

# I. NEUROBIOLÓGIAI KOLLOKVIUM ELEMI NEURONÁLIS MECHANIZMUSOK

Tihany, 1974. augusztus 22—24.

## NEURONÁLIS INGERÜLET

**A membrán ingerületi folyamatainak fizikai-kémiai modellezése. Az ingerület nem elektromos jelei**

FEHÉR OTTÓ

JATE Összehasonlító Élettani Tanszéke, Szeged

Mindenkiben, aki hosszabb időt töltött oszcilloszkóp vagy elektroenkefalográf előtt az idegrendszer tevékenységének vizsgálata közben, óhatatlanul feltámad a gondolat, hogy az elektrográfias jelek mélyebben fekvő életfolyamatok megnyilvánulásai. Ez legalább két viszonylatban igaz: míg egyrészt az elektromos potenciálingadozások komplex agyi struktúrák működését tükrözik, a legegyszerűbb bioelektromos jelenségek a nyugalmi és akciós potenciál, továbbá a lokális potenciálok viszont az idegsejtműködés legelemibb folyamatainak hírnökei.

A Hodgkin—Huxley-féle ionteória a bioelektromos jelenségek eredetére nézve ma már pontos, ha nem is minden vonatkozásban kimerítő választ ad. Posztulál azonban ez az elmélet néhány olyan membrán permeabilitás változást, mely sine qua non-ja az ionmozgásoknak, de amelyek természetére és mechanizmusára már az ultrastruktúra-kutatástól várja a választ. Ezért vált a membránszerkezet és — funkció kérdése az utóbbi évtized ultrastruktúrális és biofizikai kutatásainak központi problémájává.

Előadásomban az ingerlékeny membránok kutatásának két fő irányával foglalkozom; összefoglaló képet adok először a membránmodellek és az iontranszportáló anyagok vizsgálata terén elért fiziológiai szempontból legfontosabb eredményekről, másodsor, az ingerületi folyamat kapcsán fellépő nem elektromos jelenségekről, főként óriás axonokon végzett kísérletek alapján.

### *A lipid kettős-rétegekről*

A lipid kettős-rétegek leggyakrabban szolgálnak a biológiai membránok modelljéül. Ennek alapja az, hogy a biológiai membránok felépítésében számottevő hasonlóságok vannak. Így vastagságuk kb. 70 Å. Összetételük fehérjéket és lipideket tartalmaz, különböző anyagok behatolásával szemben barrièrre-t képeznek és megvan az a képességük, hogy felgöngyölődjenek vezikulákká és réseket zárjanak el. Ezen hasonlóságok mellett vannak jelentős és specifikus különbségek is.

A membránpermeabilitás jelenségeit több típusba sorolhatjuk. Az egyszerű permeáció pusztán azon múlik, hogy az oldott anyagok megoszlási

hányadosa milyen arányban van a vizes és lipid fázisokban, illetőleg milyen gyors a diffúzió a lipid fázisban. A facilitált diffúzió már vivőanyagokat vagy pórusokat tételez fel, itt már találkozunk a telítődés és a kompetíció jelenségeivel.

Még bonyolultabb a kapcsolt vivőanyag transzport, mely egyszerre két anyag átviteléről gondoskodik a membránon. Az egyik a koncentráció gradiensevel szemben, a másik az elektrokémiai gradiense mentén vándorol. Végül van a primer aktív transzport, ami energiafelhasználás mellett zajlik le. Ilyen pl. a cukrok átvitele, akár bakteriális, akár emlős sejtmembránon.

### *A lipid kettős-réteg tulajdonságai*

A lipid kettős-réteg, melyet először MÜLLER és RUDIN (1967) tanulmányozott részleteiben, igen sok általános tulajdonságát hordozza a membránoknak. Struktúrája igen variábilis, könnyen változtatható és sok olyan szerkezeti változás előidézhető benne, amelyek a biológiai membránokban természetes körülmények között lezajlanak.

Lipid membrán készítésének legegyszerűbb módja az, hogy két vizes fázis között létesített nyílás mentén lipid keveréket kennek szét és ily módon egy kb. 50 Å vastagságú lipid réteg keletkezik a két vizes fázis között, míg a lyuk szélén csepp vagy tömegszerű formában marad meg az anyag. Az ilyen lipid kettős-rétegben a lipidek poláris csoportjai a vizes fázis felé néznek, a szénhidrogén láncok pedig meglehetősen rendezetlenül, quasi folyékony állapotban a membrán belsejében helyezkednek el. A rendezetlenség itt nagyon lényeges momentum, mert ez biztosítja a membrán folyékonyságát, ill. plaszticitását. A szénhidrogén láncok rendszerint nem teljesen egyenesek, bennük törések, cisz-, transz-állapotok fordulnak elő és ez lehetetlenné teszi, hogy itt egy szorosan egymásmellé simuló struktúra jöjjön létre. Ezenkívül rendszerint jelen vannak a lipid membránban koleszterin, tokoferol vagy tetradekán molekulák, amelyek stabilizálják a membránt. Az ilyen membránok meglehetősen ellenállóak mechanikai erőkkal szemben; elszakításuk jelentős aktivációs energiát igényel. Minél merevebb a membrán, annál könnyebben elszakad. Ha egy ilyen lipid kettős-réteget kinagyítva képzelünk el, akkor egy 1 mm-es és 70 Å vastagságú membránt egy vékony papírrétegnek kell elképzelni, melynek átmérője kb. 10 m.

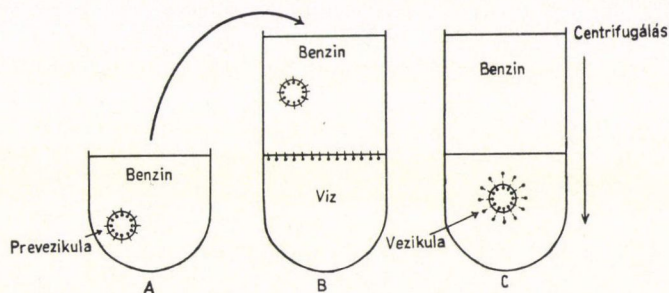
Igen érdekes képessége a biológiai membránoknak a vezikulaképzésre való képesség. Ebben a lipidmembránok látszólag különböznek a természetes membránoktól, mert ha egy lipidmembránt elszakítunk, akkor annak részecskéi csatlakoznak a nyílást körülvevő csepp fázishoz. Ez érthető a lipidek felületi feszültségéből. A természetes membránoknak nem felületi feszültsége, hanem ún. *kontúr* feszültsége van, ami azt jelenti, hogy mikor a membrán elszakad, ez törekszik a legkisebb kontúr (szabad szél) kialakítására. Tekintettel

azonban arra, hogy a membrán vastagsága adott, a kontúr csökkentésére nincs más mód, mint hogy az elszakadt membrán szélei egymással kapcsolódnak és háromdimenziós képlet, a vezikula áll elő, melynek molekulái között a vonzási kölcsönhatás maximális. Ez egyszersmind az elszakított membrán számára a lehető legkisebb felületet jelenti. Ebben találhatjuk meg a magyarázatát a membránok vezikulaképzésre való hajlamának.

A lipidmembránok előállítására az eddigieken kívül más módszerek is lehetségesek. PAGANO és THOMSON (1967) módszere hasonló a szappanbuborék-képzéshez. A lipid oldatot felszívják egy pipettába s előlött egy vizes fázist hoznak létre. Ha most kifújják az egészet víz alá, akkor nagy buborékok keletkeznek, melyek belsejét vizes fázis alkotja, külsejének nagy részén pedig lipid kettős-réteg foglal helyet. A lipid egy része cseppfázisban a buborék felső részén foglal helyet. Ilyen buborékok szuszpenzióban tarthatók, ha pl. szukróz gradiensebe fújják bele őket. Ebből a buborékok kiszívhatók, átvihetők másik oldatba és mikroelektrodokkal megsűrűsítők. A buborékok permeabilitása jelzett ionokkal szemben mérhető még elektromos áram jelenlétében is.

Mivel a lipid kettős-rétegeket meglehetősen nehéz összehozni fehérjékkel, ezért TSOFINA (1966) és mtsai kidolgoztak egy olyan módszert, amelyben a lipid kettős-réteghez már fehérjéket is tudtak csatlakoztatni. Ennek módszere a következő. Lipid egyes-réteget hoznak létre heptánban oldott foszfolipid és vizes fehérje oldat között. Ha most a heptánba óvatosan belecseppentenek egy vizes fehérje oldatot, akkor e csepp felületén szintén foszfolipid egyes-réteg keletkezik. Ha most ezt a cseppet óvatosan közelítik a heptán és az edényben levő fehérjeoldat határretegéhez, akkor egy lipid kettős-réteg keletkezik, melynek két oldalán fehérje foglal helyet. Annak mértékét természetesen nehéz megállapítani, hogy az ilyen lipid kettős-réteg tartalmaz-e fehérjét.

Igen érdekes TRÄUBL és GRELL (1970) módszere. (1. ábra.) Ebben az esetben fehérjét tartalmazó lipid kettős-réteggel borított vezikuláshoz képződ-ményeket, cseppeket hoznak létre. Foszfolipid benzines oldatába cseppentenek fehérje tartalmú oldatot. Ezt ultrahanggal besugározzák és ilyen módon 400 Å nagyságú fehérjecseppecskék keletkeznek, melyek felszínén lipid egyes-réteg



1. ábra. Lipid kettős-réteggel borított mikrovezikulák készítése. (Magyarázatot l. a szövegben) (TRÄUBLE és GRELL 1970)

található. Most ezt átviszik egy olyan benzín fázisba, amely alatt vizes fehérje oldat van. Ehhez a benzín fázishoz adnak további foszfatidilkolint hozzá úgy, hogy a benzín és a vizes fázis között szintén egyes-réteg foglal helyet. Ha most a benzínben levő fehérjecseppecskéket, melyeket lipid egyes-réteg borít, magas fordulatszámú centrifugálással beviszik az alul helyet foglaló vizes fázisba, akkor a lesüllyedő vezikulák magukra veszik a benzín és a vizes fázis határán levő egyes lipid réteget is és ilyen módon fehérjét tartalmazó, lipid kettős-réteggel borított ún. prevezikulák állíthatók elő. Nagy előnye ennek a módszernek, hogy egyrészt a fehérjetartalom változtatható, másrészt aszerint, hogy a fehérjeoldatba milyen lipidet tesznek, a lipid kettős-réteg aszimmetrikussá is tehető.

Bármilyen módon készítik is a lipid kettős-rétegeket, ezek tulajdonságai jól tanulmányozhatók. Vízzel szembeni permeabilitásuk meglehetősen nagy. A víz oldékonysága szénhidrogénekben  $10^{-3}$  mol körüli. Az oldott víz állapotáról azonban közelebbi adataink nincsenek. A többi anyag a lipid kettős membránokon annak arányában hatol át, hogy mekkora a megoszlási hányadosa a víz és a szénhidrogén között. Rendkívül nagy a lipidmembránok ellenállása anionokkal és kationokkal szemben. A lipid kettős-rétegek elektromos ellenállása rendkívül magas, ionokkal szemben  $10^8$  ohm/cm<sup>2</sup> körül van.

LÄUGER (1967) fedezte fel, hogy a jodid ionok meglehetősen könnyen áthatolnak lipid kettős-rétegeken, különösen akkor, ha elemi jód van jelen. Ennek valószínű oka az, hogy az elemi jód a jodid ionokkal  $J_3$ — $J_5$  komplexeket képez, melyeknek csak egy negatív töltése van és ily módon a nagyobb tömegre eső kisebb töltés révén megkönnyebbedik a jód áthatolása a lipidmembránon.

A lipid kettős-réteg vastagságában, elektromos kapacitásában és víz-permeabilitásában nagyon hasonlít a reális membránokhoz. Elektromos kapacitás  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  körül van.

Igen érdekes analógiát tárnak fel a lipid kettős-rétegek és a természetes membránok között az ún. proton átvivők, vagy proton hordozó anyagok. A mitokondrium membrán funkciójára nézve van egy olyan teória (Mitchell), mely szerint a mitokondriumok membránja egy speciális elektrontranszportáló rendszerrel rendelkezik. Ez a rendszer elektronokat transzportál a mitokondrium belsejéből kifelé, ami azt eredményezi, hogy a mitokondrium belsejében a hidrogénion koncentráció nő, tehát az OH-koncentráció csökken. Mitchell ezt tartja az ATP szintézis egyik alapfeltételének. Ha most a mitokondriumokhoz 2—4 dinitrofenolt ad, akkor az oxidatív foszforiláció és az ATP szintézis szétkapcsolódik. Egyszersmind azonban a mitokondrium membránnak megnő a proton permeabilitása, ami azt jelenti, hogy a membrán két oldalán létrejött pH differencia kiegyenlíthető. Igen érdekes, hogy a dinitrofenol ezt a proton permeabilitás fokozódást lipid kettős-rétegeken is előidézi. Ugyanakkor megnő a szétkapcsoló ágenssel szembeni permeabilitás is.

### *Az alkáli ion vivőanyagok*

Az ingerület és a vele kapcsolatban történő ionmozgások alapvető problémája az, hogy hogyan történik meg a Na- és K-ionok gyors kicserélődése, illetőleg az ingerületet követően a Na-ionok kipumpálása. Erre vivőanyagokat és pumpák létezését tételezik fel, melyeknek közös problematikus vonása az, hogyan képesek ezek a kis monovalens ionokat, mint amilyen a Na és K, megkülönböztetni kisebb és nagyobb homológjaiktól. Már korábban felfedeztek bizonyos antibiotikumokat, amelyek specifikusan képesek kötni K-ionokat és átvinni azokat természetes és mesterséges membránokon. Ennek a jellegzetes átvivő szerepnek a mechanizmusáról beszélek a következőkben.

Meglehetősen nagyszámú anyagot találtak az utóbbi évtizedben, melyek specifikusan képesek kötni alkáli ionokat. Kémiai struktúrájuk szerint ezek két csoportba oszthatók.

1. *Neutrális makrociklusos vegyületek.* Ezek neutrális pH-nál nem viselnek töltést, a vivő molekula ezért elektromos mezőre csak a hozzá kapcsolódó alkáli ion révén reagál. Molekulasúlyuk közepes és a molekulák elég nagyok ahhoz, hogy egy alkáli iont hidrofób burokkal körülvegyenek. Összetételük meglehetősen különböző. Találunk közöttük oligopeptideket, mint a gramicidin, oligodepszipeptideket, mint a valinomicin és az enniatinok, és más ciklikus szerkezetűeket, pl. egyszerű poliétereket, vagy az ún. makrotetrolideket. Világos, hogy hasonló struktúrákat képezhetnek fehérjemolekulák is. Ismeretes egyébként, hogy bizonyos enzimek képesek kötni Na-mot és K-t egészen szelektív módon. A fentebb felsorolt vegyületek molekulasúlya azonban a fehérjéknél jóval kisebb.

2. *Töltött nyílt szénláncú vegyületek.* Ezek lineáris struktúrája meglehetősen különbözik, de közös az, hogy karboxil csoportjuk van, így neutrális pH tartományban a szabad molekulák negatív töltésűek. A karboxil csoport azonban nem szükségképpen szerepel a koordinatív kötésben a fémionnal. Sokkal inkább úgy képzelhető el ez, hogy hidrogén kötések keletkeznek a hidroxilcsoportokhoz, a lineáris struktúra másik végéhez és ezáltal ciklikus konfiguráció jön létre. Molekulasúlyuk kb. azonos az előző csoportéval. Közös vonása mindegyik vivőanyagnak, hogy egy sereg poláris liganddal rendelkeznek, amelyek többszörös kapcsolatot tudnak létesíteni egy alkáli ionnal. A molekula egésze azonban hidrofób kell hogy legyen és így könnyen penetrál lipid membránokon. Vízoldhatóságuk természetesen igen csekély.

A különböző fémionokkal alkotott komplexek erősségét a disszociációs vagy komplex stabilitási konstansokból lehet lemérni. Ezeket rendszerint metilalkoholban mérik, ami ilyen szempontból lényegesen jobb oldószer, mint a víz. Ezekből a konstansokból kiderül, hogy az egyes anyagok feltűnően nagy komplex stabilitást mutatnak egy bizonyos kiválasztott ionféléssel, habár ez nem mindig áll arányban a membránokon való átvitel sebességével.

Mindezek ellenére igen fontos közös jellemzője ezeknek az anyagoknak, hogy ion-nagyság-specifitást mutatnak, azaz egy bizonyos rádiusznál kisebb és nagyobb sugárral rendelkező ionokkal szemben lényegesen kisebb affinitást tanúsítanak. Ez arra mutat, hogy itt nem egyszerűen elektrosztatikus vonzásról van szó, hanem bonyolult sztérikus viszonyok egybeeséséről.

Bizonyosnak látszik, hogy a speciális ionkötő képességért nem az ion saját elektronszerkezete felelős, mint az a nikkell és a réz ionok esetében van, hiszen a Na- és K-ion esetében egy nemesgázszerű elektron struktúrával állunk szemben. A kötést meghatározó tényezőként ezért az ion nagyságát, töltését és a vivőanyag térbeli struktúráját kell tekinteni.

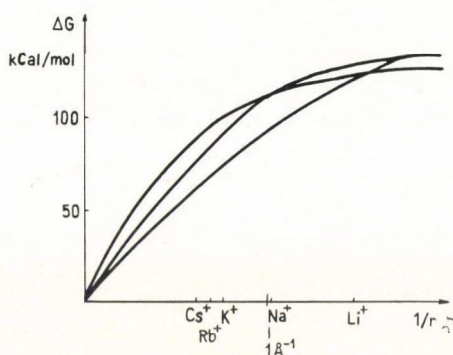
A komplex képződés úgy képzelhető el, hogy a hidratált ion a belső hidratációs burok több vízmolekuláját elveszti és helyébe a vivőanyag ligandjai lépnek. Itt két eset lehetséges: vagy erősebb a ligandokkal képezett kötés, mint a hidratációs vízzel alkotott kapcsolat vagy gyengébb. Első esetben a kötés a kisebb ion irányában nagyobb lesz és a komplex a fémion rádiuszának növekedésével labilisabbá válik. A másik esetben a nagyságfüggés megfordul, itt a komplex stabilitása a nagyobb molekulák felé szilárdul meg.

Amint az alkáli ion átmérője csökken, a vivőanyag ürege képes összehúzódni. Ennek határát az szabja meg, hogy a molekula deformációja csak bizonyos határok között lehetséges: a vegyértékszögek nem engednek korlátlan alakváltozást, másrészt a ligandok között kölesönös repulzió lehetséges. Ennélfogva minden vivőmolekula bizonyos nagyságú ionnal szemben mutat maximális kötést. Ezt ábrázolja a Táblázat mely néhány antibiotikum stabilitási konstansait foglalja össze K- és Na-ionokkal szemben.

Táblázat

Vegyület	Oldószer	Anion	Komplex-képződési állandó	
			Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Monaktin	MeOH	SCN <sup>-</sup>	$1,4 \times 10^3$	$3,2 \times 10^5$
Valinomicin	MeOH	I <sup>-</sup>	$1,2 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$

A folyamat lényegére nagyon jól rámutat a 2. ábra. Ennek ordinátáján a szabad energiaveszteség van feltüntetve kcal/mol-ban, abszcisszáján pedig a reciprok ionrádiusz. Az alsó vonal a szolvatáció, tehát a vízburok megkötés kapcsán fellépő szabadenergia-változásokat mutatja, míg a két felső, enyhén hiperbolikus görbe két különböző anyag komplex képzési képességének változását mutatja. Mindhárom görbe a kisebb ionrádiuszok irányában monoton növekvő. A chelát képzés szempontjából azonban nem a szabadenergia változás abszolút nagysága, hanem a chelát képzés és a szolvatáció szabadenergia veszteségei közötti különbség lesz a döntő. Ahol ez a legnagyobb, ott bizonyos ionrádiusznál komplex stabilitási maximumot fogunk kapni. Ha ehhez hozzá-



2. ábra. A solvatáció (alsó görbe) és a chelátképződés (két felső görbe) szabadenergiájának függése az alkáli ionok reciprok ionrádiusától (DELBRÜCK, 1973)

vesszük, hogy a K- és Na-ionok solvatációs energiái között 20 kcal/mol különbség van, és hogy 1,4 kcal/mol energiakülönbség a kötődési konstans tízszeres változását eredményezi, fogalmat alkothatunk arról, milyen nagy kötési erők szerepelhetnek az ionkötésben.

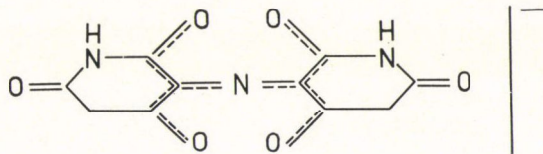
Igen nagy stabilitási konstansokat tapasztaltak alkáli földfém ionok (Ca, Mg) esetében is. Ezek solvatációs energiája lényegesen nagyobb mértékben különbözik, így a chelát képzésben még erősebb specifitások tapasztalhatók

A ligand képződés sebességi konstansa, tehát az az idő, amely alatt egy hidratációs vízmolekula egy liganddal helyettesítődik,  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  mp-nek adódott. Ez teljes mértékben összeegyeztethető a vívőanyag szerepkörével.

#### Az alkáli fém-ion komplexek kísérletes tanulmányozása

Ilyen vizsgálatokra a metanol sokkal jobb oldószernek bizonyult, mint a víz. Különösen azért, mert metanolban a hőmérsékleti ugrás (temperature jump, T-jump) módszere sokkal könnyebben alkalmazható.

A fémion komplexek indikátoraként murexidet alkalmaztak. A murexid abszorpciós maximuma  $527 \text{ m}\mu$  körül van, a Na murexid komplexé  $485 \text{ m}\mu$ -nál. Ahogyan a murexid Na ionokkal telítődik, az abszorpciós maximum fokozatosan tolódik el.



Murexid

A fémion komplexet a központi N körüli oxigének képezik. A komplex kötődéssel kapcsolatos abszorpciós maximumváltozás valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a két gyűrű egymáshoz viszonyított helyzete megváltozik. A ligandképzés terén a murexid ugyanazon viselkedést mutatja, mint a vivőanyagok. Stabilitási maximumok a Na és Ca esetében vannak.

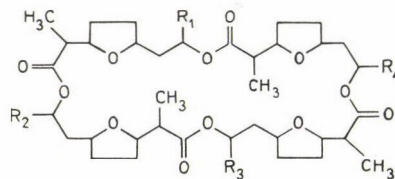
A komplex képződés sebességi konstansai  $10^{-9}$  sec nagyságrendűek, ami azt jelenti, hogy Na, K, Li, és Ca esetében a sebességkorlátozó faktor a diffúzió. Mindezen körülmények a murexidet ideális indikátorra teszik.

#### A Na-monaktin komplex vizsgálata

A monaktin egy antibiotikum, mely aktinomicétákból izolálható. Kémiai szerkezetét néhány más rokonvegyülettel együtt a 4. ábra mutatja. A röntgen struktúra vizsgálat arra utal, hogy a fémiont 8 oxigén veszi körül kockaszerű elrendezésben (5. ábra). Így a hordozóanyag molekulája fölsavarodik, mint a teniszlabda varrata. Az összes poláris csoportok ily módon a képződött üreg belsejében vannak, és elegendő helyet hagynak a fémion számára. A K stabilitási konstansa monaktin esetében a legnagyobb, a Na-ét 230-szorosan haladja meg. A Li nem képez vele komplexet, a Rb és Cs a K-énál szintén sokkal gyengébben kötődik.

A vivőanyag és az ionok között kialakuló egyensúlyt a T-jump technikával vizsgálják. Joule-féle hőhatással vagy rövidhullámú besugárással ugrás-szerűen megváltoztatják az oldat hőmérsékletét, akár 2—3 fokkal is, és miközben megváltozik a disszociáció mértéke, mérik a fényabszorpció változását.

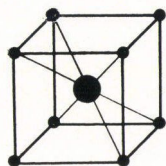
Az ilyen jellegű mérések azt mutatják, hogy az ion specifitás kizárólag a vivőanyag tulajdonsága, és nemcsak membránban, hanem homogén oldatban is érvényesül. A molekula telítődése az ionokkal mikroszekundumok alatt megtörténik. Így hasonló gyorsasággal működő vivőanyagok bármely gyors ingerületi folyamatban betölthetik szerepüket.



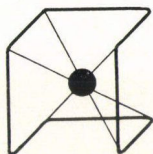
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{CH}_3$	<b>Nonactin</b>
$R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$	$R_4 = \text{C}_2\text{H}_5$ <b>Monactin</b>
$R_1 = R_3 = \text{CH}_3$	$R_2 = R_4 = \text{C}_2\text{H}_5$ <b>Dinactin</b>
$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = R_3 = R_4 = \text{C}_2\text{H}_5$ <b>Trinactin</b>

4. ábra. A makrotetrolidek szerkezete (DELBRÜCK, 1973)

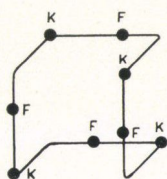






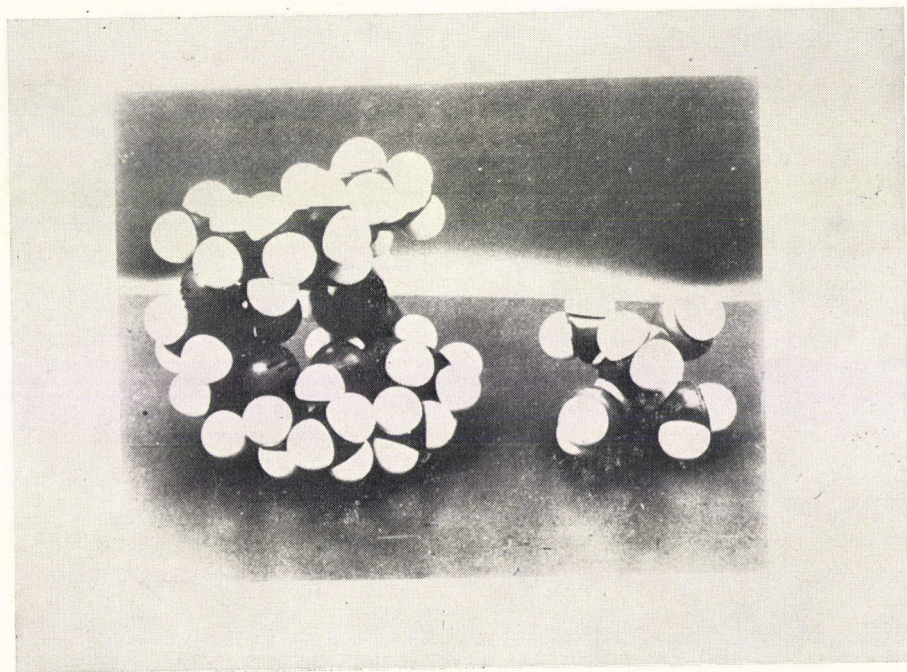
Hexaéder formula



Tenislabdavarrat

Keto = Furan = 

5. ábra. A) Az alkáli fém ion beilleszkedése a monaktin molekula tenislabdavarrat-szerűen felgöngyölödő molekulájának üregébe



B) Baloldalt a monaktin molekula modellje, középen egy dehidratált K-ionnal; jobboldalt egy hidratált K-ion modellje (EIGEN és WINKLER 1970)

Hogyan képzelhető mármost el az alkáli ion beilleszkedése a vivőanyag molekulába? Az összes hidratációs víztől való megszabadulás egyszerre túl sok energiát venne igénybe, így valószínű, hogy az ion „levetkőztetése” fokozatosan megy végbe, vízmolekulánként  $10^9$  sebességgel. Így jön ki a  $3 \times 10^8$ /mol  $\times$  sec összeg sebességi konstans. Ez csak egy nagyságrenddel kisebb, mint a diffúzió által kontrollált folyamat. Alkáli ion távollétében a teniszlabdaszerű felgöngyölődés megszűnik, a vegyület gyűrű alakúvá válik, ligandjai hidratációs vizet vesznek fel.

Ha végül összegezzük az alkáli ion vivőanyagok tulajdonságait, a következő vonásokat kell kiemelnünk.

1. A vivőanyag molekulán elektrofil csoportoknak kell lenniük, melyek kompetícióban vannak a szolvatációs vízzel, a fémionokért. Ezek a csoportok egy lipofil vegyületbe vannak beágyazva, mely a membránban jól oldódik.

2. A hidratációs víz molekulái helyettesítődnek a vivőanyag molekula koordinációs kötéseivel. Két ion kötéserősségbeli különbsége nagyjából egyenlő a szolvatációs energiák különbségével.

3. A vivőanyag molekula üreget képez a transzportált fémion számára. Optimális illeszkedés akkor történik, ha a chelát képződés és a szolvatáció energiája között a különbség a legnagyobb. Ez gyakran egybeesik az optimális geometriai elhelyezkedéssel is. Az üregképzés korlátait a ligandok közötti repulzió és a chelát sztérikus fixációja jelenti.

4. A vivőanyag molekulának kellően flexibilisnek kell lennie ahhoz, hogy a hidratációs víz fokozatos helyettesítése közben változtassa alakját. Ha az ion előzetes részleges vagy teljes deszolvatációja lenne szükséges ahhoz, hogy be tudjon csúszni az üregbe, a reakció igen lassú lenne.

Mindeme tulajdonságok együttese nagymértékben kedvez a biológiai rendszerekben való szereplésnek.

Másik érdekes kategóriája az anyagoknak — szintén antibiotikumok — melyek az ionpermeabilitást fokozni képesek, az ún. *lyukszűrő* (hole punching) anyagok csoportja. Ezek rendszerint ciklikus antibiotikumok, amelyeknek egy polién lánca van, de a másik része a gyűrűnek igen hidrofil. Hatásuk mind természetes membránokon, mind lipid kettős-rétegeken koleszterin jelenlétéhez van kötve a membránban. A nystatin és amphotericin B került eddig részletesebb vizsgálat alá. Ezek az anyagok szintén növelik a lipid kettős-réteg vezetőképességét, de hatásuk az ion vivőanyagokétól sok tekintetben eltér. Ezek az anyagok a membrán mindkét oldalán jelen kell hogy legyenek. A konduktancia növekedés az anyag koncentrációjának nagyon magas hatványától függ. A konduktancia anionokkal szemben fokozódik és ezzel kapcsolatos a vízpermeabilitás megnövekedése is. Az anionok konduktanciája nagyságuktól függ. A vezetőképesség fokozódás magas negatív hőmérsékleti koefficienssel rendelkezik, ellentétben az ion átvivőanyagokéval.

Ha egy lipid kettős-réteghez ion átvivőanyagot és lyukszűrőt egyaránt hozzáadunk, akkor a hőmérséklet változtatásával lehetővé válik az átkapcsolás, pl. K-ion permeabilitásról valamilyen anion permeabilitásra.

*Nyitó-záró anyagok.* Ezek közös jellemzője, hogy ha lipid kettős-rétegekkel társulnak, akkor a ráadott feszültségtől függően néhány nagyságrenddel nagyobb konduktanciát idéznek elő. Ez a konduktancia kationokkal szemben áll fenn, de anionokra is kiterjeszthető, hogyha protamin, polilizin vagy spermin szerű polikationokat adunk hozzá. Ezek közé tartozik egy fehérje, amelyet MÜLLER és RUDIN *EIM-nek*, azaz ingerületkeltő anyagnak nevezett el, továbbá az alameticin. Az EIM egy fehérje, amelyet az *Enterobacter cloacae* produkál, az alameticin pedig egy ciklikus peptid, ami 19 aminosavat tartalmaz. Kémiai szerkezetük még nem nagyon ismert. Ha kellően variáljuk a ráadott feszültséget, a sógradienseket és a polikation adalékanyagokat, az axonmembrán sok jellegzetes elektromos jelenségét sikerül utánozni, mint amilyen a nyugalmi potenciál, akciós potenciál és ritmikus kisülések. A jelenség molekuláris mechanizmusa nem ismert. Igen fontos kérdés az, hogy a hirtelen átmenetek a nem vezető, és vezető állapotok között egy széles skálán megnyilvánuló kooperációt árulnak-e el, mint amilyen pl. az egész membrán fázisbeli megváltozása. Lehetséges, hogy oligomérek mikroszkopikus nagyságrendben történő konformáció változásairól van szó. Utóbbi mellett szól az a megfigyelés, mely szerint EIM hozzáadása kvantálható módon növelte a konduktanciát, ennek kapcsán minden kvantum kb.  $4 \times 10^{-10}$  reciprokon Ohm konduktancia fokozódást okoz. Ez úgy értelmezhető, hogy az EIM egy vagy néhány molekulája kontrollál bizonyos pórusokat, amelyek adott alkalommal felnyílnak.

### Megoldandó problémák

1. Milyen gyors a töltődés és a disszociáció, ha a vivőanyag-molekula a membránban ül és az egész folyamat egy határfelületen zajlik le?

2. Mi a korlátozó faktora egy ilyen transzportfolyamatnak természetes és mesterséges membránokban?

3. Mik a vivőanyagok az idegmembránban?

4. Hogyan tudja egy elektromos mező be- és kikapcsolni a folyamatot, és hogyan kapcsolódhat az egész egy pumpához, ami aktív transzportot végez?

Az első és második kérdés megválaszolható mesterséges membránokon relaxációs spektrometriával végzett kísérletek útján. Ilyen módon az összes konstansokat meg lehet állapítani. Olyan vezikulapreparátumokon, melyek készítését az előbbieken vázoltuk, a kérdés megoldható.

A harmadik kérdés a leglényegesebb. A vizsgált vivőanyagok antibiotikumok. Nem tudjuk, hogy természetes helyükön vivőanyagfunkciót töltenek-e be.

A negyedik kérdés a neurobiológiát egészen közelről érinti. A vivőanyag kis molekula kell hogy legyen, mely kapcsolva lehet egy alloszterikus fehérjével, a pumpa mechanizmus egyik résztvevőjével. A transzportot egy membránfehérje vagy valamely bonyolult struktúra facilitálhatja.

### Az ingerület nem elektromos jelei

#### *Az optikai spike*

Mire a cambridgei iskola befejezte az akciós potenciál ion alapjának tisztázását, az akciós potenciál alatti struktúra-változásokra nézve még csak az első kísérletek történtek. A mechanikai tulajdonságok, a kettőstörés, a festékkötődés, a fényszóródás mind a késői negyvenes években kerültek előtérbe.

D. K. Hill éppen a fényszóródást vizsgálta békaizmon, amikor Keynes azt tanácsolta neki, hogy ugyanezt a készüléket használja fel a rákideg fényszórásának vizsgálatára. HILL és KEYNES (1949) rövid idő alatt kimutatták, hogy, ha ingerlik a rákideget, Ringer-oldatban 50 cps-sel 5 mp-ig, ez egy fényszórásbeli növekedést idéz elő, ami az ingersorozat alatt és után nyilvánult meg. HILL (1950) később azt találta, hogy tengervízben nem a fényszórás növekedése, hanem csökkenése áll elő. Ezt később többen megerősítették és kiterjesztették velőhüvelyes idegre. Egyes eseteket kivéve azonban nem volt lehetséges mérni a változást egyetlen inger után. Még ilyen esetekben is a fényregisztrálás válaszideje annyira hosszú volt, hogy a fényszórásbeli változás időbeli lefutása nem volt pontosan meghatározható. Tizenöt évvel később jelátlagolót használtak az érzékenység megnövelésére, és lehetséges volt a fényszórási változások időbeli lefutásának meghatározása egyes ingerek után is a rákidegen (COHEN és KEYNES 1967). Noha ez a kísérlet abban az időben ígéretesnek látszott, azonnal felismerték, hogy az interpretációja meglehetősen bonyolult, mivel nem lehetett megfelelően mérni a rákideg komplex akciós potenciálját. Úgy tűnt, hogy az egyetlen kiút olyan preparátumok akciós potenciáljának és optikai változásainak összevetése lehet, mint a tintahal óriásaxon, vagy az elektroplax, ahol az akciós potenciál időbeli lefutását könnyen meg lehetett határozni.

Az a tény, hogy a perfundált óriásaxon lényegében normálisan terjedő ingerületeket produkál, még a nem neurofiziológusokat is meggyőzte arról, hogy az axonmembrán igen nagy fontosságú és hozzájárult annak fiziológiai bizonyításához, hogy lényegében az összes potenciálváltozások az axonmembránon keresztül zajlanak le, így az összes permeabilitás változások a membránban történnek.

Ha bármi történik a membránban, durva becsléseket tudunk tenni a lehetséges változások felső hatáira nézve az axon optikai vagy más tulajdonságai alapján. Csak nagy általánosságban lehet várni, hogy a fényszóródás, vagy az ultraviola abszorpció mértéke az axonban arányos a benne levő fehérje

és lipid komponensek száraz súlyával. Egy óriásaxonban, melynek  $10^7 \text{ \AA}$  az átmérője, és  $10^2 \text{ \AA}$  vastag a membránja, utóbbi csak egy tizedred részét teszi ki az axon szárazsúlyának. Ha a membrán optikai tulajdonságaiban beálló változás 100%-os lenne, mindig csak egy tizedred résznyi változást észlelnénk, ami rendkívül csekély felső határnak. Feltehető ezért, hogy a tizedred résznél (0,01%-nál) nagyobb változások már artefaktumok. Nagyobb frakcionális változások előidézésének két módja van. Elsősorban a membránhoz specifikusan kötött folyamatokat kell tanulmányozni (kettőtörés, festék fluoreszcencia). Az elektronmikroszkópia azt mutatja, hogy az axonmembrán kb. egy tized részét teszi ki a teljes membránnak-óriásaxon preparátumban, úgy hogy egy 100%-os változás egy axonmembrán specifikus tulajdonságban 10%-os változáshoz vezet, ami már három nagyságrenddel nagyobb, mint a  $10^{-4}$ -szere változás.

A másik út nagyobb változások észlelésére az, hogy kisebb axonokat tartalmazó preparátumokat kell vizsgálni, így pl. a rákideget, amelynek axonjai átlagosan  $1 \mu$  átmérőjűek. Itt az axonmembrán egy századrészét teszi ki a szárazanyagának, úgyhogy a 100%-os változás a membrán tulajdonságaiban már százalék nagyságrendű változást jelent, tehát 2 nagyságrenddel nagyobb, mint az óriásaxonban. VON MURALT (1971) felhasználta ezt az előnyös körülményt, amikor tanulmányozta a kettőtörési változásokat csuka szaglőidegében, amelyben az axonok átmérője kisebb, mint egy tized mikron. Az első módszert a fentebb említettek közül elég nehéz alkalmazni. A második módszer interpretációban nehézségeket okozhat, mert még nem lehetséges ilyen vékony axonok feszültségzárás feldolgozása, márpedig a feszültségzár technika alkalmazása szükséges olyan kísérletekben, ahol meg akarjuk határozni a változások eredetét a potenciál, áram és permeabilitás módosulásai alapján.

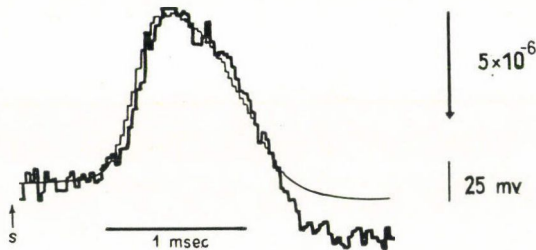
MURALT fentebb idézett, csukaidegeken végzett kísérletei mellett hasonló változásokat találtak rákidegben, nyúl vagusban, tintahal idegben, elektromos szervben, tintahal óriásaxonban és békaizomban. Világos, hogy a kettőtörési változások általánosan fellelhetők az ingerlékeny szövetekben. Mégis, miután a kísérletek a legbehatóbbak az óriásaxonban voltak, itt ezek kerülnek részletesebb taglalásra.

### *Kettőtörésbeli változások*

Ha a fény kölcsönhatásba lép az anyaggal, terjedési sebessége csökken. A vákuumban mért terjedési sebesség az anyagban mérthez képest adja a törésmutatót. Sok anyag különböző törésmutatókat mutat különböző irányban polarizált fényvel szemben, ezért kettőtörőnek nevezzük. Egyetlen optikai tengellyel rendelkező objektum számára a kettőtörés nagysága a tengellyel párhuzamosan és a tengelyre merőlegesen eső fényvel szembeni törésmutatók különbözőségéből adódik. A biológiai anyagok kettőtörését a strukturális

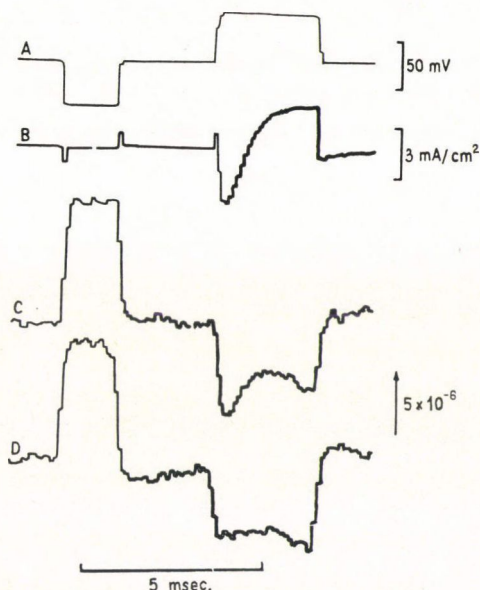
rendezettség viszonylatában szokták értelmezni. A velőhüvelyes ideg pl. nagyobb kettőtörést mutat, mint a velőhüvely nélküli.

SCHMITT és mtsai (1940) először kísérelték megmérni az óriásaxon kettőtörésének változásait akciós potenciál alatt. Módszerük érzékenysége azonban nem volt elegendő. COHEN és mtsai (1970, 1971) rákidegen megmérték a kettőtörés változásait és megállapították, hogy az intenzitás változások a merőlegesen polarizált fényvel valóban a retardációban beállt változásnak köszönhetők és nem a dikroizmusban vagy valamilyen más optikai tulajdonságban beállt változásnak. (*A retardáció a kettőtörés és a vastagság hányadosa.*) Azonban, amikor megpróbálták mérni a retardáció változást óriásaxonon, a jel-zaj viszony kb. 1 volt és még kb. 20 000 impulzus után sem javult ez. Lényeges javításokat kellett végezni a készüléken, amíg megkapták a 6. ábrán látható regisztrátumot. Akciós potenciál alatt a retardáció csökkenése volt megfigyelhető.



6. ábra. *Loligo forbesi* óriás axonjának kettőtörés változása ingerület alatt. Vékony vonal: akciós potenciál, vastag vonal: kettőtörés. Kalibráció: felül j. o.: kettőtörés, alul j. o.: feszültség. Alul középen: idő (COHEN és mtsai, *J. Physiol.* **211**, 495 (1970))

Ezen egyszerű kísérlet eredménye jelentős útmutatást adott a retardációs változás eredetére nézve, mivel időbeli lefutása hasonló volt az akciós potenciáléhoz és ezért nem lehetett a permeabilitás változásoknak vagy ionáramoknak tulajdonítani. A hasonlóság azonban lehet coincidencia is és ezért a retardáció változást megvizsgálták feszültségzár lépések alatt is (7. ábra). Hiperpolarizáló lépés alatt az ionáramok igen csekélyek voltak és nem volt permeabilitás változás, csak a membránpotenciál változott. A retardáció növekedése, ugyanazt az időbeli lefutást mutatta, mint a potenciálé, ezért potenciál függőségre mutatott. Azonban a retardáció változás, ami a depolarizáció alatt zajlott le, sokkal komplikáltabb volt. Nemcsak hogy kisebb volt, mint a hiperpolarizációs lépés alatti változás, de alakja sem volt egyenes vonalú, egy része az időbeli lefutásnak hasonlított az áram lefutásához. Feltételezték ekkor, hogy a retardáció változás is potenciál függő, de ez csak a feszültségzár módszer miatt van így. Más kísérletben megfelelő metodikai változtatásokkal kimutatták, hogy a depolarizációs lépés sokkal inkább egyenes vonalú volt. Ezek alapján jutottak a következtetésre, hogy a retardáció változás potenciál függő.

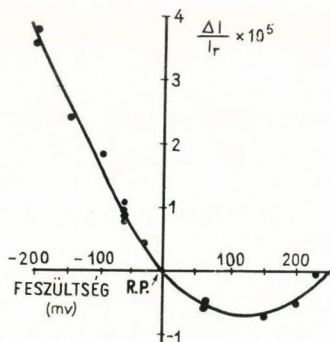


7. ábra. Kettőstörés változások feszültségzár lépések alatt *L. forbesi* óriás axonon. A.: feszültség regisztrátum, B.: áram regisztrátum, C, D.: kettőstörés. Hiperpolarizáció lefelé mutat [COHEN és mtsai J. Physiol. **218**, 205 (1971)]

Ez a következtetés természetesen sok bizonytalanságot rejt magában, már csak a metodikai nehézségek miatt is, másrészt pedig amiatt, hogy a retardáció változás nem volt teljesen egyenes vonalú.

Amikor különböző nagyságú potenciál lépéseket alkalmaztak és a mért retardációt ábrázolták a potenciállal szemben, kiderült, hogy a kettőstörés változás a potenciál változás négyzetével arányos. A kettőstörés változások kísérleti pontjai, melyeket az ordinátóra mértek, egy parabolán fekszenek, melynek egy minimuma van 125 mV-tal pozitívabb helyen, mint a membrán-potenciál (8. ábra).

Hiperpolarizációs lépés alatt a potenciálkülönbség 99%-a a külső és belső elektród között a membránra esik, ezért a membrán vékonysága miatt, 100 mV potenciálkülönbség esetén ráeső potenciál gradiens 100 000 V/cm körül van. Valószínűnek látszott ezért, hogy a potenciál függő retardációs változás eredetét az axonmembránban kell keresni. Alátámasztotta ezt az észlelet is, hogy a retardáció változást nem érintette az axoplazma eltávolítása és a perfúzió, továbbá, hogy hasonló retardáció változásokat mértek elektromos angolna elektromos lemezében, tehát egy olyan preparátumban, amelyben nincsenek Schwann-sejtek az aktív membránok körül. Ha elfogadjuk azt a következtetést, hogy a retardáció változás eredete a membránban van és feltételezzük, hogy az axonmembrán nyugalmi kettőstörése hasonló a mielinéhez, vagy



8. ábra. A kettőtörés változás (ordináta) és a membránpotenciál (abszcissa) összefüggése [COHEN és mtsai *J. Physiol.* **218**, 205 (1971)].

a vörösvérsejtekéhez, két további következtetés vonható: 1. az axonmembránnak radiális optikai tengelye van, 2. a becsült membránretardáció kb. 1%-a a teljes axonretardációnak, s ilyen módon a frakcionális változás a membránretardációban sokkal nagyobb, mint a teljes fényintenzitás frakcionális változása.

Az aktuális membránretardáció növekedése akciós potenciál alatt kb. 2 tized százalékra volt becsülhető (COHEN és mtsai 1970).

Előzetes eredmények arra mutattak, hogy a membrán lipid frakciója nem vesz részt a retardáció változásban. Összehasonlították a retardáció változást tengervízben és tengervíz + oktanol, butanol vagy prokain keverékében. A retardáció változást nem érintette 1 mmol oktanol és ugyanezt kapták 100 mmol butanollal és 10 mmol prokainnal. SKOU (1954, 1958) azt találta, hogy a butanol, oktanol és prokain megnöveli a lipid egyes rétegek felületi nyomását, mások pedig kimutatták, hogy a butanol növeli a kation permeabilitást a lipid rétegeken. Így reálisnak látszik az a következtetés, hogy mindhárom megváltoztatja a lipid frakció tulajdonságait, de nem befolyásolja a retardációt. A legegyszerűbb, bár nem egyedüli következtetés az, hogy a retardáció változásban a membrán lipid frakciója nem vesz részt. BERESZTOVSZKI és mtsai (1970) ezt a feltevést lipid rétegeken modellkísérletben is igazolták.

Tetrodotoxin vagy saxitoxin hozzáadása tengervízben lényegesen megváltoztatta a retardáció változást. A változás nagysága hiperpolarizációs lépés alatt 2–4-szeres volt és az időbeli lefutás sokkal lassabbá vált. A toxinok retardációra tett hatása nem volt direkt párhuzamba állítható jól ismert hatásukkal a Na permeabilitásra, és további kísérletek azt mutatták, hogy más anyagok hasonló retardáció változásbeli módosulásokat képesek létrehozni (COHEN és mtsai 1971). A toxinok hatásai a retardációra valószínűleg aránylag kis számú molekulával való kölcsönhatásból erednek. Így pl. HAUSER és mtsai (1970) újabban azt észlelték, hogy minden alamethicin molekula lipid kettős-



rétegeken drámai változást idézett elő, amely mintegy 600 lipid molekulára terjedt ki.

A retardáció változások eredete nem világos. Két mechanizmus jöhet szóba, amely a potenciál négyzetével való arányosságot magyarázhatja. Az első hipotézis azon a tényen alapul, hogy a potenciál gradiensben beálló nagy változás újra orientálja a dipól momentummal rendelkező membrán molekulákat. Ha ezek optikailag anizotrópok voltak, akkor átrendeződésük a kettőtörés változását fogja eredményezni. Ez a *Kerr-effektus*. A másik magyarázat az elektrostriktió jelenségén alapul. Ahhoz, hogy egy potenciálváltozást hozjunk létre a membránkapacitáson keresztül, a pozitív és negatív töltések közötti vonzóerő a membránt összenyomni, vagy összehúzni törekszik. Ez a konstrikatív erő a membránt vékonyabbá teszi, ami önmagában is kettőtörés változásához vezethet. Ugyanezt eredményezheti a membrán molekuláinak átrendeződése is. Noha az eddigi számítások szerint mindkét mechanizmus kvantitatíve plauzibilis, további kísérletek szükségesek annak bizonyításához, hogy ezek a mechanizmusok ténylegesen részt vesznek-e a mért retardáció változásokban.

Ha a Kerr-effektus, vagy egy elektrostriktív hatás volna felelős a retardációért, akkor a dipól orientáció, vagy az elektrostriktió minimális értéken kellene hogy legyen, ha a membránpotenciál 0 mV. Meglepő vonása a 8. ábrán mutatott kísérleteknek, hogy a görbe 125 mV-os depolarizált potenciál értékhez képest szimmetrikus, vagyis 60 mV-al pozitívabb a 0 mV-os membránpotenciál értéktől. Így a membránon belül 60 mV-os pozitivitást kell létrehozni a külső oldalhoz képest ahhoz, hogy a retardációért felelősnek gondolható feltételezett molekulák úgy viselkedjenek, mintha zéró potenciálon lennének. Egy ilyen jelenség magyarázatára fel kell tételezni, hogy fixált pozitív töltések vannak az axonmembránon kívül, vagy fixált negatív töltések azon belül, továbbá hogy ezek a fixált töltések hozzájárulnak egy potenciál gradienshez a membrán közvetlen környezetében. Ez a potenciál, mivel egy vékonyabb vastagságra terjed ki, mint maga a membrán, eltolódást okoz az igazi membránpotenciál és a mért membránpotenciál között. CHANDLER a külső pozitív, vagy belső negatív töltések távolságát 60 mV eltolódás esetén 15 Å-re becsüli. Ion áram mérések alapján CHANDLER és mtsai (1965), továbbá ROJAS és ATWATER (1968) feltételezik, hogy a membrán belső felszínén fixált negatív töltések vannak, melyek távolsága 27, vagy 40 Å. GILBERT és EHRENSTEIN (1969), MOZSAJEVA és NAUMOV (1970) viszont arra a következtetésre jutott, hogy fixált negatív töltések a membrán külső felszínén 11–18 Å távolságban vannak. Ily módon az árammérésekből eredő észleletek azt mutatják, hogy belső negatív fixált töltések 27–40 Å, külső negatív fixált töltések 11–18 Å távolságban helyezkednek el. Miután a kettőtörési kísérletek vagy külső pozitív, vagy belső negatív fix töltéseket tételeznek fel és még hozzá nagyobb sűrűséggel, a kétféle típusú eredmény nem magyarázható ugyanazon töltésekkel.

Lehetséges, hogy a fixált töltések teóriája túlságosan egyszerűsíti a viszonyokat. Mindenesetre a potenciálfüggő fényszórás változások az elmélettől eltérő töltéstávolságot követelnek, s jelzik azt is, hogy a fixált töltések diszkrét természetével komolyan kell számolni.

### *Fluoreszcencia*

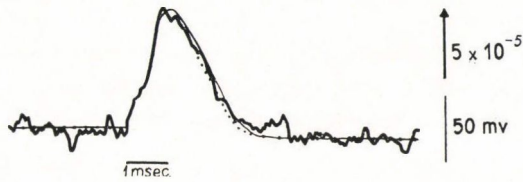
#### 1. K ü l s ő f l u o r e s z c e n c i a

Sok molekula fluoreszcencia spektruma és kvantum hatásfoka függ a környezettől. Ilyen molekulák spektrális eltolódásokat vagy kvantum-hatásfokbeli változásokat mutatnak, ha mikrokörnyezetük megváltozik. (Viszkozitás, pH, az oldószer polaritása, más vegyületek jelenléte.) Nem egy ezek közül axonfestékként szerepel, tehát képes kötődni élő axonokhoz.

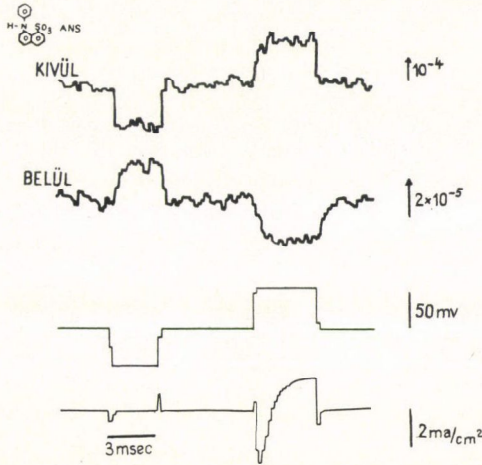
1964-ben SHTRANKFELD és FRANK arról számolt be, hogy ezer-százezer inger 10%-os reverzibilis fluoreszcencia változáshoz vezetett olyan óriásaxonokban, amelyeket primulinnal festettek. A használt fotográfiás technika gyenge időfeloldása miatt nehéz volt a csökkenés okát meghatározni. Újabban jobb időfeloldású készülékkel TASAKI és mtsai (1968) a külső fluoreszcenciában egyes ingerek után is észlelt változást. Noha ők először az 1-amino-8-naftalánszulfonátot (ANS) használták, 13 más festékkel is találtak fluoreszcencia változásokat (TASAKI és mtsai 1969). A 9. ábra egy ilyen kísérlet regisztrátumát mutatja ANS fluoreszcenciával. Noha a fluoreszcencia változás némileg lassabbnak látszik, mint az akciós potenciál, a késés a használt fénymérő rendszer időállandójának tulajdonítható. Bár a fluoreszcencia változás jó párhuzamban áll az akciós potenciállal, az egybeesés lehet véletlen műtermék is. Ezért megvizsgálták az ANS fluoreszcenciát feszültségzár lépések alatt is (10. ábra). A mérések azt mutatják, hogy az ANS fluoreszcencia változásai követik a potenciál lépéseket. Hasonló eredményekre jutottak, ha az ANS-t mikroinjekció útján az axoplazmába juttatták. A fluoreszcencia hiperpolarizáló lépés alatt csökkent, s követte a potenciálváltozás időbeli lefutását. Depolarizáció alatt a fluoreszcencia változás ellentétes előjelű és azonos időbeli lefutású a hiperpolarizáció alatt tapasztalttal. A fluoreszcencia ebben az esetben is potenciálfüggőnek látszik és nem mutatja semmi jelét azoknak a nagy áramoknak és permeabilitás változásoknak, amelyek depolarizáció alatt zajlanak le. Ezért arra a következtetésre jutottak, hogy az ANS fluoreszcencia potenciálfüggő, méghozzá lineáris jelleggel.

Hasonló méréseket végeztek 38 más festékkel és kettő kivételével valamennyi lineáris potenciálfüggőséget mutatott. Két festék fluoreszcencia változásai a potenciál négyzetével voltak arányosak.

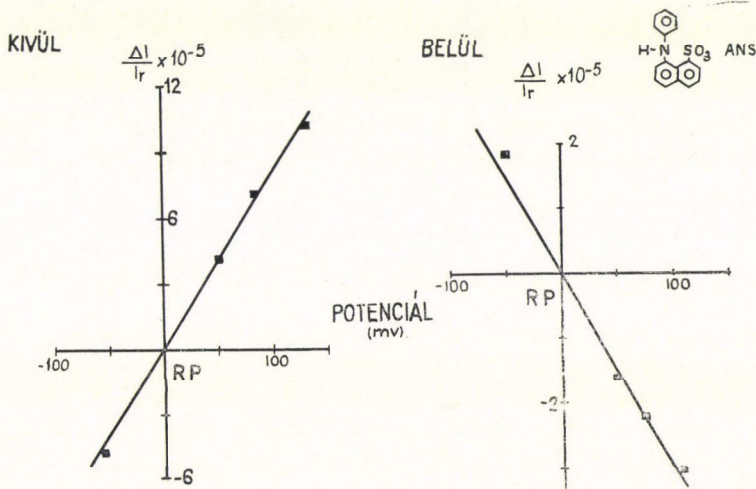
A fluoreszcencia változások előjele függött attól, hogy a festéket az axonra kívülről, vagy az axonba belülről alkalmazták (11. ábra). Depolarizáló



9. ábra. Az ANS fluoreszcencia változása ingerület alatt. Vastag vonal: fluoreszcencia, vékony vonal: akciós potenciál. Kalibrációk: felül j. o.: fluoreszcencia, alul j. o.: feszültség, középen alul: idő [COHEN és mtsai Biol. Bull. 141, 382 (1971)]



10. ábra. Az ANS fluoreszcencia változásai feszültségzár lépések alatt. 1. sor a festék kívülről, 2. sor belülről történő alkalmazása kapcsán, 3. sor potenciál-, 4. sor: áramregisztrátum (COHEN és mtsai l. 9. ábra)



11. ábra. A fluoreszcencia változások és a membránpotenciál összefüggése a festék külső (baloldalt) és belső (jobbaldalt) alkalmazása esetén. Ordináta: fajlagos fluoreszcencia változás, abszcissa: membránpotenciál (COHEN és mtsai l. 9. ábra).

lépés esetén a fluoreszcencia csökkenés volt észlelhető, ha az axon belsejébe adták a festéket. Az ANS ilyen szempontból egyedülállónak látszott, mivel a többi festékek ilyen előjelváltozást nem mutattak. Ezt annak tulajdonították, hogy az ANS a membránon igen lassan halad keresztül.

Az ANS fluoreszcencia változása a nyugalmi intenzitás értékével elosztva egyetlen ingerre kb.  $10^{-4}$  nagyságrendű volt egy 50 mV-os potenciál változás esetén. Belső alkalmazáskor ugyanez a változás  $2 \times 10^{-5}$  nagyságrendűnek bizonyult.

Miután arra a következtetésre jutottak, hogy a fluoreszcencia változások potenciálfüggőek és a legtöbb potenciál változás a membránon keresztül zajlik le, gyanítható, hogy e változások magában a membránban is történnek. TASAKI és mtsai (1972) erős bizonyítékot hoznak fel arra nézve, hogy az ANS-sel kapott fluoreszcencia változások pronázzal perfundált axonokban is előfordulnak. A belülről alkalmazott pronáz megemésztí az egész axoplazmát és mivel az ANS permeabilitása a membránon keresztül igen alacsony, semmi más nem gyanúsítható a fluoreszcencia változásokért, mint maga a membrán.

Az első kínálkozó feltevés, hogy a membránpotenciál gradiense maga az, ami a fluoreszcencia emisszióra közvetlen hatást gyakorol. TASAKI és mtsai (1972) szerint az elektromos mező nem elég nagy, hogy az ANS molekula átérjen az alapállásból az első gerjesztett singlet állapotba és arra a következtetésre jutnak, hogy a fluoreszcencia változás nem lehet a potenciál változás következménye. Mivel azonban az ANS molekulában az első excitált singlet és az első excitált triplet állapot valószínűleg közel fekszik energiájában, a potenciálnak egy csekély differenciális hatása elegendő lehet a két állapot közötti kvantum hatásfokbeli különbségét realizálni és így a fluoreszcencia változásokat előidézni.

A fluoreszcencia változás azonban sokkal lassúbb, mint a gerjesztett állapotba való átmenet, (1  $\mu$ sec) így nem valószínű, hogy magyarázatként szolgálhat. Ugyanígy nem vezethető vissza a jelenség az ANS molekula dipólusmomentumára és elfordulására sem. Az ANS koncentráció változásával kapcsolatos teória már helyesen megmondja, hogy az ANS koncentrációnak és a fluoreszcenciának a membránban depolarizáció hatására fokozódnia kell. Ha az ANS a membránon belül foglal helyet, depolarizáció csökkenti a fluoreszcenciát.

Mindeme triviális magyarázatoknak az a közös hibája, hogy az ANS molekula tulajdonságaiból vezetik le a jelenséget és nem tükrözik a membránstruktúra esetleges módosulásait.

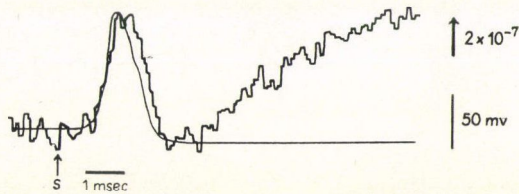
Egy másik anyaggal, a 2-p-toluidinil-6-naftalánszulfonáttal (TNS) szintén végeztek kiterjedt fluoreszcencia méréseket. Az ingerületre bekövetkező fluoreszcencia változás itt is potenciálfüggőnek mutatkozott, s egyszersmind arra is fényt derített, hogy az axonok optikai tengelye radiális irányú. A fluoreszcencia változások okára nézve a TNS-sel végzett kísérletek sem vetettek több fényt.

## Fényszóródás

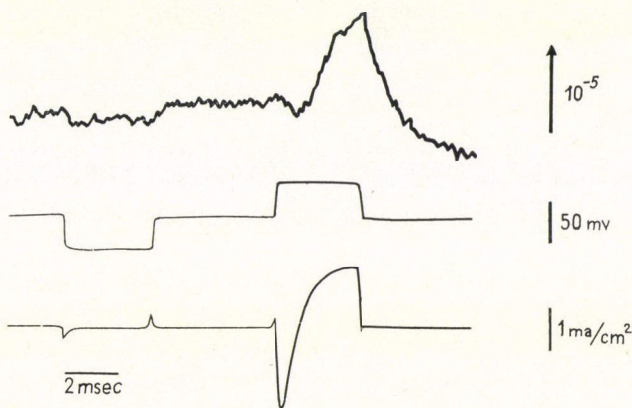
A fényszóródás jelensége a törésmutató inhomogenitásából adódik, molekuláris, szubcelluláris, celluláris vagy makroszkópos szinten és gyakran használatos részecskék nagyságának meghatározására, továbbá térfogatváltozások mérésére.

A fényszóródás jelensége hegyes és derékszögben beeső fényben egyaránt észlelhető. A 12. ábra COHEN és mtsai (1972) egy kísérletét mutatja, melyen a vastag zajos vonal a fényszóródást, annak növekedését, a vékony vonal az akciós potenciált jelzi. A jelenség annyiban különbözik a kettőstöréstől, és a fluoreszcenciától, hogy van egy lassan emelkedő második komponense, ami az akciós potenciál csúcsa után 20 msec-mal éri el maximumát.

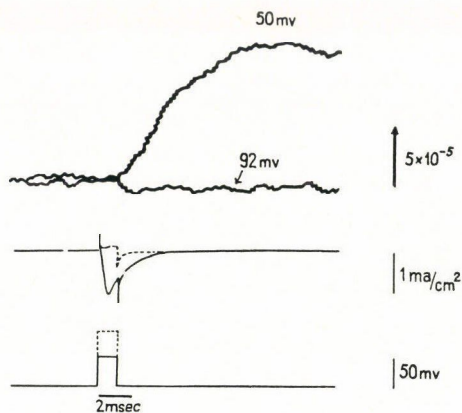
Megismételték a kísérletet feszültségzár (voltage clamp) körülményei között is. A 13. ábra tanúsága szerint hiperpolarizáció fényszóródás változást alig okozott, míg depolarizáció alatt jelentős fokozódás mutatkozott. Az volt továbbiakban a kérdés, hogy a növekedés potenciál- vagy permeabilitás függő-e.



12. ábra. A fényszórás változás összefüggése az ingerülettel *L. forbesi* óriás axonon. Vastag vonal: fényszórás, vékony vonal: akciós potenciál [COHEN és mtsai J. Physiol. 224, 701 (1972)]



13. ábra. A fényszórás változásai feszültségzárlépek alatt *L. forbesi* óriás axonon. Felül: fényszórás, középen: feszültség-, alul: áramregisztrátum [COHEN és mtsai J. Physiol. 224, 727 (1972)]



14. ábra. A fényszórás változásai 50 mV és 92 mV feszültségzár lépések alatt. Jelölések ugyanazok, mint a 13. ábrán [COHEN és mtsai J. Physiol. **224**, 727 (1972)]

Ennek eldöntésére 50 és 92 mV-os depolarizáló potenciál ugrásokat végeztek (14. ábra). 50 mV depolarizáció esetén nagy Na permeabilitás fokozódás és erős befelé irányuló áram volt, 92 mV-nál azonban — mely bár növelte a permeabilitást, Na beáramlást már nem okozott — (a potenciál közel járt a Na-ionok ekvilibrium potenciáljához) már nem volt lényeges fényszóródás fokozódás. Így a fényszóródás növekedés *áramfüggőnek* bizonyult. Értéke azonban nem az áram pillanatnyi intenzitásával, hanem annak idő szerinti integráljával volt arányos.

A jelenség magyarázatára két feltevés van. Egyik szerint (GIRARDIER és mtsai (1963), BARRY és HOPE (1969) a fényszóródás változás oka a hidratációs vízeffektus. Ha ionok lépnek át a membránon, azok hidratációs vizüket magukkal viszik az axonmembrán és a Schwann-sejtek közötti 100 Å-ös résbe. Ez térfogatnövekedéssel jár.

Másik magyarázat az átviteli szám-effektuson alapul. Ha 100 K-ion kilép a membránon, akkor ennek hatására 40 Na-ion lép be az elektródba és 60-Cl-ion lép ki abból. Ez a KCl koncentrációjának növekedésére vezet a periaxonális térben. Ozmotikus gradiens keletkezik, mely szintén térfogatnövekedést okoz.

Azt, hogy a két feltevés közül melyik áll közelebb a valósághoz, a következő kísérlettel ellenőrizték. A mikroelektródot isethionát-glutamáttal Na-sójának keverékével töltötték. Ezek az ionok lényegesen kisebb mozgékonyaságúak, mint a Cl-ion. A fényszóródás növekedés ilyen körülmények között  $29 \pm 5\%$ -kal kisebb volt. Az elméletileg számított csökkenés 36%, amivel a kísérleti adatok jó egyezésben vannak. A folyamat természetesen lassúbb, mint az ionáramok, s mivel a fényszóródás változás utóbbiak következménye, az áram idő szerinti integráljának arányában lép fel. A víz diffúziósebességét számításba

véve (10 msec időállandóval) az eredmény reális. Szerzők tehát egy ionáram-függő jelenséget fedeztek fel. A membrán struktúra változásaira nézve azonban ez sem mond sokat. Talán metodikája alkalmazható továbbiakban az idegingerület detektálására.

Érdekes kísérletsorozatokat végeztek ultrabolya abszorpcióra, infravörös emisszióra és abszorpcióra nézve is. Az ingerület folyamata mindeme jelenségekben változást okozott. Részletesebb elemzésük főként a membrán struktúra változásai viszonylatában hiányzik.

## IRODALOM

- BARRY, P. H. and A. B. HOPE: Electroosmosis in membranes: effects of unstirred layers and transport numbers. I. Theory. *Biophys. J.* **9**, 700–728 (1969).
- BERESTOVSKY, G. N., G. M. FRANK, E. A. LIBERMAN, V. Z. LUNEVSKY and V. D. RAZHIN: Electrooptical phenomena in bimolecular phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 263–275 (1970).
- CHANDLER, W. K., A. L. HODGKIN and H. MEVES: The effect of changing the internal solution on sodium inactivation and related phenomena in giant axons. *J. Physiol. (London)* **180**, 821–836 (1965).
- COHEN, L. B., B. HILLE and R. D. KEYNES: Changes in axon birefringence during the action potential. *J. Physiol. (London)* **211**, 495–515 (1970).
- COHEN, L. B., B. HILLE, R. D. KEYNES, D. LANDOWNE and E. ROJAS: Analysis of the potential-dependent changes in optical retardation in the squid giant axon. *J. Physiol. (London)* **218**, 205–237 (1971).
- COHEN, L. B. and R. D. KEYNES: Evidence for structural changes during the action potential in nerves from the walking legs of *Maia squinado*. *J. Physiol. (London)* **194**, 85–86P (1968).
- COHEN L. B., R. D. KEYNES and D. LANDOWNE: Changes in light scattering that accompany the action potential in squid giant axons: potential dependent components. *J. Physiol. (London)* **224**, 701–725 (1972).
- COHEN, L. B.: Changes in neuron structure during action potential propagation and synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **53**, 373–418 (1973).
- DELBRÜCK, M.: Lipid bilayers as models of biological membranes. *The Neurosciences, Second Study Program The Rockefeller University Press* 1970. pp. 677–684 (1973).
- EIGEN, M., R. WINKLER: Alkali-ion carriers: Dynamics and Selectivity. *The Neurosciences, Second Study Program The Rockefeller University Press* 1970. pp. 685–696 (1973).
- GILBERT, D. L. and G. EHRENSTEIN: The effect of divalent cations on potassium conductance of squid axons: determination of surface charge. *Biophys. J.* **9**, 447–463 (1969).
- GIRARDIER, L., J. P. RUBERN, P. W. BRANDT and H. GRUNDFEST: Evidence for anion-permeable membrane in crayfish muscle fibers and its possible role in excitation-contraction coupling. *J. Gen. Physiol.* **47**, 189–214 (1963).
- HAUSER, H., E. G. FINER and D. CHAPMAN: Nuclear magnetic resonance studies of the polypeptide alamethicin and its interaction with phospholipids. *J. Mol. Biol.* **53**, 419–433 (1970).
- HILL, D. K.: The effect of stimulation on the opacity of a crustacean nerve trunk and its relation to fibre diameter. *J. Physiol. (London)* **111**, 283–303 (1950).
- HILL, D. K. and R. D. KEYNES: Opacity changes in stimulated nerve. *J. Physiol. (London)* **108**, 278–281 (1949).
- LÄUGER, P., W. LESSLAUER, E. MARTI, J. RICHTER: Electrical properties of bimolecular phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 20–32 (1967).
- MOZHAYEVA, G. N. and A. P. NAUMOV: Effect of surface charge in the steady-state potassium conductance of nodal membrane. *Nature* **228**, 164–165 (1970).
- MUELLER P., D. O. RUDIN: Action potential phenomena in experimental bimolecular lipid membranes. *Nature* **213**, 603–604 (1967).
- MUELLER P., D. O. RUDIN: Development of  $K^+$ – $Na^+$  discrimination in experimental bimolecular lipid membranes by macrocyclic antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 398–404 (1967).

- VON MURALT, A.: The role of thiamine (vitamin B<sub>1</sub>) in nervous excitation. *Exptl. Cell Res. Suppl.* **5**, 72–79 (1958).
- PAGANO R., T. E. THOMPSON: Spherical lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **144**, 666–669 (1967).
- ROJAS, E. and I. ATWATER: An experimental approach to determine membrane charges in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* **51**, 131s–145s (1968).
- SHTRANKFELD, I. G. and G. M. FRANK: Luminescence of giant nerve fibres on excitation. *Biofizika* **9**, 321–326 (1964).
- SKOU, J. C.: Local anaesthetics. VI. Relation between blocking potency and penetration of a monomolecular layer of lipoids from nerves. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **10**, 325–337 (1954).
- SKOU, J. C.: Relation between the ability of various compounds to block nervous conduction and their penetration into a monomolecular layer of nerve tissue lipoids. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 625–629 (1958).
- TASAKI, I., L. CARNAY, R. SANDLIN and A. WATANABE: Fluorescence changes during conduction in nerves stained with acridine orange. *Science* **163**, 683–685 (1969).
- TASAKI, I., L. CARNAY and A. WATANABE: Transient changes in extrinsic fluorescence of nerve produced by electric stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **64**, 1362–1368 (1969).
- TASAKI, I., A. WATANABE and M. HALLETT: Fluorescence of squid axon membrane labelled with hydrophobic probes. *J. Memb. Biol.* **8**, 109–132 (1972).
- TRÄUBLE, H., E. GRELL: Formation of asymmetrical spherical lecithin vesicles. *Neurosci. Res. Program. Bull.* (in press) (1970).
- TSOFINA, L. E., A. LIBERMAN, A. V. BABAKOV: Production of bimolecular proteinlipid membranes in aqueous solution. *Nature* **212**, 681–683 (1966).