állítottuk be, hogy a fénynyaláb teljes egészében a zárt végű rostszakaszon haladjon keresztül. A fény útjába hőabszorbeáló szűrőt

helyeztünk az infravörös tartományba eső komponensek eltávolítása céljából. A fényt interferencia szűrőkkel a kívánt hullámhosszon monokromatikussá tettük. A kettőtörés jelek mérésére a fénysugár útjába a rost előtt egy polarizátort, utána pedig egy analizátort helyeztünk el úgy, hogy polarizációs síkjuk 45° -os szöget zárjon be a rost hossz tengelyével. A roston áteső fény intenzitását a mikroszkóp fotofeltétjébe épített fotodiódával (PV 100) mértük MIKI gyártmányú AC erősítő közbeiktatásával. Az optikai jelek zajszintjének csökkentésére 0,1 Hz-es alsó és 1 kHz-es felső frekvenciavágást alkalmaztunk.



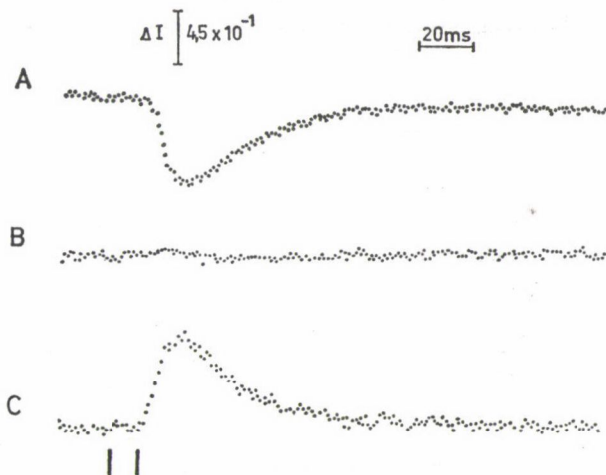
6. ábra. Az optikai mérőrendszer sémás vázlatja. A: volfrám-halogén izzó. B: változtatható nagyságú rés. C: hőabszorbeáló szűrő. D: interferencia szűrő. E: polarizátor. F: a mikroszkóp kondenzora. G: az átvágott izomrost. H: vízimmerziós lencse. I: analizátor. J: a mikroszkóp fotofeltétjében elhelyezkedő fotodióda. A valóságban az egyes elemek nem vízszintes optikai tengely mentén helyezkednek el, hanem egy mikroszkóphoz illesztve. A mikroszkóp tükré az optikai tengelyt az interferenciaszűrő és a polarizátor között 90° -kal törte meg

A kettőtörés jeleket keresztezett állású analizátor és polarizátor mellett mértük, 790 nm-es hullámhosszon. Arról, hogy a regisztrált fényintenzitás változás ténylegesen az izomrost retardációjának megváltozását tükrözi és nem más optikai tulajdonságét (fényszórás, abszorpció), úgy győződünk meg, hogy a mérést ugyanazzal az impulzuskombinációval megismételtük párhuzamos állású analizátor és polarizátor mellett (7. ábra). Ebben az esetben a tényleges kettőtörés-változások ellenkező irányú és azonos nagyságú fényintenzitás változásként jelennek meg. Ez látható a 7. ábra *A* és *C* jelzésű görbéjén. Az ábrán látható *B* görbe azt mutatja be, hogy az *A* és *C* görbék összegzése után fényintenzitás változás nem észlelhető, bizonyítva a jelek kettőtörés eredetét.

Azokban a kísérletekben, amelyekben a kettőtörés-változások és az intracelluláris Ca^{2+} tranziensek tulajdonságait hasonlítottuk össze, az ionizált kalcium koncentráció változásainak mérésére az antipyrilazo III metallokróm indikátor festéket alkalmaztuk intracellulárisan (lásd Kovács és Szűcs 1982).

Az adatok rögzítése és feldolgozása

A modern elektrofiziológiai kutatásban egyre nagyobb szerepet játszik a kapott jelek digitális formában történő rögzítése és az adatok számítógépes kiértékelése. Az általunk mért optikai jelek statisztikus zajt is tartalmaznak, ezért szükséges a jelátlagolási technika alkalmazása. Ennek során a fáziskötötten ismétlődő tényleges jelek összeadódnak, míg a statisztikus zaj a nulla felé



7. ábra. 10 ms-ig tartó, 28,8 mV-ra történő depolarizáló impulzusokkal kiváltott kettőstörés tranziensek. A: keresztezett állású analizátor és polarizátor esetén (8 jel átlaga). C: párhuzamos állású polarizátor és analizátor mellett (8 jel átlaga). B: a görbét úgy kaptuk, hogy 4 jelet keresztezett, 4 jelet párhuzamos állású polarizátor és analizátor mellett váltottuk ki majd összeadtuk őket. $T = 3,9^{\circ}\text{C}$; $l = 500 \mu$; $d = 124 \mu$; $S = 2,6 \mu$

átlagolódik. A jel—zaj arány az ismétlések számának négyzetgyökével nő. Kísérleteinkben az optikai jelek esetében általában 4—8 jel átlagolásával kielégítő eredményt kaptunk.

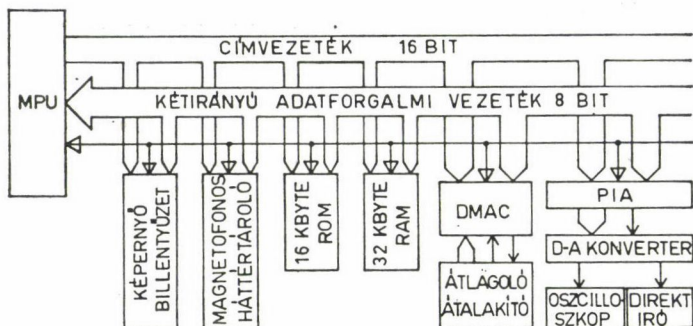
A 8. ábrán látható mérési elrendezésünk központi egysége a HT 680X mikrogép (HTSZ), amelyben Motorola 6800-as mikroprocesszor található. A jelenlegi kiépítés 32 kbyte írható—olvasható memóriát (RAM) és 16 kbyte csak olvasható memóriát (ROM) tartalmaz. Utóbbiban található a BASIC Interpreter és az Editor Assembler nyelv. Háttértárolóként Kansas City adapterrel illesztett kereskedelmi magnetofont (Akai 4000 DS MK-II.) használtunk. A BASIC nyelven írt programok és az adatok kinyomtatását DZM 180-as mozaikprinter végezte.

Saját fejlesztésben valósítottuk meg a mikrogép digitális jeleinek analóg formába történő átalakítását és megjelenítését a VIDEOTON 10 bites D/A konverterével. A megjelenítésre kijelölt RAM terület memóriá tartalmát párhuzamos interface adapter (PIA) közvetítésével küldtük az unipoláris üzem-

módú D/A konverter első nyolc bitjére. Így a 0 és 255 közé eső számok 0 és +2,5 V közötti kimenő feszültséget eredményeznek, amely mind oszcilloszkópon, mind direkt-írón megjeleníthető.

A bemenő analóg jelek digitális formába történő átalakítását átlagoló átalakító (32434 EMG) végzi, amely a jelen összeállításban négycsatornás A/D konverterként működik. A kimeneti jeleket közvetlen memória elérésű vezérlő (DMAC) a mikrogép memóriájába tölti.

A DMAC szoftver megoldása az igen gyors adatáramlás mellett lehetővé teszi a jelátlagolás elvégzését, illetve szükség esetén az adatok azonnali feldolgozását is.

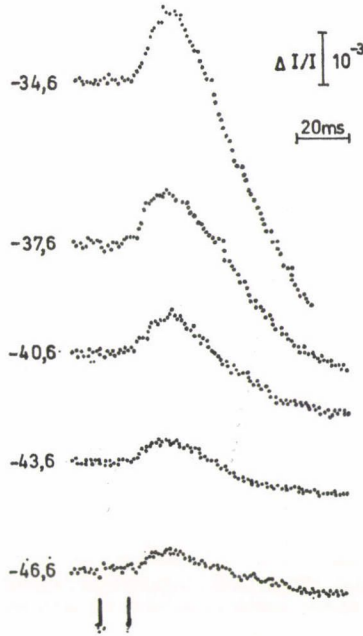


8. ábra. Az adatrögzítő és feldolgozó rendszer vázlatja. MPU: Motorola 6800-as mikroprocesszor egység. ROM: csak olvasható memória. RAM: írható-olvasható memória. DMAC: közvetlen memória elérésű vezérlő. PIA: párhuzamos interface adapter. Részletes magyarázatot lásd a szövegben

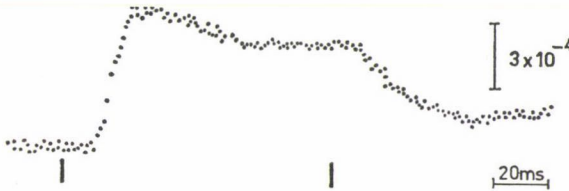
A kettőtörés jelek és kalcium tranziensek összehasonlítása

A harántcsíktól izmon mért kettőtörés tranziensek időbeli lefutása függ az őket kiváltó depolarizáló impulzus időtartamától. A 9. ábrán viszonylag rövid (10 ms-os) depolarizáló impulzusokkal hoztunk létre kettőtörés-változásokat. Jól megfigyelhető, hogy az impulzusok nagyságát szűk membránpotenciál tartományon belül változtatva, a kettőtörés tranziens egyre kifejezettebben kétfázisú lesz. Ezt a jelenséget egy nagy, ellenkező polaritású, késői komponens megjelenése okozza, utalva a kontraktilis rendszer aktiválódására. Mi a továbbiakban csak a korai komponens sajátosságait kívántuk vizsgálni. Ez a jel megelőzi a mozgás kialakulását és így feltehetően az elektromechanikai kapcsolat valamelyik folyamatával van oki összefüggésben. A korai kettőtörés komponens zavartalan tanulmányozásához a mechanikai mozgás torzító hatását meg kellett szüntetni. Ezt vagy a rost fokozott feszítésével, vagy mozgást még nem eredményező, mechanikai küszöbnél kisebb impulzusok alkalmazásával értük el. A kalcium tranziensek vizsgálata során egyébként, feltehetően a kedvezőbb jel-zaj arány miatt, hasonló jelenséget nem tapasztaltunk.

A 10. ábrán jellegzetes alakú kettőstörés tranzienst látható. A jelet ebben az esetben 100 ms hosszú depolarizáló impulzussal váltottuk ki. Megfigyelhető, hogy a jel a depolarizáció bekövetkezése után bizonyos latenciaidővel alakul ki, majd maximális nagyságát elérve már a depolarizáció fennállása alatt csökken-



9. ábra. 10 ms hosszú depolarizáló impulzusokkal kiváltott kettőstörés tranzienst. Az egyes görbék mellett feltüntetett számok a depolarizáció alatti membránpotenciált jelzik. $T = 3,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $l = 500\text{ }\mu$; $d = 106\text{ }\mu$; $S = 2,4\text{ }\mu$. (8 jel átlaga)

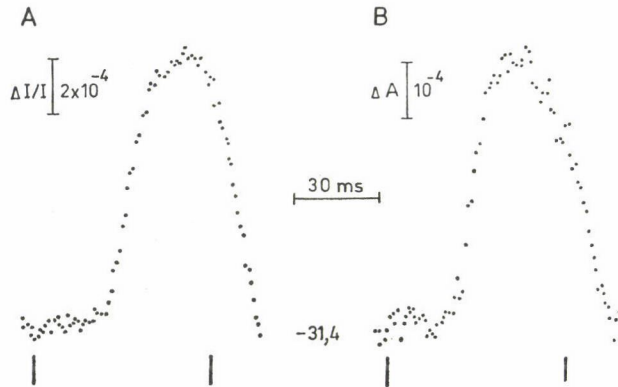


10. ábra. 100 ms-os depolarizáló impulzussal kiváltott kettőstörés tranzienst. A depolarizáció alatti membránpotenciál érték $-32,7\text{ mV}$ volt. $T = 2,4\text{ }^{\circ}\text{C}$; $l = 500\text{ }\mu$; $d = 112\text{ }\mu$; $S = 2,4\text{ }\mu$; (4 jel átlaga)

ni kezd. A kiindulási membránpotenciál értékre való visszatérés után a jel a depolarizáció alattitól eltérő sebességgel csökken tovább.

A hosszú depolarizáló impulzusokkal kiváltott kettőstörés tranzienst fent vázolt jellegzetes lefutása igen hasonló az antipyrylazo III festékkel mért intracelluláris Ca^{2+} tranzienstékre. Ezt a hasonlóságot teljesen nyilvánvalóan

mutatja be a 11. ábra. 65 ms hosszú depolarizáló impulzussal a membránpotenciált $-31,4$ mV-ra csökkentettük és mértük előbb a depolarizációt kísérő kettőtörés-változást (A), majd az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változását (B). Látható, hogy az ugyanazon izomroston kapott két jel alakja gyakorlatilag egyforma. Meg kell jegyezni, hogy a kísérletek során ez a hasonlóság mindig fennállt, azonban a kettőtörés jelek gyakran késtek a kalcium tranziensekhez viszonyítva. A késés mértéke változó volt, és a kettőtörés jelek egyetlen esetben sem előzték meg a kalcium koncentráció változásait.

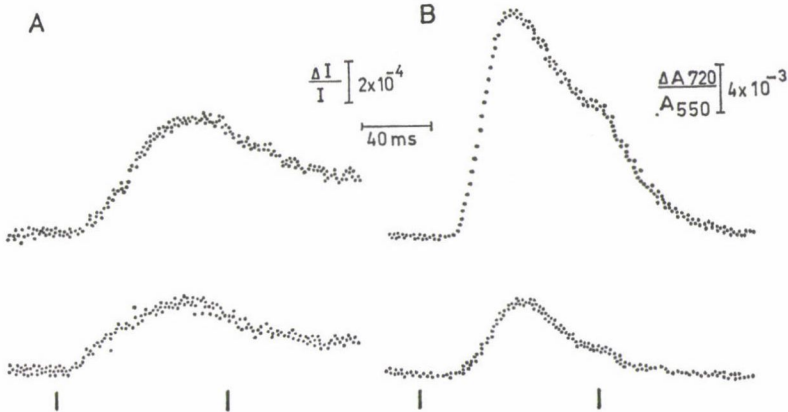


11. ábra. Ugyanazon az izomroston 65 ms hosszú depolarizáló impulzussal kiváltott kettőtörés tranziens (A), illetve intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változás (B). $T = 3,6$ °C; $l = 500$ μ ; $d = 121$ μ ; $S = 2,7$ μ . (mindkét görbe 8 jel átlaga)

Koffein hatása a kettőtörés és kalcium jelekre

A koffein a harántesíkkolt izmokon jellegzetes, koncentráció- és hőmérsékletfüggő hatást fejt ki. Szobahőmérsékleten 4–5 mmol/l-nél magasabb koncentrációban alkalmazva kontraktúrát hoz létre anélkül, hogy befolyásolná akár a nyugalmi membránpotenciált, akár a felszíni membránon lezajló akciós potenciálok alakját (SANDOW és mtsai 1964). Az összehúzódáshoz szükséges kalcium felszabadulást a koffein közvetlenül a szarkoplazmatikus retikulum membránjára hatva idézi elő. Alacsonyabb koffein dózisok mechanikai választ nem váltanak ki, de fokozzák az elektromos ingerléssel kiváltott rángások nagyságát (SANDOW és mtsai 1964). A koffein ezen hatásának támadáspontja feltehetően az elektromechanikai kapcsolat valamelyik részfolyamatában kereshető. Irodalmi adatok szerint a koffein alacsonyabb hőmérsékleten már kisebb koncentrációban is kontraktúrát hoz létre (SAKAI 1965). Kísérleteink során azt kívántuk tanulmányozni, hogy a kontraktúrát még nem okozó koffein koncentrációk hogyan befolyásolják a kettőtörés és kalcium tranzienseket. Körülményeink között 0,5 mmol/l-nek bizonyult az a koffein mennyiség, amelyik még biztosan nem hoz létre összehúzódást.

A 12. ábrán 100 ms hosszú depolarizáló impulzusokkal kiváltott kettőstörés-jelek (A) és intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változások (B) láthatók. Mindkét esetben az alsó görbe a kontroll, míg a felső görbe úgy készült, hogy a zárt végű rostszakasz inkubáló oldatában (TEA-Rb- SO_4 Ringer) 0,5 mmol/l koffein volt jelen. A méréseket két különböző roston végeztük, ennek ellenére



12. ábra. Kettőstörés-változások (A) és intracelluláris Ca^{2+} tranziensek (B). A jeleket két különböző roston 100 ms hosszú depolarizáló impulzusokkal váltottuk ki. A rost membránpotenciálja a depolarizáció alatt minden esetben $-50,5$ mV volt. Az alsó görbe mindkét esetben a TEA-Rb- SO_4 Ringerben mért kontroll, míg a felső görbékét ugyanezen oldatban, de 0,5 mmol/l koffein jelenlétében kaptuk. A rost: T = $4,0$ °C; l = 500 μ ; d = 105 μ ; S = $2,6$ μ . B rost: T = $4,0$ °C; l = 570 μ ; d = 91 μ ; S = $2,6$ μ . (Valamennyi görbét 8 jel átlagaként kaptuk)

ebben az esetben is megfigyelhető a kétféle jel közötti hasonlóság. Látható továbbá az is, hogy a koffein jelenléte egyaránt növelte az azonos depolarizáló impulzusokkal kiváltott kettőstörés, illetve Ca^{2+} tranziensek nagyságát és kialakulásának sebességét; ugyanakkor csökkentette a jelek kialakulásának latencia idejét.

A kettőstörés jelek eredete

A bemutatott kísérleti eredmények alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a kettőstörés jelek általunk analizált korai komponense az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásait tükrözi. A késői komponens kialakulásáért más folyamatok tehetők felelőssé. A korai kettőstörés jelek és a Ca^{2+} tranziensek közötti kapcsolatra utal a két jel időbeli lezajlásának nagyfokú hasonlósága. Egyezést találtunk a kétfajta jel farmakológiai befolyásolhatóságában is. 0,5 mmol/l koffein hatására az ugyanolyan depolarizáló impulzussal kiváltott kettőstörés és Ca^{2+} tranziensek nagysága és kialakulási sebessége

fokozódott, latenciaidejük csökkent. Ez arra utal, hogy a szarkoplazmatikus retikulumból ugyanaz a depolarizáció koffein jelenlétében nagyobb mennyiségű Ca^{2+} felszabadulását hozza létre, tehát a koffein mintegy érzékenyíti a szarkoplazmatikus retikulum membránját a felszín felől a T-tubulusok membránján betérjedő aktiválási folyamattal szemben. Itt nem közölt eredményeink szerint ugyanakkor a dantrolen Na csökkentette a depolarizáló impulzusokkal kiváltott korai kettőtörés jelek nagyságát. Ez a vegyület irodalmi adatok szerint (DESMEDT és HAINAUT 1977) gátolja a szarkoplazmatikus retikulumból történő Ca^{2+} felszabadulását.

Mindezen megfigyelések alapján arra következtettünk, hogy a harántcsíkolt izomroston észlelt kettőtörés-változások általunk vizsgált komponense nem a szarkoplazmatikus retikulum membránpotenciáljának módosulását, hanem az intracelluláris kalcium koncentráció változását tükrözi. Feltételezhető, hogy a kalcium ionok a szarkoplazmatikus retikulumból történő felszabadulásuk után különböző intracelluláris elemekhez (szarkoplazmatikus retikulum membránja, myofilamentumok stb.) kötődve megváltoztatják azok törésmutatóját, és ez a folyamat a kettőtörés jelek megváltozásában tükröződik. A molekuláris változások pontosabb megismerését nehezíti teszi, hogy a harántcsíkolt izomrost bonyolult struktúra, amelyben az egyes elemek eltérő funkcionális sajátosságokkal rendelkeznek, és a kalcium ionokkal szembeni kötési állandók is különbözőek lehetnek. A kettőtörés jelek tehát egy inhomogén rendszer változásainak eredőjét mutatják. A kinetikai és farmakológiai tulajdonságok összehasonlítása után azonban annyi biztosnak látszik, hogy a kettőtörés-változásokat az intracelluláris kalcium hozza létre, nem pedig a kettőtörés-változásokban tükröződő egyéb folyamatok vezetnek a kalcium ionok felszabadulásához.

IRODALOM

1. BAYLOR, S. M., OETLIKER, H.: Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum. *Nature* **253**, 97–101 (1975).
2. BAYLOR, S. M., OETLIKER, H.: Birefringence signals from surface and T-system membranes of frog single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **264**, 199–213 (1977).
3. BEZANILLA, F., HOROWICZ, P.: Fluorescence intensity changes associated with contractile activation in frog muscle stained with Nile Blue A. *J. Physiol. (Lond.)* **246**, 709–735 (1975).
4. CARNAY, L. D., BARRY, W. H.: Turbidity, birefringence and fluorescence changes in skeletal muscle coincident with the action potential. *Science* **165**, 608–609 (1969).
5. COHEN, L. B.: Changes in neuron structure during action potential propagation and synaptic transmission. *Phys. Reviews* **53**, 373–418 (1973).
6. COHEN, L. B., GRINVALD, A., BOYLE, M. B., LESHER, S.: Optical monitoring of neuron activity. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.* **14**, 85 (1980).
7. COHEN, L. B., HILLE, B., KEYNES, R. D., LANDOWNE, D., ROJAS, E.: Analysis of the potential-dependent changes in optical retardation in the squid giant axon. *J. Physiol. (Lond.)* **218**, 205–237 (1971).
8. COHEN, L. B., HILLE, B., KEYNES, R. D.: Changes in axon birefringence during the action potential. *J. Physiol. (Lond.)* **211**, 495–515 (1970).
9. COHEN, L. B., SALZBERG, B. M.: Optical measurement of membrane potential. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **83**, 35–88 (1978).

10. DESMEDT, J. E., HAINAUT, K.: Inhibition of the intracellular release of calcium by dantrolene in barnacle giant muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* **265**, 565—585 (1977).
11. HODGKIN, A. L., HOROWICZ, P.: Potassium contractures in single muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)* **153**, 386—403 (1960).
12. KOVÁCS, L., SCHNEIDER, M. F.: Increased optical transparency associated with excitation-contraction coupling in voltage clamped cut skeletal muscle fibres. *Nature* **265**, 556—560 (1977).
13. KOVÁCS, L., SCHNEIDER, M. F.: Contractile activation by voltage clamp depolarization of cut skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **277**, 483—506 (1978).
14. KOVÁCS, L., SCHÜMPERLI, R. A., SZŐCS, G.: Calcium transients and birefringence signals in voltage clamped cut skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **318**, 35P (1981).
15. KOVÁCS, L., SZŐCS, G.: Membránpotenciál függő kalcium tranziensek harántcsíkolt izmon. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **25**, 105—118 (1982).
16. SAKAI, T.: The effects of temperature and caffeine on activation of the contractile mechanism in the striated muscle fibres. *Jikei. med. J.* **12**, 88—102 (1965).
17. SANDOW, A., TAYLOR, S. R., ISAACSON, A., SEQUIN, J. J.: Electromechanical coupling in potentiation of muscular contraction. *Science* **143**, 577—579 (1964).
18. TASAKI, I., WATANABE, A., SANDLIN, R., CARNAY, L.: Changes in fluorescence, turbidity and birefringence associated with nerve excitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **61**, 883—888 (1968).
19. VERGARA, J., BEZANILLA, F., SALZBERG, B. M.: Nile Blue fluorescence signals from cut single muscle fibers under voltage or current clamp conditions. *J. gen. Physiol.* **72**, 775—800 (1978).