

A KOFFEIN KONTRAKTÚRÁK PARAMÉTEREIT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA BÉKA VÁZIZMON*

KÓNYA LÁSZLÓ

Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma

Ismeretes, hogy a koffein, küszöb koncentráció (3 mM) fölött alkalmazva, depolarizáció nélkül vált ki kontraktúrát béka vázizmon (AXELSSON és THESLEFF 1958). A koffein hatására kifejlődő kontraktúra paraméterei (amplitudó, időtartam) eltérőek lehetnek a kísérleti körülményektől függően. Béka egyetlen izomrostján pl. a koffein hatására kifejlődő tónusfokozódás, másodperc nagyságrendű periódusonként rendszertelenül változik (LÜTTGAU és OETLIKER 1968). Ugyancsak több fázisú a rák izomrostján regisztrálható kontraktúra (ZACHACHARA és mtsai 1968).

A több száz rostot tartalmazó m. sartoriuson koffein kontraktúra szisztematikusan megjelenő gyors és lassú szakaszát figyelték meg BIANCHI és mtsai (1967). A koffein kontraktúrának két fázisát tudták elkülöníteni m. sartoriuson MATSUSHIMA és mtsai (1962), valamint fizosztigmin hatására PAGALA (1974). Saját korábbi kísérleteinkben béka m. semitendinosusából készített, kb. 100—200 rostot tartalmazó preparátumon normál Ringerben a koffein kontraktúra mindig két fázisúnak bizonyult (KÓNYA és mtsai 1978/a).

Különböző szerzők véleménye egybehangzó arra vonatkozóan (l. pl. BIANCHI és BOLTON 1967), hogy a koffein az izomban eltérő támadásponton hat, s a fázisok elkülönülése ezzel hozható kapcsolatba.

A gyors vagy első fázis kifejlődéséért feltehetően az izomrost felszíni struktúráiban (szarkolemma és T-tubulus membrán), vagy annak közelében lokalizálódó koffein-kötő hely felelős. Erre utal a gyors fázis kifejlődési sebessége mellett (10 másodpercen belül) az a megfigyelés, hogy a koffein a junkcionális elemekben gazdag szarkoplazmatikus retikulum (SR) preparátumon fokozott Ca-felszabadító hatással rendelkezik (FAIRHURST, 1975), valamint, hogy kötődése a fragmentált SR-en mágneses magrezonancia spektroszkópiával kimutatható (KÓNYA és mtsai 1978 /b).

A második fázissal egyidőben az SR duzzadását, majd membránjának sérülését lehetett megfigyelni (UHRİK és ZACHAROVA 1968, HUDDART 1972). Feltételezhető, hogy ilyenkor a koffein hatására az SR-ből kiszabaduló Ca hozzá létre az izom erőteljes kontraktúráját.

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

A koffein támadáspontjára vonatkozó feltételezéseink ellenőrzése és a depolarizációval (magas K tartalmú oldat) létrehozható kontraktúrával való összefüggésének tanulmányozására vizsgáltuk K-depolarizáció, valamint alacsony Ca-tartalmú, ill. La tartalmú oldat hatását a koffein kontraktúra paramétereire.

A kísérletekhez kecskebéka (*Rana esculenta*) m. semirendinosusából 100—200 rostot (kb. 20—40 mg) tartalmazó preparátumot készítettünk. Preparálás után egy órán keresztül n-Ringer oldatban pihentettük, majd Sartorius edényben függőleges helyzetben felkötöttük. Az izmok felső végét torziós írókarhoz, alsó végét Sartorius edény üvegkampójához rögzítettük. A mechanikus válasz regisztrálása változtatható sebességű kimográf segítségével kormozott papíron történt. Feszítésmentes állapotban meghatároztuk az izmok nyugalmi hosszát (l_0), majd a kísérlet megkezdése előtt az izmokat 30%-kal megnyújtottuk (l_f). A regisztrálást állandó kar-arány (1:3) mellett végeztük, s minden izom felkötésekor a kitérésnek megfelelő feszülés változását és az összehúzódás amplitudóját kalibráltuk. A folyadékcseret Sartorius edényben ötszörös térfogatú folyadékkal, fecskendő segítségével végeztük.

Kísérleteinknél analitikai tisztaságú Reanal (Budapest) vegyszereket használtunk. Különböző oldataink összetételét az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat

Oldataink összetétele
(Az egyes anyagok koncentrációját mM/l-ben adjuk meg)

	NR	izo-K	NS	KS
Na ⁺	117	—	157,5	—
K ⁺	2,5	119,5	2,5	160
Ca ²⁺	1	1	8	8
Cl ⁻	121,5	121,5	—	—
SO ₄ ²⁻	—	—	88	88
Trisz	5	5	5	5

Megjegyzés:

A preparáláshoz használt NR 35 mg/l d-tubocurarét tartalmazott. SO₄²⁻ tartalmú oldatok előállításához 10 mM-os CaSO₄ törzsoldatból indultunk ki. 10 mM koffein tartalmú oldatot 80 mM-os töménységű koffein törzsoldatból kiindulva mindig frissen készítettünk.

A Ca-mentesítés előrehaladását 30 percenként ismételt K-kontraktúrával (20 sec) ellenőriztük. A közbenső időben a megfelelő inkubáló oldatot 5 percenként cseréltük.

Az ábrákat kormozott papíron készült regisztrátumokról másoltuk és a különböző hatások bemutatására jellemző görbét választottuk.

K-depolarizáció hatása

Penetráló (Cl^-) anion jelenlétében K-depolarizáció alatt az izom duzzad, s a koffein hatása a depolarizáció tartamával arányosan csökken mindkét fázis paramétereire. A depolarizációt ezért nem penetráló (SO_4^{2-}) anion jelenlétében hoztuk létre különböző ideig (30—120 perc). Ilyen körülmények között a koffein kontraktúra két fázisa között jól megfigyelhető részleges relaxáció jelentkezett, ennek nagysága azonban változó volt, nem mutatott közvetlen összefüggést a depolarizáció időtartamával, és lényegében nem befolyásolta a kontraktúra fázisainak paramétereit.

Ca-eltávolítás hatása

FRANK (1978) újabb adataival egyezésben 0 Ca és 0,5 mM EGTA tartalmú oldatban inkubálva az izmokat, a Ca-eltávolítás hatása a K-kontraktúrára viszonylag lassan fejlődött ki. Ca-eltávolítást követően különböző időkben alkalmazva a koffeint, az első fázis amplitudójának jelentős csökkenését és a második fázis kifejlődésének lelassulását figyeltük meg (1. ábra).

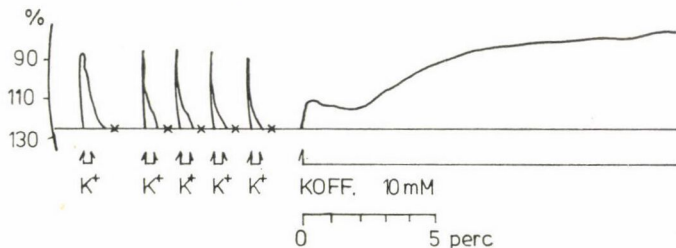
Ha a Ca-eltávolítást négy óránál hosszabb ideig folytattuk, a K-depolarizáció hatására kialakuló kontraktúra csaknem teljesen megszűnt (elektromechanikus kuplung (EMK), block). Az ilyenkor alkalmazott 10 mM koffein hatására még jelentős, a kontroll amplitudójának 30—40%-át kitevő első fázist tudtunk megfigyelni (2. ábra).

Hasonló körülmények között Cl^- jelenlétében alkalmazott koffein hatására kis amplitudójú elhúzó első fázist figyeltünk meg, míg a második fázis teljesen elmaradt (3. ábra).

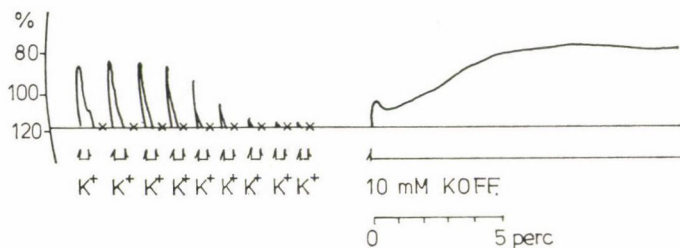
La^{3+} hatása

Két óráig tartó Ca-eltávolítást követően EGTA és Ca-mentes oldatban 0,2 mM La-t alkalmaztunk. La jelenlétében a K hatására kifejlődő kontraktúra amplitudója nőtt; ugyancsak nőtt a koffein kontraktúra első fázisának amplitudója és a második fázis kifejlődési sebessége (4. ábra).

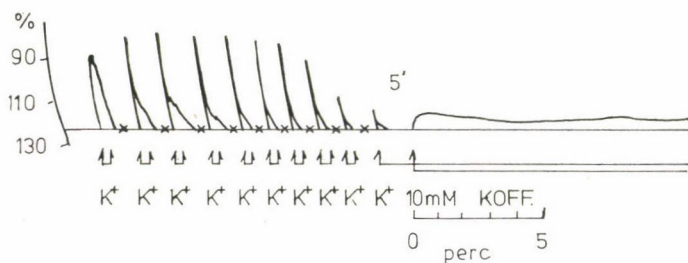
Normál (Cl^- -ot és 1,8 mM Ca-ot tartalmazó) Ringerben 1 mM La^{3+} jelenlétében a K-kontraktúra kifejlődési sebessége és amplitudója csökkent. Az ilyen körülmények között alkalmazott koffein hatására az első fázis gyakorlatilag változatlanul kifejlődött, ezt követően az izom viszont hosszú ideig részlegesen relaxált állapotban maradt, és a második fázis kifejlődése elhúzódtott (5. ábra). A részleges relaxáció alatt 0,5-1 perces periódussal jellegzetes tónusváltozások (lassú, kis amplitudójú oszcillációk) voltak megfigyelhetők.



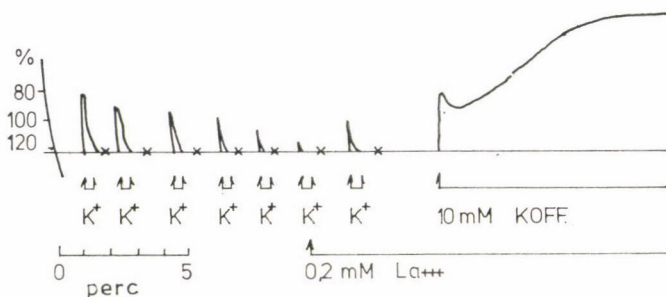
1. ábra. Koffein kontraktúra Ca-mentes, EGTA tartalmú oldatban 2,5 óráig inkubált izmon. Az ordinátán az izom rövidülését a nyugalmi hossz százalékában tüntették fel.



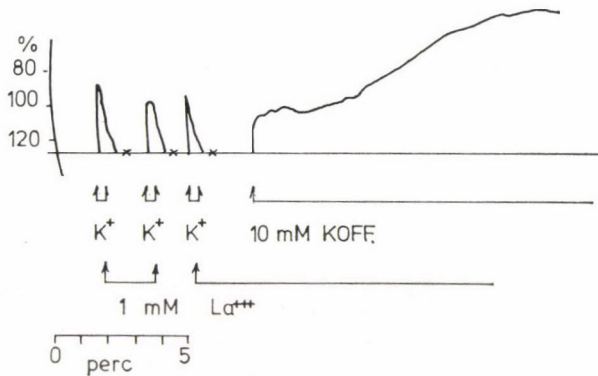
2. ábra. Koffein kontraktúra Ca-mentes, EGTA tartalmú oldatban 4 óráig inkubált izmon



3. ábra. 10 mM koffein hatása Ca-elvonást követően Ca-mentes izo-K oldatban 5 percig depolarizált izmon.



4. ábra. 0,2 mM La hatása K-depolarizációval és 10 mM koffeinnel kiváltott kontraktúrára (részleges Ca-mentesítést követően) 2,5 óráig Ca-mentes oldatban inkubált izmon



5. ábra. 1 mM La jelenlétének hatása NR-ben a K-depolarizációval és 10 mM koffeinnel kiváltható kontraktúrára

Mai ismereteink szerint az izomkontraktúra nagysága a mioplazma Ca-koncentrációjával arányos. Az izom tónus-, ill. hosszváltozásait a Ca-koncentráció időbeli változásának jelzéseként értékelhetjük. Lényegében elfogadottnak tekinthető, hogy az extracelluláris térből származó Ca közvetlen hatása a kontraktilis rendszerre elhanyagolható.

Ezek értelmében a kísérleteinkben leírt izotóniás kontrakciós és relaxációs folyamatokat az SR-ből történő Ca-felszabadulás és reakkumuláció eredményének tekinthetjük. A kontrakció kifejlődése során a SR-ből felszabaduló Ca^{2+} hatására a myofibrilláris térben a Ca-szint megnő. A relaxáció a Ca-felszabadulás csökkenésével párhuzamosan a reakkumuláció előrehaladását jelzi.

A szulfát jelenlétében alkalmazott K-depolarizáció alatt a koffein kontraktúra első fázisa után minden esetben részleges relaxációt tudtunk megfigyelni. A jelenség feltehetően arra utal, hogy depolarizáció alatt a SR-ből történő Ca-felszabadulás és reakkumuláció nyugalmi szintje megnő, és a depolarizációtól függetlenül kiváltott Ca-szint fokozódás — ez esetben koffein hatására — gyorsabban lezajlik. Az izmon tehát ilyenkor egy „relaxációs tendencia” figyelhető meg. Ennek kapcsolata az EMK folyamataival további tisztázást igényel.

A Ca szerepe az EMK folyamatainak szabályozásában több oldalról vitatott. Részben bizonyítottnak tekinthetjük FRANK és BIANCHI kísérletei, valamint BIANCHI elmélete (1969) alapján, hogy a T-tubulusok depolarizációja és a SR-ből történő Ca-felszabadulás között a funkcionális kapcsolatot a T-TC junkcióra lokalizálódó Ca biztosítja. Ha ennek mennyiségét Ca-mentes oldatban történő inkubálással és komplexképző alkalmazásával csökkentjük, úgy EMK block fejlődik ki. Ez a block különböző 2 és 3 vegyértékű kationokkal felfüggeszthető (FRANK 1960, 1962, 1978). Az ismertetett kísérleteinkben 0,2 mM La^{3+} is képes volt a blockot felfüggeszteni.

Ca-elonással nemcsak a K-kontraktúra amplitudóját, de a koffein kontraktúra mindkét fázisának a sebességét is csökkenteni lehetett. Ez a megfigyelés amelltt szól, hogy az ún. kuplung Ca^{2+} mennyisége ilyen módon csökkenthető (depolarizációra kialakuló kontraktációs block). A koffein kontraktúra fázisainak amplitudó csökkenése a koffein gyors hatásának kifejlődésében szerepet játszó Ca-nak, és az SR Ca-nak a csökkenését (második fázis) egyaránt bizonyítani látszik. Feltehető, hogy a Ca-elonás az izom különböző Ca-frakcióit érinti, s ezáltal gyengíti a kontraktciók nagyságát.

1 mM La jelenlétében a K kontraktúra csökkenése a La^{3+} membrán-stabilizáló hatására utal. Változatlan nagyságú depolarizáció hatására a kontraktúra kifejlődési sebessége, ezzel párhuzamosan feltehetően a Ca-felszabadulás sebessége is csökken. A valószínűleg változatlan sebességű Ca-reakkumuláció eredménye, hogy az izomkontraktúrában egy plato szakasz fejlődik ki. A depolarizáció hatásával ellentétben a koffein hatás gyors fázisa változatlan marad. Ez arra utal, hogy La^{3+} jelenléte a gyors fázis kifejlődéséért felelős Ca mozgást nem befolyásolja. Az ezt követően megfigyelhető La^{3+} hatás értékelése nehezebb. Az előzőek szerint a Ca-felszabadulás és reakkumuláció ütemének egy labilis egyensúlya alakulhat ki. Feltehetően az adott körülmények között a La^{3+} nem jut a SR közelébe és a T-tubulus membránjának stabilizálásán keresztül mintegy közvetve hat. Ennek módja további vizsgálatot igényel.

IRODALOM

- AXELSSON, J., THESLEFF, S.: *Acta Physiol. Scand.* **44**, 55 (1958).
 BIANCHI, C. P., BOLTON, T. C.: *J. Pharmacol. exptl. Therapeutics*, **157**, 388 (1967).
 BIANCHI, C. P.: *Fedn. Proc.* **28**, 1624 (1969).
 FRANK, G. B.: *J. Physiol. London* **151**, 518 (1960).
 FRANK, G. B.: *J. Physiol. London* **163**, 354 (1962).
 FRANK, G. B.: *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* **56**, (1978).
 HUDDART, D.: *Comp. Biochem. Physiol.* **43 A**, 369 (1972).
 KÓNYA, L., KÖVÉR, A.: *Symp. Biol. Hung.* **17**, 105 (1974).
 KÓNYA, L., JÓNA, I., KÖVÉR, A., ARADI, F.: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **29**, 129 (1978/a).
 KÓNYA, L., KÖVÉR, A., JÓNA, I., SZABOLCS, M., ARADI, F.: *Proc. 17th Eur. Conf. on Muscle and Motility, Warszawa, No. 10.* p. 18 (1978/b).
 LÜTTGAU, H. C., OETLIKER, H.: *J. Physiol. London*, **194**, 51 (1968).
 MATSUSHIMA, T., FUJINO, M., NAGAI, T.: *Jap. J. Physiol.* **12**, 106 (1962).
 PAGALA, M. K. D.: *Am. J. Physiol.* **226**, 1209 (1974).
 UHRİK, B., ZACHAROVA, D.: *Physiol. Bohemoslov.* **17**, 118 (1968).
 ZACHAROVA, D., ZACHAR, J.: *Cs. fysirol.* **17**, 47 (1968).