

ÖNÁLLÓ TANULMÁNYOK

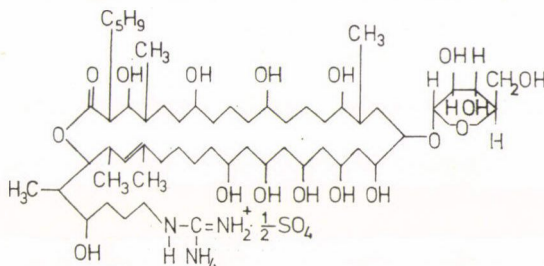
PRIMYCIN HATÁSA A VÁZIZOM ELEKTROMOS SAJÁTSÁGaira ÉS AZ ELEKTROMECHANIKAI CSATOLÁSRA*

KÖVÉR ANDRÁS és GESZTELYI ISTVÁN

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

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

A PRIMYCIN SZERKEZETI KÉPLETE

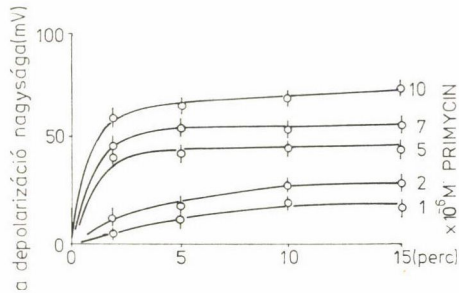


1. ábra. Primycin kémiai szerkezete

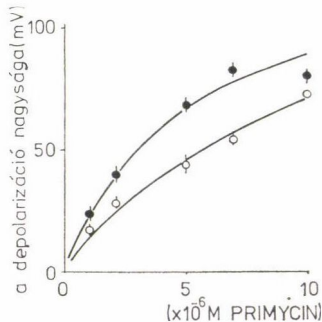
* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15—18 között Sümegen elhangzott előadás.

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

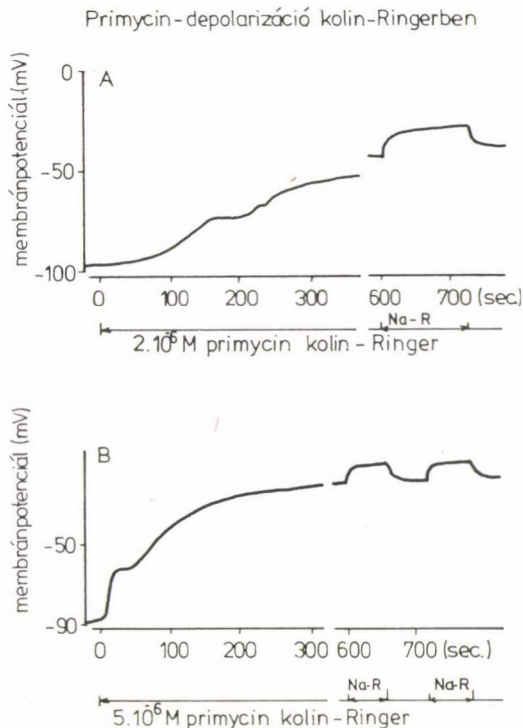
A korábbi adatoktól eltérően (DARÓCZI és GESZTELYI 1970), intracelluláris elvezetés alkalmazásával kimutattuk, hogy a primycin az előzetesen Na^+ -mentes Ringer oldatban inkubált vázizom felszíni membránjának nyugalmi potenciálját is csökkenti, azaz depolarizációt okoz (2. ábra). A depolarizáció koncentráció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



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



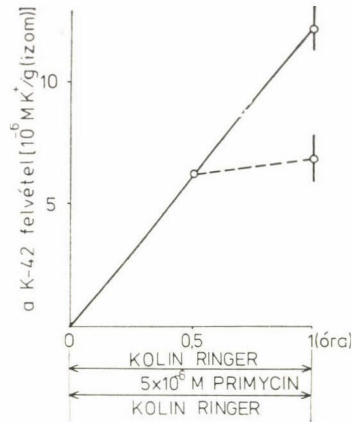
3. ábra. Na-ionok hatása a primycinnel kolin-klorid Ringerben béka sartorius izmon kiváltott depolarizációra. Nyugalmi potenciál $92,4 \pm 2,3$ mV. Ordináta a depolarizáció mértékét mV-ban, az abszcissza az alkalmazott primycin koncentrációkat mutatja. A görbék a különböző primycin koncentrációknál kolin-klorid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



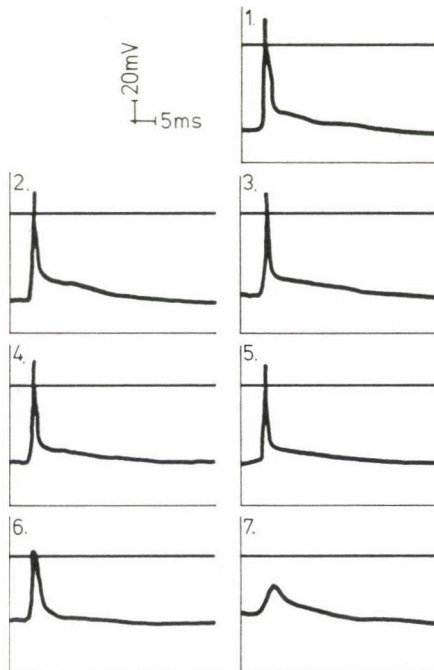
4. ábra. Na-ionok hatása a primycinnel kolin-klorid Ringerben kiváltott depolarizációra (folyamatos intracelluláris regisztrálási technikával). Az abszcissa alatt az inkubálás feltételeit adtuk meg. A nyilak az oldatcserék időpontját jelzik. Az A görbe a 2×10^{-6} , B görbe a 4×10^{-6} M primycin hatását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

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

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



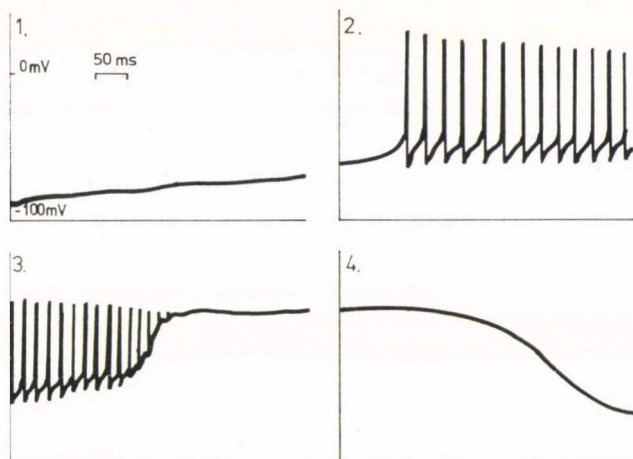
5. ábra. Primycin hatása béka semitendinosus izmából készített izomrostkötegek ^{42}K felvételére. Az ordinátán a ^{42}K felvételt, az abszcisszán az inkubálás idejét, a diagram alatt a kolin Ringerben primycinnel, ill. anélkül végzett inkubálások tartamát tüntettük fel. A kísérletekhez ugyanazon békák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



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

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

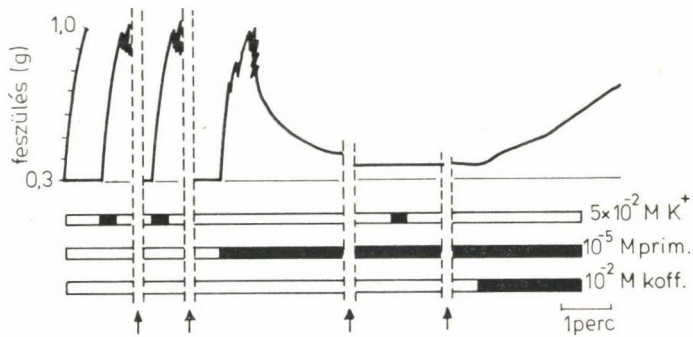
A 7. ábrán megfigyelhető, hogy Na-izetionát Ringerben az alacsony koncentrációban alkalmazott primycin hatására előbb lassú depolarizáció fejlődik ki, majd az elérve a Na^+ -csatornák nyitásának küszöbértékét, akciós potenciál jellegű gyors potenciál változásokban folytatódik. Az egyes potenciál változások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



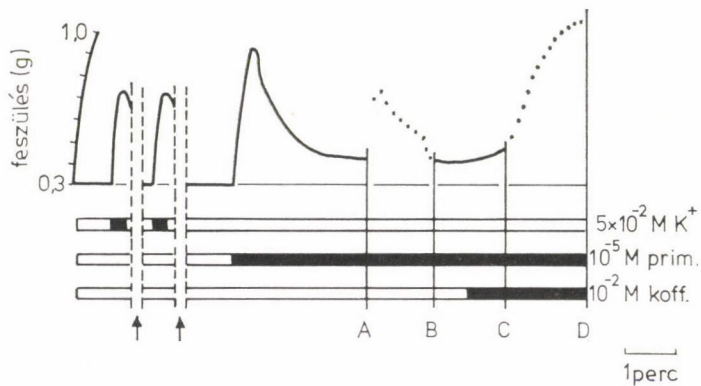
7. ábra. Primycinnel Na-izetionát Ringerben kiváltott akciós potenciál sorozat. Regisztrálás az 1. (1); 1,5 (2); 2. (3); 2,5 (4) percben a primycin alkalmazását követően történt

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

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



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

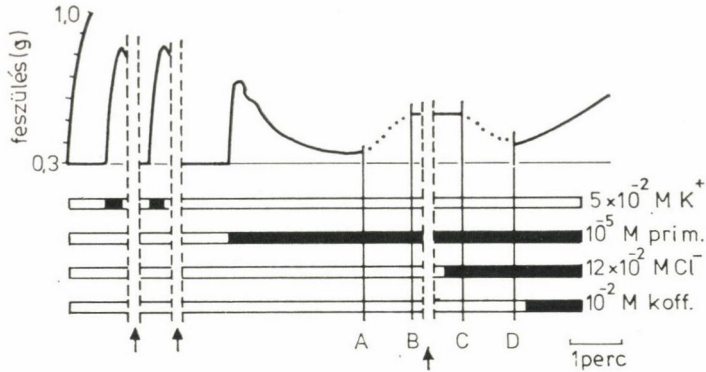


9. ábra. Primycinnel (10^{-5} M) kolin-klorid Ringerben kiváltott összehúzóadás. A és B, valamint C és D között az összehúzóadást nem regisztráltuk folyamatosan, annak mértékét csak minden 3. (A—B) és mindegyik (C—D) percben regisztráltuk, pontokkal jelezve. Egyebekben l. a 8. ábrát

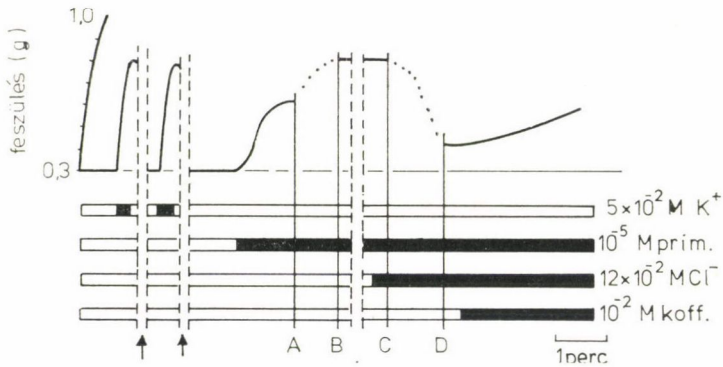
összehúzódását váltja ki (ha az ún. mechanikai küszöböt eléri), függetlenül attól, hogy a depolarizációt elektromos ingerrel vagy a külső közeg K^+ -koncentrációjának növelésével hoztuk létre. Az elektromos jelgenerációval kiváltott gyors mechanikai választ rángásnak, a kémiai úton jelgeneráció nélkül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

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

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



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



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

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

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

IRODALOM

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