

ÚJABB ADATOK A MEMBRÁNPOTENCIÁL SZABÁLYOZÁSÁBAN SZEREPLŐ ANYAGCSERE FOLYAMATOKRA VONATKOZÓAN

VARGA EMIL, GESZTELYI ISTVÁN és DANKÓ MIKLÓS

DOTE Élettani Intézet, Debrecen

Korunk tudományos életének egyik dialektikus ellentmondása megfigyelhető a membranologusok konferenciáin is. Nevezetesen, annak ellenére, hogy kísérleti eredményeink közvetlenül esetleg csak egy adott membránféleség funkciójára jellemzőek, s arra is csak meghatározott kísérleti feltételek között, mégis az eredmények diszkussziója alkalmával úgy vonunk le következtetéseket, mintha azok általában a legkülönbözőbb membránféleségekre érvényesek lennének. Ezt az ellentmondást szem előtt tartva szükségesnek tartom előrebocsátani, hogy röviden ismertetésre kerülő kísérleteinket *Rana esculentá-k* m. sartoriusának aneurális részén végeztük, s így — ha a diszkusszió során hivatkozunk is pl. simaizmokon nyert megfigyelésekre — eredményeinket egyelőre csak vázizomra kívánjuk vonatkoztatni. Ennek megfelelően már a bevezetésben elmondandók is csak az ún. ingerületvezetésre képes membránokra vonatkoznak.

Az ingerületi folyamat ionelméletére vonatkozó ismeretek valamennyi modern élettani tankönyvben és kézikönyvben megtalálhatók, s éppen ezért legyen szabad idevonatkozó ismereteinket csak egészen röviden összefoglalni.

Az I. táblázat adatai számszerűen illusztrálják azt a régóta jól ismert tényt, hogy milyen egyenlőtlen ioneloszlás jellemző pl. a béka vázizmára. A táblázat feltünteti az adott iongradiensek alapján a Nernst-képlet segítségével számított equilibrium potenciál értékeket is, azaz azon feszültség-értékeket, melyek az adott ionokra vonatkozóan, s az adott iongradienst is tekintetbe véve egyensúlyt képesek tartani. Más szóval, az intracelluláris tér K-koncentrációja 56-szorosa az extracellulárisának, s nyilván ez a koncentráció-különbség a K-ionokat az intracelluláris térből az extracelluláris térbe irányítaná. Ezen erővel szemben áll részben a membrán ellenállása, másrészt az elektromos potenciál-különbség, mely a membrán két oldala között fennáll. A feltüntetett adatok szerint —101 mV-os potenciál-különbség volna képes egyensúlyt tartani az adott K-gradienssel. Minthogy a tényleges potenciál-különbség ennél kisebb, számolni lehet némi K-leadással. Valójában a K-equilibrium potenciál, s a nyugalmi potenciál között levő 7 mV-os potenciál-különbség jelentősége még nem egészen tisztázott. Kénytelenek vagyunk ui. többek között azt is

I. táblázat

Különböző ionok koncentrációja béka izolált m. sartoriusában

Intracelluláris térben	membrán	Extracelluláris térben
140 mM — K ⁺ 3,6 mM — Cl ⁻ 9,2 mM — Na ⁺ 152 mE — A ⁻		2,5 mM — K ⁺ 120 mM — Cl ⁻ 120 mM — Na ⁺

Potenciálok

$$V = \text{nyugalmi membránpotenciál} = -94 \text{ mV}$$

$$V_K = RT/F \ln [K]_o/[K]_i = -101 \text{ mV}$$

$$V_{Cl} = RT/F \ln [Cl]_i/[Cl]_o = -88 \text{ mV}$$

$$V_{Na} = RT/F \ln [Na]_o/[Na]_i = +64 \text{ mV}$$

$[]_i$ $[]_o$ az izomrost belsejében, ill. az extracelluláris térben levő koncentrációt jelölik,
 V = belső potenciál, F = Faraday állandó, R = gázállandó, T = abszolút hőmérséklet
 (Horowicz 1961)

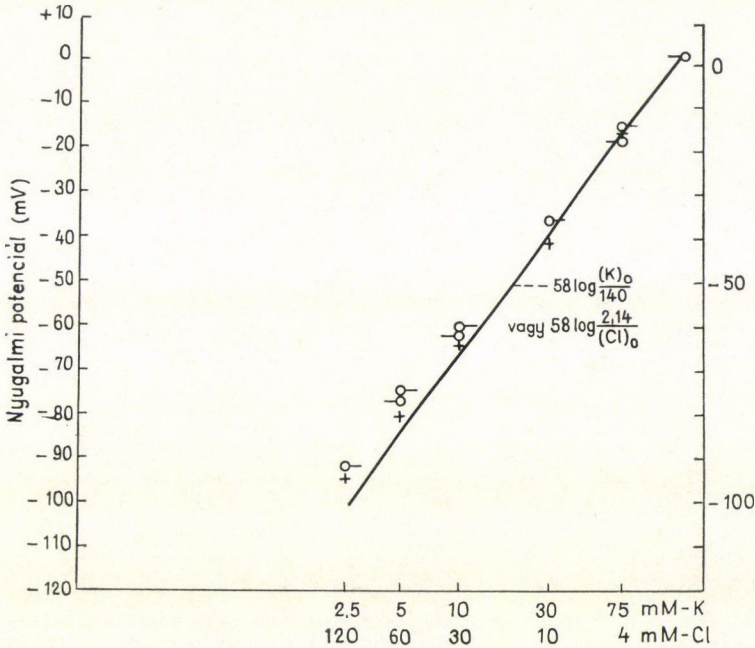
tekintetbe venni, hogy az ionelmélet alapjául szolgáló eredményeket szinte kizárólag fiziológias sóoldatokban equilibráltatott izmokon nyerték. Éppen ezért figyelemre méltó KERNAN (1960) eredménye, mely szerint a szérum-tartalmú miliőben inkubált izmon mért és a Nernst-képlet alapján számított nyugalmi potenciál fiziológias K-koncentráció esetén is jól megegyezik, szemben a Ringer-oldatban equilibráltatott izom nyugalmi potenciáljával, melyen a mért és számított értékek között következetesen kimutatható néhány mV-os különbség.*

Lényegében hasonló a helyzet a klorid-ionok egyenlőtlen eloszlása tekintetében is, amennyiben az extracelluláris tér kloridkoncentrációja kb. 33-szorosa az intracellulárisának. A jól permeáló klorid-ionokat a gradiens befelé hajtó erejével szemben ható elektromos gradiens tartja vissza. Kétségkívül a nyugalmi potenciál és az equilibrium potenciál értéke a klorid-ionok esetében sem egyezik maradéktalanul. E különbség magyarázatára azonban hiányzanak az adatok. Ezzel kapcsolatban rá kell mutatnom azokra a metodikai nehézségekre, melyek a 120 mM kloridot tartalmazó extracelluláris tér jelenlétében a lényegesen alacsonyabb intracelluláris klorid-koncentráció meghatározását megnehezítik. Tulajdonképpen valójában nem is közvetlen intracelluláris klorid-meghatározás alapján ismerjük az intracelluláris klorid-koncentrációt, hanem a nyugalmi potenciálból a Nernst-képlet alapján szokták azt kiszámítani.

* Anélkül, hogy eredeti célkitűzésemtől eltávolodni kívánnék, szeretnék rámutatni, hogy az említett, s ahhoz hasonló megfigyelések alapján felvethető a kérdés, hogy vajon az ún. fiziológias sóoldat valóban minden tekintetben fiziológias miliőt jelent-e. E kérdést talán azért is érdemes felvetni, mert ha számba vesszük a membranológiai kutató munkában alkalmazott módszereket, kénytelenek vagyunk megállapítani, hogy azok jelentős része semmiképpen sem tekinthető fiziológias beavatkozásnak.

Az elmondottak szerint bizonyos fenntartással azt mondhatjuk, hogy a nyugalomban levő izommembrán két oldalán egyenlőtlenül eloszló K- és Cl-ionok iongradiense és elektromos gradiense egyensúlyban van.

Az I. táblázat adataiból az is látható, hogy a két — előzőekben tárgyalt — ionnal szemben gyökeresen más a helyzet a Na-ionok egyenlőtlen eloszlására vonatkozóan. A Na-ion gradienssel szemben +64 mV-os membránpotenciál tartana equilibriumot. Más szóval, a Na-ionokat mind az ion gradiens, mind a

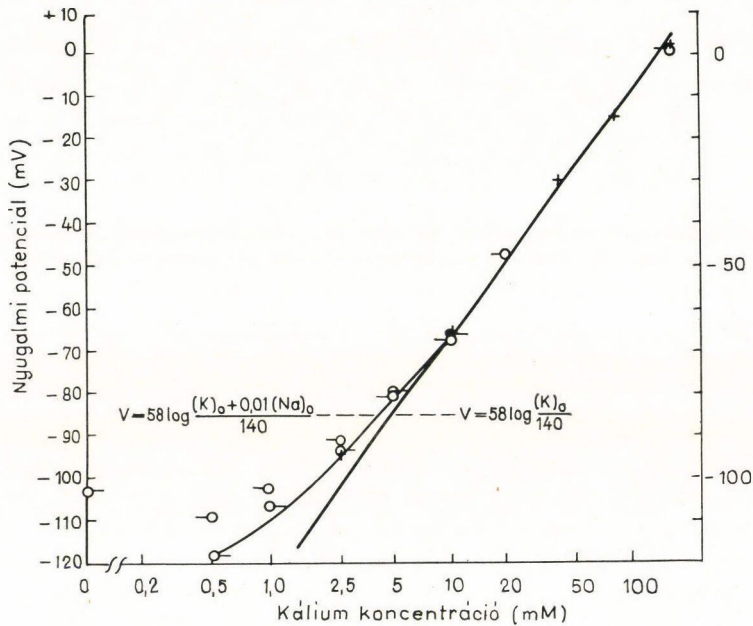


I. ábra. A membránpotenciál összefüggése a log. [K]₀, vagy a log. [Cl]₀-dal olyan oldatokban, melyekben a [K]₀ · [Cl]₀ = 300 mM². A kereszttek 10—60 perces equilibrálás után mért értékek, a körök 20—60 másodperccel a koncentráció gyors megváltoztatása után mért értékek. —0 = a K-koncentráció növelése, ill. 0— = a [K]₀ csökkentése után mért érték (HODGKIN és HOROWICZ 1959 a)

sejt belsejének negativitása az extracelluláris térből befelé irányítja. Az a tény, hogy nyugalmi állapotban a Na gradiens mégis megmarad, azzal magyarázható, hogy nyugalmi állapotban is működik egy ellentétes Na-mozgást biztosító tényező, a Na-pumpa.

Az I. ábrán demonstrált kísérletben az extracelluláris K-, ill. klorid-koncentráció gyors megváltoztatásának következményei vannak feltüntetve. Megfelelő kísérleti berendezések alkalmazásával ui. tetszés szerinti extracelluláris K-, ill. klorid-koncentrációt hoztunk létre anélkül, hogy ugyanakkor az intracelluláris ionkoncentráció is megváltozna. Mint az ábrán látható, az

extracelluláris K-koncentráció növelésének, ill. a klorid-koncentráció csökkentésének következményeként az izommembrán nyugalmi potenciálja csökken, s minél nagyobb mértékű a K-koncentráció növelése, ill. a klorid-koncentráció csökkentése, a depolarizáció annál kifejezettebb. Megfigyelhető továbbá, hogy a számított és mért értékek néhány mV-os, de következetes eltérést mutatnak éppen a fiziológiai ionkoncentráció esetében.



2. ábra. A membránpotenciál összefüggése a külső K-koncentráció logaritmusával, ha kloridmentes, szulfát oldatot alkalmazunk. Jelek azonosak az 1. ábrával (HODGKIN és HOROWICZ 1959 a)

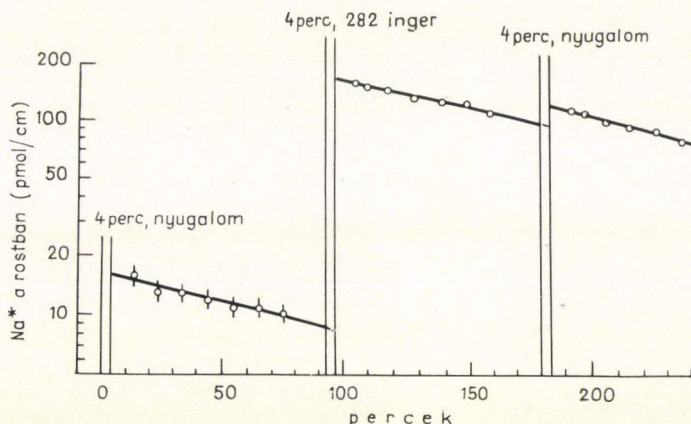
A számított és mért értékek közötti, 1. ábrán látható különbségek magyarázatát szolgáltatja HODGKIN és HOROWICZ 2. ábrán (1959 a) dokumentált kísérlete, mely szerint ha a K- és klorid-koncentrációkon kívül figyelembe vesszük a Na-ionok egyenlőtlen eloszlását is, akkor a számított és mért értékek közötti különbség a fiziológiai ion-koncentráció esetében csaknem megszűnik.

Az elmondottak szerint elsősorban a K- és Cl-ionok egyenlőtlen ion-eloszlása biztosítja a nyugalomban levő izomrost membránjának két oldala közötti potenciál-különbség, azaz a nyugalmi potenciál fenntartását. E két ion mellett a nyugalmi potenciál biztosításában a Na-ionok szerepe sokkal kevésbé lényeges.

Természetesen ez a tény szoros összefüggésben van a membrán permeabilitási viszonyaival. A nyugalomban levő izommembrán ui. a K- és Cl-ionokkal szemben permeabilis, de sokkal kevésbé permeabilis a Na-ionokkal szemben.

A K-, ill. Cl-permeabilitás vagy azonos mértékű, vagy egyik, ill. másik ion javára némileg eltolódik. A Na-permeabilitás — ezzel szemben — kb. egy-százada a K-permeabilitásnak.

Az elmondottak azonban hangsúlyozottan csak a nyugalomban levő membránra jellemzőek. Amint a membrán ingerületbe jut, éppen az említett sajátosságok változnak meg, nevezetesen, kb. ötszázszorosára nő a Na-permeabilitás, s ugyanakkor a Na iongradiens hatására jelentős Na-beáramlás történik (3. ábra). A membrán permeabilitásának növekedése, valamint a beáramló Na-ionok megváltoztatják a töltés-viszonyokat, melynek eredményeként — átmenetileg — a membrán belső felszíne válik pozitívvá a külső fel-



3. ábra. Ingerlés hatása a ^{24}Na belépésére izolált izomrostban. Abszcissa: idő, ordinata: a ^{24}Na mennyisége a rost hosszúság egységére vonatkoztatva logaritmikus léptékben. A függőleges vonalak jelölik azokat a 4-perces periódusokat, mely alatt a rost izotópot vett fel. A második periódusban a rostot 1,56/sec frekvenciával ingerelték 3 percen át (HODGKIN és HOROWICZ 1959 b)

színhez viszonyítva. Az említett változásokkal magyarázzuk az ingerületi folyamat equivalensének, az akciós potenciálnak a létrejövetelét. Ismeretes, hogy különböző membránoknál e tekintetben is eltérés van, amennyiben az ingerületi folyamat egyes membránokban szelektív Na-permeabilitást jelent, s így e membránoknál akciós potenciál Na-ionok távollétében nem generálódhat. Vannak azonban olyan membránok, melyek ingerületi folyamata ugyan-csak permeabilitás növekedéssel jár, de ez a permeabilitás növekedés nem annyira szelektív, s a Na-ionokat pl. Ca-ionok helyettesíthetik.

Az akciós potenciál többszáz V/sec meredekségű felszálló szára rendszerint csak néhány tized msec-ig tart, s azt követi a kezdetben hasonló meredekségű leszálló szár, mely részben az ingerületi folyamat hatására aktiválódott Na-pumpa működésével, részben a megnövekedett K-leadással magyarázható. Anélkül, hogy az ingerületi folyamat további részleteivel foglalkoznánk, csak annyit kívánok leszögezni, hogy a fiziológiás ingerületi folyamat

számos szövet esetében Na-dependens, s így érthető, hogy amidőn az ingerületi folyamat modellezése céljából depolarizációt hozunk létre, Na-dependens folyamatokat igyekszünk modellként választani.

Az ingerületi folyamat ionelmélete több szempontból ma is vita tárgyát képezi. Különösen abban a tekintetben merülnek fel jogosnak látszó kételyek, hogy az intracellulárisan lokalizált K- és Na-ionok teljes egészükben diffuzibilis állapotban vannak-e — mint azt a HODGKIN-teória föltételezi — vagy kisebb-nagyobb hányaduk kötött. Mindezek ellenére ez az elmélet — korábbi ismereteinkhez viszonyítva — minden bizonnyal fejlődést jelentett, s alkalmasnak bizonyult számos kísérleti megfigyelés magyarázatára. Ezért érdemes szemügyre venni HODGKIN és HOROWICZ (1959 b) izolált béka-izomroston nyert eredményeit, melyet a II. táblázaton tüntetünk föl.

A már említett egyenlőtlen ioneloszlásra vonatkozó adatokon kívül a táblázat közli azokat a mérési adatokat, melyek bizonyítják, hogy ingerület alatt a Na-felvétel többszörösére nő, s egyidejűleg fokozott K-leadás van.

Az elektromos jelenségek analízise, s a mechanizmus további részleteinek feltárása azért rendkívül lényeges, mert a sejt működése szempontjából az akciós potenciál s az azt követő mechanikai válasz ok — okozati összefüggésben áll egymással.

Mint a 4. ábrán látható görbék mutatják, az akciós potenciál már jelentős részben le is zajlott, amikor az izom mechanikai válasza kezdetét veszi. Általában azt mondhatjuk, hogy a depolarizációs folyamat egyrészt megelőzi az izom összehúzódását, másrészt oka annak.

Szándékosan nem foglalkozom a depolarizációs folyamat és a mechanikai válasz közötti ún. elektro-mechanikus kuplung kérdésével, mellyel más előadók részletesen foglalkoznak.

Ha az előzőekben röviden vázolt ismereteket összegezzük, világosnak tűnik, hogy a nyugalomban levő izomrost membránpotenciálját dominánsan a K- és Cl-ionok egyenlőtlen eloszlása határozza meg. A Na-pumpának, ill.

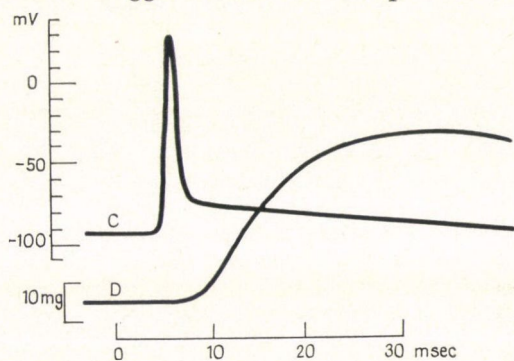
II. táblázat

Béka izolált izomrostjának Na- és K-fluxusai

	Nyugalomban levő izomrost fluxusa pmol/cm ² sec	Ingerelt izomrost fluxusa pmol/cm ² sec	Koncentráció mmol/kg H ₂ O
Na-influx	3,5 ± 0,4	19,4 ± 1,5	[Na] _o = 120
Na-efflux	ca 3,5	3,8 ± 1,0	[Na] _i = 9,2 ± 1,2
Na-felvétel	—	15,6 ± 1,8	Δ[Na] _i = +0,0077 ± 0,0009
K-influx	5,4 ± 0,8	1,8 ± 0,3	[K] _o = 2,5
K-efflux	8,8 ± 1,2	11,4 ± 0,6	[K] _i = 140 ± 7
K-leadás	—	9,6 ± 0,7	Δ[K] _i = -0,0047 ± 0,0003

Átlagos rostátmérő 100 μ, átlagos hőmérséklet 20,6 °C (HODGKIN és HOROWICZ 1959 b).

azon keresztül az izom anyagcsere folyamatainak csak az ingerületi folyamat alkalmával kialakuló akciós potenciál repolarizációjában tulajdonítunk lényeges szerepet. Valóban, a Na-pumpa, ill. az azzal kapcsolatos anyagcsere folyamatok azok, amelyeket legszélesebb körben tanulmányoztak, s így a membránpotenciál szabályozása szempontjából a legismertebbek. Minthogy ezt a kérdést szintén több referátum érintette, a következőkben csak azt a néhány, új megfigyelést szeretném ismertetni, melyek felvetik azt a lehetőséget, hogy a membránpotenciál szabályozásában a sejt anyagcseréjének — a Na-pumpától bizonyos vonatkozásban függetlenül is — szerepe lehet.

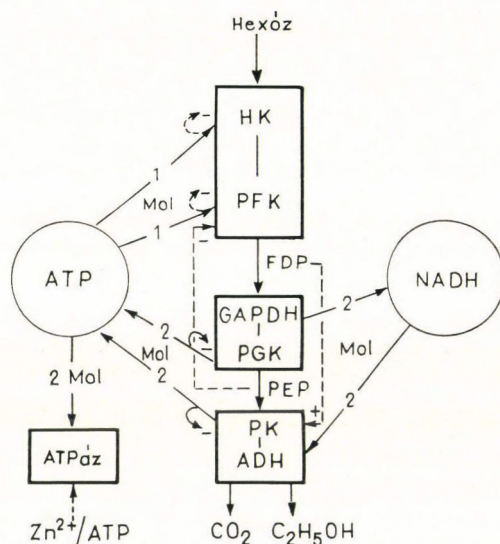


4. ábra. Normál Ringerben tartott izolált izomrost elektromos (C) és mechanikai (D) válasza intracelluláris elektróddal, ill. transzducerrel regisztrálva. Az akciós potenciál csúcsánál a rost belseje 30 mV-tal pozitívabb a külső felszínhez viszonyítva. Az akciós potenciált megelőző kis változás a görbén artefactum (HODGKIN és HOROWICZ 1957)

BOZLER (1948) volt az első szerző, aki a simaizmok ritmikus tevékenységével kapcsolatban felvetette, hogy annak hátterében a sejt-anyagcsere spontán fluktuációja áll, mely a membránpotenciál fluktuációjához vezet, s utóbbi pedig a ritmikus mechanikai válaszáért felelős.

E kérdéssel kapcsolatban különös figyelmet érdemel GOLENHOFEN (1970) munkássága, aki keringésetani tanulmányai során figyelt fel az érfalak simaizomzatának ritmikus tevékenységére. Vizsgálatait egyrészt a szívre, másrészt a legkülönbözőbb simaizmokra kiterjesztve, valamennyi vizsgált preparátum közös sajátosságaként egy lassú ritmusú tevékenységet írt le, melynek frekvenciája általában 1/perc körül van, s ezért percritmusnak is nevezi. A különböző simaizmokon végzett tanulmányai alapján a percritmust egyértelműen el tudta választani a gyors ingerületi folyamatoktól, s ugyanakkor párhuzamot talált a lassú potenciálingadozás és az azonos frekvenciájú mechanikai válasz között. Megállapította, hogy a percritmus miogén ritmus, melyet azonban neurális és hormonális tényezők jelentősen módosíthatnak, növelhetnek vagy csökkenthetnek. A miogén ritmus tanulmányozása — ezek szerint — csak a neurális és hormonális hatások kiiktatása után lehetséges, ami önmagában sem könnyen megoldható feladat.

E miogén percritmus tanulmányozását tengerimalac *Taenia coliján* folytatva megállapította, hogy anyagsere mérgek szelektíve gátolják a percritmust, melynek frekvenciája egyébként hasonló a HESS által tanulmányozott glikolitikus oszcilláció frekvenciájához. Mint ismeretes, először élesztősejtekben, majd ascites, ill. izomsejtekben egyaránt kimutatták, hogy a glikolitikus oszcilláció szempontjából a fruktóz-6-foszfát mennyisége a limitáló tényező, továbbá, hogy az oszcilláció frekvenciája, amplitudója, s a hullám alakja a



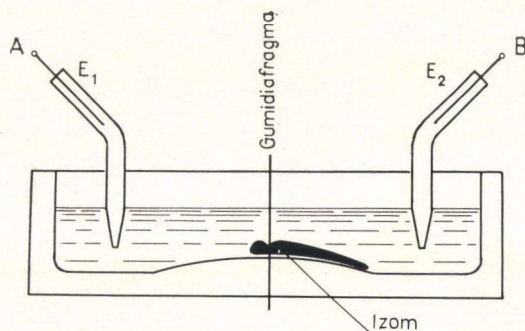
5. ábra. HESS sémája a glikolitikus oszcillációra vonatkozóan. HK = hexokináz; PFK = foszfofruktokináz; FDP = fruktóz-1-6-difoszfát; GAPDH = glicerin-aldehid-3-foszfo-dehidrogenáz; PGK = foszfo-glicerokináz; PK = piruvátkináz; ADH = alkohol-dehidrogenáz (HESS és BOITEUX 1968)

szubsztrát-bevitel szabályozásával befolyásolható (HESS és BOITEUX 1968). Számos kísérlet alapján úgy tűnik, hogy a foszfofruktokináz az oszcilláció primer mediátora.

Az 5. ábra mutatja HESS és munkatársának (1968) sémáját. Ezek szerint a NADH raktár két molekula NADH-t nyer a glicerin-aldehid-3-foszfo-dehidrogenáz útján, s hexoz molekulánként ugyanannyit ad tovább az alkohol-dehidrogenáz révén. A glikolitikus fluxus bármilyen növelése vagy csökkentése — mely a két enzimet illetően nincs koordinálva — csökkenti vagy növeli a NADH raktárat, amiről a fluoreszcencia változások útján győződhetünk meg. A $NAD^+/NADH$ rendszer ily módon indikátora a glikolitikus folyamatok meghatározott szakaszának. Az állandó oszcilláció folyamán hexozmolekulánként két extra ATP molekula hasad le, mely egy endogén ATPáz útján hidrolizálódik. Minthogy a fruktóz-6-foszfát oszcillációt hoz létre, de a fruktóz-1-6-difoszfát nem, a primer mediátornak a foszfo-fruktokináznak kell lennie. Egyéb-

ként az eredmények értékelésével kapcsolatban GOLENHOFEN (1970) maga is rendkívüli óvatosságra int, hiszen az értékelhető kísérlet elemi feltétele, hogy tartósan követni tudjuk a simaizom-sejt lassú potenciálváltozásait, ami metodikailag szinte leküzdhetetlen nehézségekkel jár.

Mindezen jogos fenntartások ellenére nekünk is gondolnunk kellett a sejt anyagcsere és a membránpotenciál változás közötti viszonylag közvetlenebb kapcsolatra, amikor béka vázizmán tanulmányozva a veratrin hatására bekövetkező potenciálváltozásokat órákon keresztül fennálló, meglepően szabályos, ritmusos potenciálváltozásokat figyeltünk meg.



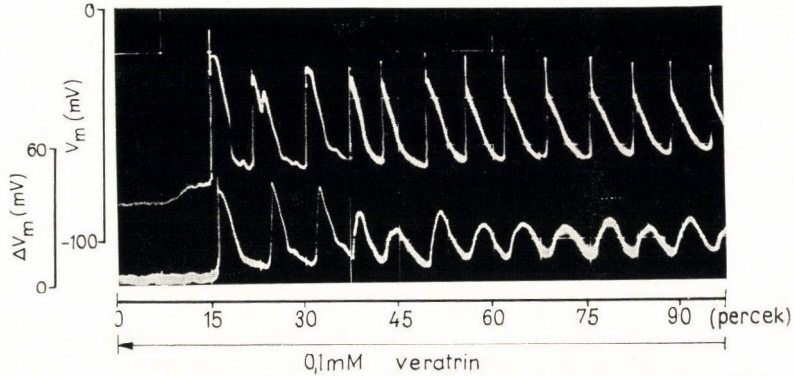
6. ábra. GESZTELYI módszerének sémája béka izolált m. sartoriusának aneurális részén kialakuló membránpotenciál változások folyamatos extracelluláris regisztrálására (GESZTELYI 1971)

Mielőtt a kísérleti eredményeket ismertetném a 6. ábrán bemutatom az extracelluláris mérés továbbiakban alkalmazott módszerét, melyet intézetünkben GESZTELYI (1971) dolgozott ki.

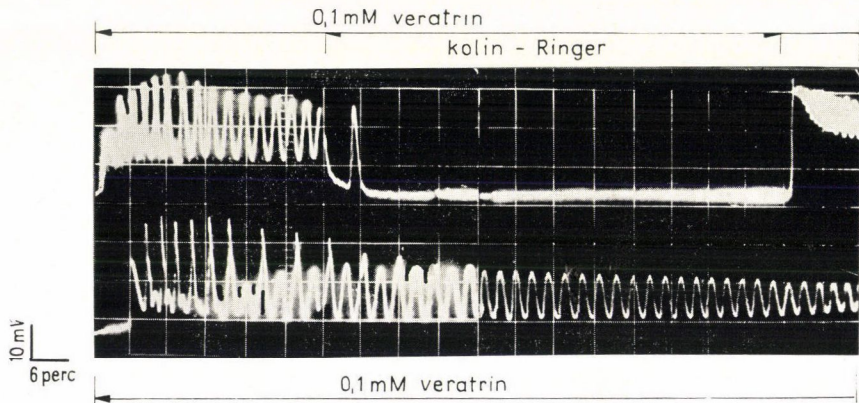
Az eljárás lényege, hogy egy gumidiafragmával elválasztja a Ringer-oldatban levő m. sartorius aneurális és neurális részét. Az aneurális oldalon létrejövő potenciálváltozásokat, a másik oldalt referencébázisként használva, folyamatosan követni lehet az oldatokba mártott ezüst-ezüstklorid agar hidak segítségével. Kétségtől — mint minden extracelluláris mérési módszer esetében — a kapott membránpotenciál értékek nagysága kisebb a tényleges értéknél, de adott kísérleti feltételek mellett e módszer egyedülálló lehetőséget biztosít a m. sartorius valamennyi rostjában bekövetkező membránpotenciál változások átlagának órákon keresztül történő, folyamatos regisztrálására.

A 7. ábrán az alsó görbe az előbb említett extracelluláris elvezetéssel nyert membránpotenciál változásokat, míg a felső görbe egy felszínes rost intracelluláris elvezetéssel regisztrált potenciálváltozásait mutatja. Ez és hasonló kísérletek arról győzték meg bennünket, hogy a béka vázizomának veratrinnal kezelt aneurális részén valóban megfigyelhető egy ritmusos tevékenység. Neurális struktúrákra vonatkozó irodalmi adatokból, másrészt izmon végzett, saját vizsgálataink alapján tudtuk, hogy a veratrin depolarizáló

hatásában kulcs helyzetet foglal el a membrán Na-permeabilitásának növekedése, ill. a fokozott Na-beáramlás. Azt kívántuk ezért először eldönteni, hogy az észlelt oszcillációs jelenség is Na-dependens folyamat-e.



7. ábra. Béka m. sartoriusán 0,1 mM veratrin hatására keletkezett ritmusos membránpotenciál-változások egyidejű regisztrálása extracelluláris elvezetéssel (alsó görbe) és intracelluláris elvezetéssel (felső görbe)

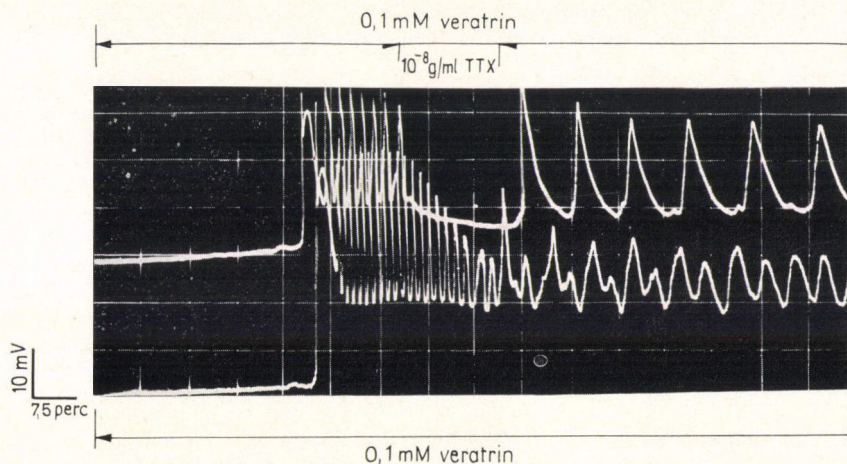


8. ábra. Az extracelluláris Na jelentőségének vizsgálata a veratrin hatására kialakuló membránpotenciál oszcillációban. Alsó görbe: kontroll sartorius. Felső görbe: a kísérlet 36. percében a Ringer-oldat teljes Na-tartalmát kolinnal helyettesítettük. Abszcissa: idő, ordinata: extracelluláris elvezetéssel nyert feszültségkülönbség a referencebázisként használt neurális izomrész és a veratrinnal kezelt aneurális izomrész között

A 8. ábrán látható kísérletet egy izompáron végeztük. Az alsó görbe a kontroll izmon nyert regisztrátumot mutatja. Mint megfigyelhető, normál Ringerben 0,1 mM veratrin hatására — néhány perces latencia idő után — kezdetét vette egy kb. 25 mV-os amplitúdójú ritmusos tevékenység, melynek amplitúdója kb. felényire csökkent ugyan a kísérlet 2. órájában, de ritmusa impresszionálisan szabályos volt. Az izompár másik tagján a veratrin hatására

kialakult oszcilláció stádiumában olyan, hasonló koncentrációjú veratrint tartalmazó oldatot alkalmaztunk, melyben a teljes Na-tartalmat kolinnal helyettesítettük. Mint látható, a Na-mentes Ringerben az oszcilláció megszűnik, s teljes repolarizáció következik be. A folyamat reverzibilis, amennyiben Na-tartalmú Ringerre visszatérve az oszcilláció újra megindul.

A 9. ábrán látható kísérletben megvártuk, míg 0,1 mM veratrin hatására az izompár mindkét tagján kialakult az oszcilláció. A kontroll izmon tovább folytattuk a regisztrálást, míg az izompár másik tagját változatlanul veratrint



9. ábra. Tetrodotoxin hatásának vizsgálata a veratrinnal kiváltott membránpotenciál oszcillációjára. Alsó görbe: kontroll, felső görbe: az izompár másik tagján a jelzett időben 10^{-8} g/ml TTX-et tartalmazó oldatban tartottuk az izmot, majd TTX-mentes, de változatlanul 0,1 mM veratrint tartalmazó oldatra tértünk át

és 10^{-8} g/ml TTX-et tartalmazó Ringer-oldatba helyeztük. Mint megfigyelhető, az oszcilláció azonnal megszűnt, de a gátló hatás reverzibilis, amennyiben TTX-mentes Ringer-oldatot alkalmazva az oszcilláció újra megindult.

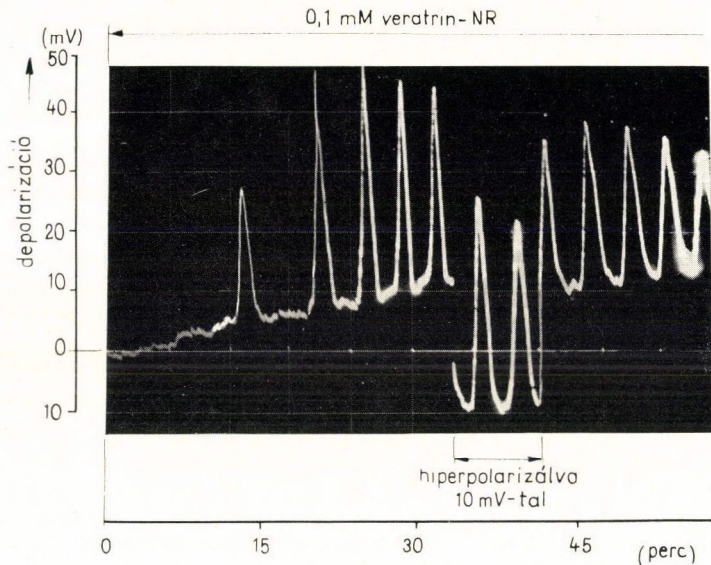
Az ismertetett kísérletek egyértelműen bizonyították, hogy az észlelt ritmikus membránpotenciál változás Na-dependens folyamat. E megállapítás azonban önmagában még nem sokat árul el a mechanizmus háttéréről, hiszen változatlanul elképzelhető, hogy a membránban lezajló folyamatokról van szó, mely többé vagy kevésbé független a sejt anyagsere-változásaitól, ill. közöttük csak közvetett kapcsolat van.

Mindenesetre ULBRICHT (1969) Ranvier-csomón végzett kísérletei alapján elképzelhetőnek látszott, hogy a depolarizáció az elsődleges veratrin-hatás. A membránpotenciál ritmikus tevékenysége esetleg csak másodlagosan alakulna ki, mert a depolarizált membrán labilis egyensúlyi állapotba kerül, s görbéink e változásokat tükrözik.

A 10. ábrán demonstrált kísérletben, midőn veratrin hatására már kialakult a jellegzetes oszcilláció, a vizsgált rostokat 10 mV-tal hiperpolarizáltuk,

azaz a rostok átlagos potenciálértékét alapul véve, megszüntettük a veratrin depolarizáló hatását. Mint az ábrán látható, a membránpotenciál ritmikus ingadozása a hiperpolarizált membránon is változatlanul megfigyelhető volt, ami ellene szól az előbbiekből vázolt feltevésnek.

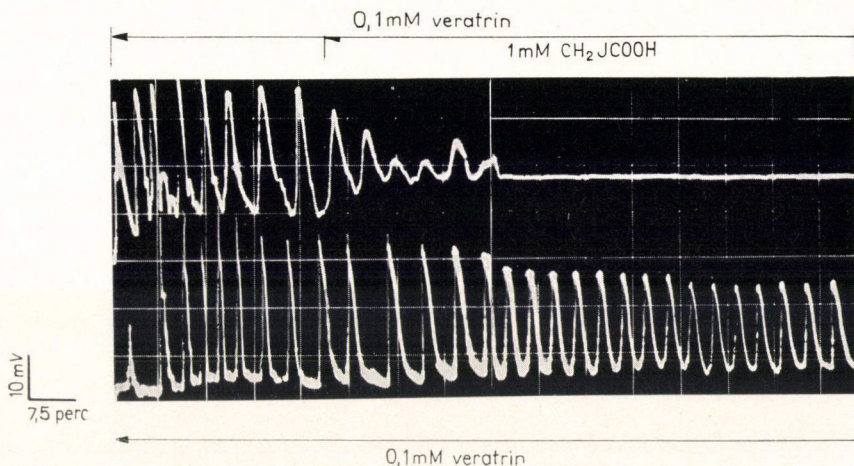
Ezek után vetődött fel az a gondolat, hogy az általunk észlelt ritmikus membránpotenciál változás esetleg a sejt anyagcseréjével áll összefüggésben. E feltevés vizsgálatára olyan gátlószerekkel végeztünk vizsgálatokat, melyek egyrészt képesek áthatolni az izommembránon, másrészt az alkalmazott koncentrációban feltehetően nem változtatják meg a membrán sajátosságait.



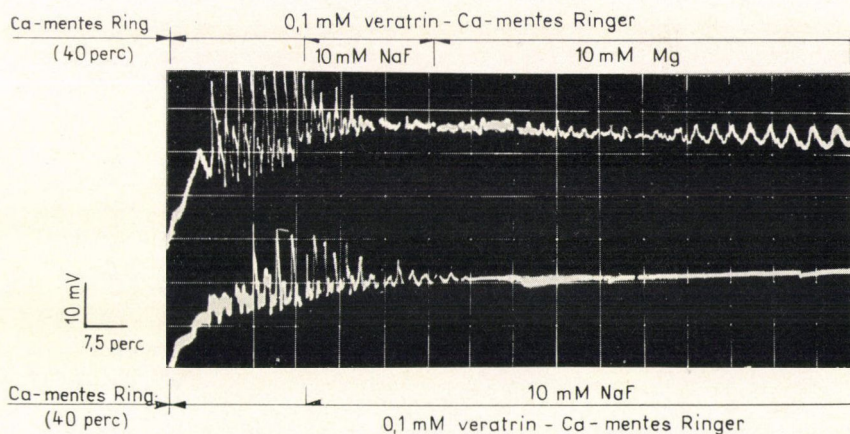
10. ábra. Hiperpolarizáció hatása a veratrinnal kiváltott membránpotenciál oszcillációra. Az ábrán feltüntetett helyen mértékű hiperpolarizációt váltottunk ki, hogy az eredeti membránpotenciálhoz képest a rostok átlagos membránpotenciáljának értéke 10 mV-tal megnövekedett

A 11. ábrán látható, hogy az izompár mindkét tagján jellegzetes oszcilláció alakult ki 0,1 mM veratrin hatására. Ekkor a pár egyik tagját változatlan koncentrációjú veratrin és 1 mM monojódecetsavat tartalmazó Ringerbe helyeztük. A monojódecetsav hatására kb. 25 perc alatt szűnt meg a membránpotenciál ritmikus ingadozása, míg a kontroll izmon csökkent ugyan az amplitúdó, de a ritmikus tevékenység kifejezett maradt.

Mint hogy a monojódecetsav gátló hatása irreverzibilis, következő kísérleteinkben a Na-fluorid gátló hatását tanulmányoztuk, mely irodalmi adatok szerint Mg-mal reverzálható. A 12. ábrán bemutatott kísérletben a szokásostól eltérő módon alakult ki az oszcilláció mindkét izmon, aminek az a magyarázata, hogy az oldat Na-fluorid tartalma miatt a Ringerből ki kellett hagyni a Ca-ionokat, s ezért a depolarizáció hamarabb következett be. Mindenesetre



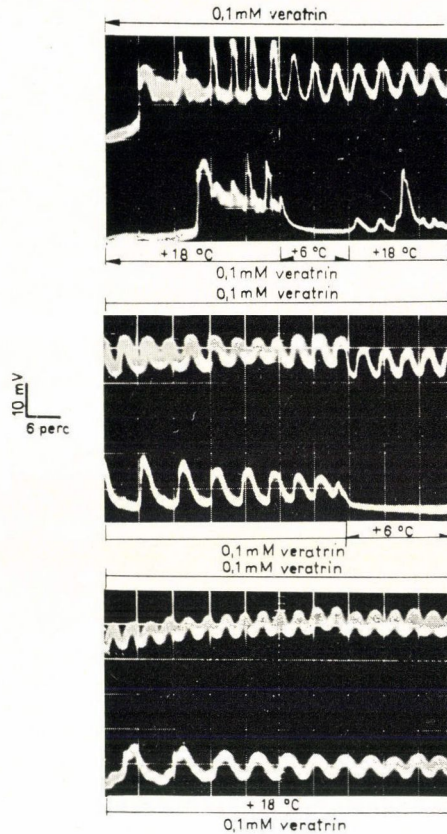
11. ábra. Monojód-ecetsav hatása az izom veratrinnal kiváltott membránpotenciál oszcillációjára. Alsó görbe: kontroll izom, felső görbe: a jelzett időben 0,1 mM monojód-ecetsavat tartalmazó Ringer-oldattal folytattuk az inkubálást



12. ábra. Veratrinnal kiváltott membránpotenciál oszcilláció reverzibilis bénításának vizsgálata. A kísérlet kezdete előtt az izompár mindkét tagját 40 percig Ca-mentes Ringerben tartottuk. A továbbiakban a kísérlet kezdetén 0,1 mM veratrint tartalmazó, Ca-mentes Ringer oldatba helyeztük mindkét izmot. A kísérlet 23. percében, tehát a már kialakult oszcilláció stádiumában, mindkét izmot 10 mM Na-fluoridot is tartalmazó, veratrin-tartalmú, Ca-mentes Ringer-oldatba helyeztük. A kontroll izmon (alsó görbe) további kezelés hiányában a Na-fluorid bénító hatása figyelhető meg. Az izompár másik tagján a Na-fluorid bénító hatásának kifejlődése után 10 mM Mg-ot tartalmazó Ringerrel kezeltük az izmot

az oszcilláció kialakulásakor az izompár mindkét tagját 10 mM Na-fluorid tartalmú oldattal mérgeztük. Az oszcilláció kb. 25–30 perc alatt meg is szűnt mindkét izmon. Ekkor, az egyik izmot kontrollként mérgezett állapotban hagyva, a másik izom oldatát Na-fluorid-mentes, Mg-tartalmú Ringerre cseréltük át, melynek hatására kb. 1 óra múlva újra megindult az oszcilláció.

Mint hogy az előzőekben röviden ismertetett eredményeink megerősítették a ritmikus potenciálingadozások anyagcserétől függő voltára vonatkozó feltevéseinket, a továbbiakban a folyamat hőmérséklet függését vizsgáltuk.



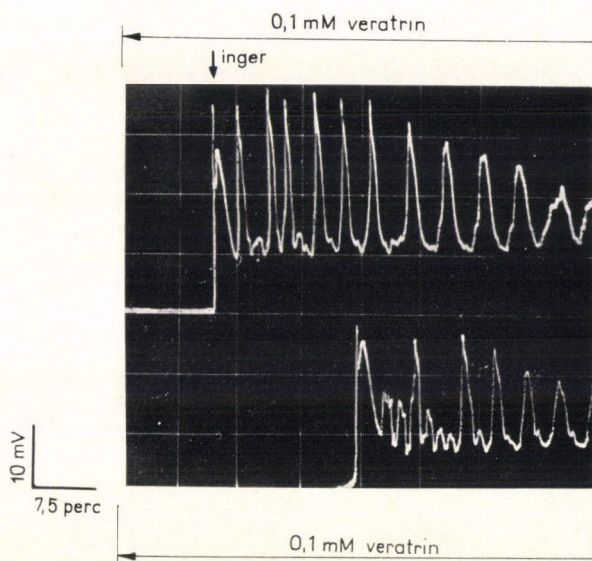
13. ábra. Hűtés hatása a veratrinnal kiváltott membránpotenciál oszcillációra. M. sartorius pár membránpotenciál oszcillációjának folyamatos, extracelluláris regisztrálása 3 órán keresztül. Felső görbe: kontroll izom. Alsó görbe: a jelzett helyeken az inkubáló Ringer-oldatot a megadott hőmérsékletűre cseréltük föl

A 13. ábrán dokumentált kísérletben egy izompár mindkét tagján 0,1 mM veratrinnal 18 °C-on váltottuk ki a ritmikus potenciálingadozást. A felső görbén a kontroll izom 3 órán át regisztrált oszcillációja látható. Az izompár másik tagján két ízben 6 °C-ra hűtöttük le a Ringer-oldatot. Mint látható, az oszcillációs tevékenység mindkét esetben azonnal megszűnt, s részleges repolarizáció következett be. A folyamat reverzibilis volt.

Ilyen irányban végzett 14 kísérletünk azt mutatta, hogy a hőmérséklet változása és az oszcillációs tevékenység közötti összefüggés megközelítően sem lineáris. Ellenkezőleg, 13–14 °C körül találtunk egy olyan kritikus hőmérsék-

let értéket, mely felett a membránpotenciál ritmusos ingadozása — bár csökkent frekvenciával és megnövekedett amplitúdóval — még megfigyelhető, ez alatt viszont teljesen megszűnik.

Végül még egy megfigyelésünket szeretném ismertetni, mely az oszcillációs jelenség triggerelhetőségére utal. A veratrin depolarizáló hatására vonatkozóan ui. egyrészt neurális struktúrákon nyert irodalmi adatok, másrészt



14. ábra. A veratrin membránpotenciál oszcillációjának triggerelhetősége. Alsó görbe: kontroll izom. Felső görbe: a veratrin-kezelés 11. percében egy elektromos impulzust alkalmaztunk

izmon végzett kísérleteink adatai is arra engedtek következtetni, hogy megfelelő ingerrel a depolarizáló hatás triggerelhető. Kérdéses volt, érvényes-e ez a megállapítás a membránpotenciál ritmusos változásaira is. Egy jellemző kísérletünk eredménye látható a 14. ábrán.

A 14. ábrán dokumentált, ill. hasonló kísérleteket ugyancsak izompáron végeztük, de nem egyszerre. A kontroll izmon (alsó görbe) először megfigyeltük, hogy 0,1 mM veratrin hatására mennyi idő múlva alakul ki a membrán oszcillációja. Ezt követően az izompár másik tagját is veratrinnal kezeltük, s a latencia idő különböző periódusaiban egy-egy direkt elektromos ingerrel megpróbáltuk a depolarizáció, ill. oszcilláció kiváltását. A 14. ábrán látható kísérletben pl. a kontroll izom kb. 28 perces latencia idejével szemben a pár másik tagján a 11. percen alkalmazott elektromos ingerrel sikerült megindítani az izom membránpotenciáljának ritmusos változásait. Ezirányú kísérleteink eredményei úgy foglalhatók össze, hogy a latencia idő megfelelő fázisában alkalmazott elektromos inger képes kiváltani a membrán depolarizációját és ritmusos potenciál-ingadozásait.

Az eredmények értékelése céljából legyen szabad rekapitulálni egyes megfigyeléseinket.

1. A membrán veratrin hatására bekövetkező ritmosos potenciálváltozásai órákon keresztül megfigyelhetők, de jellemző az amplitúdó egyenletes csökkenése.

2. A nyilvánvalóan membránjelenségeket érintő beavatkozás — mint pl. TTX-szel való kezelés, vagy a Ringer-oldat teljes Na-tartalmának kolinnal való helyettesítése — néhány percen belül az oszcilláció teljes megszűnéséhez vezet, míg a monojód-ecetsav vagy Na-fluorid oszcillációt gátló hatásának teljes érvényre jutásához átlagosan 20–25 perc szükséges.

3. A glikolitikus oszcillációt irreverzibilisen gátló monojód-ecetsav irreverzibilisen gátolja a membránpotenciál oszcillációját is. Ezzel szemben a reverzibilisen gátló Na-fluorid oszcillációt blokkoló hatása valóban reverzálható Mg-mal.

4. Az inkubáló Ringer-oldat hőmérsékletének kritikus érték alá való csökkentésével a membránpotenciál oszcillációja reverzibilisen megszüntethető.

5. A veratrin-kezelés kezdete és az oszcilláció bekövetkezése között eltelt latencia idő meglepően hosszú, eddig végzett 57 kísérletünk átlagában az izom aneurális részén $17 \pm 7,7$ perc. Az a tény, hogy a latencia idő kezdeti szakaszában alkalmazott elektromos stimulus még nem képes triggerelni a membránpotenciál oszcillációját, csak a latencia idő későbbi fázisában alkalmazott ingerlés, arra enged következtetni, hogy az oszcilláció kialakulásához szükséges feltételek csak bizonyos (perces nagyságrendű) idő alatt alakulnak ki.

Az ismertetett eredmények alapján nagyon valószínűnek látszik, hogy a vázizom membránjának veratrin hatására bekövetkező ritmosos potenciál-ingadozása energiaigényes anyagcsere-folyamat. Természetesen, ha ez a feltevés helyes is, a folyamat elképzelhető a membránban vagy intracellulárisan egyaránt. Minthogy hasonló folyamatot a membrán-anyagcsere, ill. transzport folyamatai között jelenleg nem ismerünk, másrészt a glikolitikus oszcilláció frekvenciája elég jól megegyezik az általunk észlelt potenciálváltozások frekvenciájával, feltételezhetőnek látszik, hogy a membránpotenciál előzőkben leírt ritmosos potenciálváltozásai az intracellulárisan lezajló glikolitikus oszcillációval állnak összefüggésben.

E feltevés ellen szól, hogy a vázizom membránpotenciáljának szabályozását tanulmányozó, rendkívül gazdag irodalom gyakorlatilag csak a Na-pumpa relációjában talál összefüggést a sejt-anyagcsere és a membránpotenciál változásai között. Kérdés azonban, hogy éppen az adott kísérleti feltételek nem teszik-e lehetővé egy ilyen kapcsolat manifesztálódását. Ismeretes ui., hogy veratrin hatására nő az izommembrán Na-permeabilitása, fokozódik a Na-influx, s ez a hatás hosszú időn keresztül fennáll, azaz csökken a Na inaktiválódás. Elképzelhető tehát, hogy éppen a Na-permeabilitás tartós meg-

növekedése az a különleges körülmény, mely lehetővé teszi az anyagcsere-folyamatoknak a membránpotenciál változásaiban való tükröződését. Ebben a relációban talán elsősorban ismét a Na-pumpa működésére lehet gondolni. E feltevés ellen szól azonban az a megfigyelésünk, mely szerint a Na-pumpát biztosan gátló, 10^{-4} M koncentrációjú ouabain-kezelés nem szünteti meg a membrán veratrin hatására létrejövő ritmikus potenciálingadozásait.

A másik kérdés, mely eredményeink alapján felvetődik, hogy az izomrost belsejében a veratrin hatásától függetlenül is lezajló folyamatok következményei válnak-e észlelhetővé a veratrin membrán-hatásai miatt, vagy a veratrin a membrán-hatáson túl befolyásolja az intracelluláris anyagcsere-folyamatokat is, s esetleg éppen a veratrin hatására következik be az anyagcsere-folyamatok oszcillációja.

E kérdéssel kapcsolatban mindenesetre figyelemre méltó PIDEVICH és mtsai (1973) megfigyelése, mely szerint macskák szívének bal kamrájába injiciált veratrin hatására 3 szekundum alatt megnőtt a myocardium NAD-tartalma, s ugyanakkor csökkent a NADH-tartalom. Az a tény, hogy veratrin hatására következetesen megfigyelhető az oxidált NAD mennyiségének növekedése a redukált NADH rovására, elképzelhetővé teszi, hogy a veratrin a vázizom NAD—NADH rendszerét is befolyásolni képes, ami pedig szerves része a glikolitikus oszcilláció folyamatának.

Arra vonatkozóan, hogy a veratrin befolyásolhatja az intermedier anyagcserét, különös figyelmet érdemel GILLES és SCHOFFENIELS (1964) eredménye, mely szerint a veratrin a glikolízist és egyes aminosavak szintézisét a *Homarus vulgaris* izolált idegeiben jelentősen növelni képes.

Eredményeink interpretálása szempontjából ugyancsak figyelmet érdemel SINZ és ISENBERG (1972) megfigyelése, mely szerint a nyugalomban levő izomrostról egy kb. 0,5—1 mV amplitúdójú, kb. 1/perces frekvenciájú ritmikus potenciálingadozás vezethető el. E nyugalomban is meglévő ritmikus potenciálingadozás magyarázatára — egyik lehetőségként — szerzők feltételezik a glikolitikus oszcilláció szerepét. Ezek szerint lehetségesnek kell tartani, hogy nyugalomban levő membránon is megfigyelhető a potenciál ritmikus ingadozása, melyet kísérleti körülményeink között azért látunk lényegesen kifejezettebbnek mint SINZ és ISENBERG, mert a membrán Na-permeabilitásának veratrin hatására bekövetkező fokozódása kifejezettebbé tette a változást.

Végül természetesen felvethető a kérdés, hogy ha valóban elképzelhető az eddig ismerteknél közvetlenebb kapcsolat a membrán transzport-folyamatai és az intracelluláris anyagcsere-folyamatok között, nem sokkal nagyobb-e ezen kapcsolat fiziológiai jelentősége a simaizmokban, melyeknek ritmikus tevékenysége jól ismert. Legyen szabad e kérdéssel kapcsolatban GOLENHOFENRE (1970) hivatkoznom, aki a simaizmok ritmikus tevékenységét tanulmányozva felveti azt a lehetőséget, hogy az intracelluláris anyagcsere-folyamatok ritmikus változásai tükröződnek a membrán ritmikus potenciálválto-

zásában, ill. vonják maguk után a ritmosos mechanikai tevékenységet. Kétségtelen, hogy e feltevés is bizonyításra szorul, de az mindenesetre impresszionáló, hogy a lassú ritmust és a gyors spike tevékenységet sikerült GOLENHOFENNEK különböző kísérleti beavatkozásokkal — pl. anyagseremérgcek, hűtés stb. — elválasztani.

Az elmondottak alapján lehetségesnek látszik, hogy a veratrin segítségével egy olyan modellt sikerült találnunk, melynek tanulmányozása hasznos információkat szolgáltathat az intracelluláris anyagcsere-folyamatok és a membrán-jelenségek közötti kapcsolatok közelebbi megismeréséhez.

IRODALOM

- BOZLER, E.: Conduction, automacity, and tonus of visceral muscles. *Experientia* **4**, 213—218 (1948).
- GESZTELYI, I.: Új módszer béka m. sartorius szeparált neurális és aneurális részének elektro-physiológiai vizsgálatára. Kísérletes Orvostudomány **23**, 455—460 (1971).
- GILLES, E., SCHOFFENIELS, E.: Action de la véatrine, de la cocaine, et de la stimulation électrique sur la synthèse et sur le pool des ascides aminés de la chaîne nerveuse ventrale du homard. *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 525—537 (1964).
- GOLENHOFEN, K.: Slow rhythms in smooth muscle (minute-rhythm). In: *Smooth Muscle*. Ed. by Bülbring E., Brading A. F., Jones A. W., Tomita T. E. Arnold Publ. Ltd. pp. 316—342 (1970).
- HESS, B., BIOTEUX, A.: Control of Glycolysis. In: *Regulatory Functions of Biological Membranes*. Ed. by J. Järnefelt, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam — London — New York pp. 148—162 (1968).
- HODGKIN, A. L., HOROWICZ, P.: The differential action of hypertonic solutions on the twitch and action potential of a muscle fibre. *J. Physiol. (Lond.)* **136**, 17—18P (1957).
- HODGKIN, A. L., HOROWICZ, P.: The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **148**, 127—160 (1959a).
- HODKIN, A. L., HOROWICZ, P.: Movements of Na and K in single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **145**, 405—432 (1959 b).
- HOROWICZ, P.: Influence of ions on the membrane potential of muscle fibres. *Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions*. Ed. American Association for the Advancement of Science. Washington. D. C. (1961).
- KERNAN, R. P.: Resting potentials in isolated frog sartorius fibres at low external potassium concentrations. *Nature* **185**, 471 (1960.)
- PIDEVICH, I. N., BASAEVA, A. I., VYNLYKH, M. F.: Influence of veratrine on NAD and NAD·H₂ content in the myocardium. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **75**, 58—59 (1973).
- SINZ, R., ISENBERG, G.: Minutenrhythmische Spontandepolarization des Ruhe-Membranpotentials von Skelettmuskelfasern. *Acta Biol. Med. Germ.* **29**, 247—257 (1972).
- ULBRICHT, W.: The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. und Exp. Pharmakologie.* **61**, 17—71 (1969).