

AZ INGERÜLETVEZETŐ MEMBRÁNOK IONTRANSPORTJÁNAK VIZSGÁLATA; ELMÉLETI ÉS GYAKORLATI PROBLÉMÁK

KOVÁCS TIBOR

DOTÉ Élettani Intézete, Debrecen

A legtöbb sejt 50–100 mV nagyságú potenciál különbséget és az anorganikus ionok koncentráció gradiensét tartja fenn a sejtet környezetétől elválasztó felszíni membrán két oldala között. Az ideg- és izomrostra jellemző, hogy a sejt nagy koncentrációban tartalmazza a K^+ , és kis koncentrációban a Na^+ és Cl^- ionokat, míg a sejtet körülvevő intersticiális folyadékban a Na^+ és Cl^- koncentrációja nagy. Az I. táblázat a harántcsíkolt, sima és szívizom, valamint a tintahal óriás axonjának ioneloszlását mutatja.

A transzportkutatások célja az, hogy megismerjük és leírjuk adott részecske, molekula vagy ion mozgását a membrán egyik oldaláról a másikra. Közismert, hogy az ionok mozgása különleges szerepet játszik az ingerületvezető membránokon, az izom- és idegrost felszíni membránján végigfutó ingerületi jel, az akciós potenciál keletkezésében (21, 25, 34, 44). Ingerületi állapotban megváltozik a membrán permeabilitása és ezzel együtt a Na^+ és K^+ ion mobilitása is a membránban. Az ingerületvezető membrán iontransportjának kutatása azt célozza, hogy választ tudjunk adni arra a kérdésre, hogy molekuláris szinten hogyan generálódnak a membrán elektromos potenciáljai és hogyan tudja a sejt az ionkoncentráció gradienst fenntartani. Mindkét kérdés végső soron egyetlen aspektusa annak a sokkal általánosabb problémának, hogy hogyan transzportálódnak az ionok a membránon keresztül.

Hasznos, ha már most leszögezzük, hogy a membránon kétféle transzportjelenség játszódhat le: (1) passzív transzport, ami a koncentráció gradiens mentén végbemenő diffúzió következménye és bármely permeabilis membránon keresztül spontán lejátszódik, ha az két különböző ionösszetételű oldatot választ el egymástól; (2) energia-függő, aktív transzport, ami ellene hat a passzív diffúciónak, ehhez energia szükséges, mivel az ionokat a koncentráció gradienssel szemben transzportálja.

Az ideg- és izomrost membránjában az aktív és passzív iontransport egyaránt lejátszódik. A nyugalmi és akciós potenciált az intra- és extracelluláris folyadék között passzívan diffundáló ionok generálják [3, 19, 23, 24, 27]. Az is tény, hogy a sejt a folytonosan befelé és a sejtől kifelé irányuló diffúzió ellenére is fenntartja az ionkoncentráció gradienst, tehát aktív transzport-

1. táblázat

A különböző izmok és a tintahal axon intra- és extracelluláris ionkoncentrációi

Szövet	Koncentráció (mM)			Szerző
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	
Béka m. sartorius	18 (116)*	131 (2,5)	2,3 (117)	KOSTYUK és mtsai (38)
Béka gyomor	66 (120)	129 (2)	14 (124)	BOZLER és mtsai (8)
Tengeri malac <i>Taenia coli</i>	56–85 (137)	98–119 (5,9)	— (134)	GOODFORD és HER- MANSSEN (18)
Tintahal axon (Loligo)	69 (351)	360 (17)	157 (469)	DEFFNER (16)

* A zárójelben levő értékek a külső médiumra vonatkoznak.

folyamatnak is kell működni [10, 11, 12, 13], hogy a diffúzió okozta veszteséget pótolja és fenntartsa a normális ionösszetételét [12, 13, 14, 15].

Az iontranszport tanulmányozásánál elengedhetetlenül szükséges, hogy a kétféle transzport folyamat között különbséget tudjunk tenni, ezért szükség van bizonyos műveleti kritériumokra, melyek arra is alkalmasak, hogy adott ion transzportjában az egyes folyamatok relatív részvételét is meg tudjuk határozni. Ma még nincs egyetlen olyan eljárásunk sem, amelynek segítségével ezt a problémát minden kétséget kizáróan meg lehetne oldani. Általános vezérfonalat kaphatunk azonban, ha a membránok diffúziós folyamatainak modelljeként a híg, vizes oldatokban lezajló diffúziós folyamatot választjuk.

I. Homogén vizes fázis transzport folyamatai

Passzív transzport. Elemi alapismertetek

A híg, vizes oldatban az ionok szakadatlan termikus mozgásban vannak és állandóan ütköznek az oldószer molekuláival. Adott ion species egyetlen individuális ionja kaotikus, véletlenszerű Brown mozgást végez. Ez a mozgás független a többi ionétól, csupán a lokális elektromos erőter befolyása alatt áll, mivel a részecskéknek töltésük van. Az individuális ionok random — előre meg nem jósolható — mozgása összességében idézi elő az ionpopulációnak, mint egésznek a törvényszerű mozgását, ami úgy nyilvánul meg, mintha valamennyi ionra egyetlen külső erő hatna és a koncentráció gradiens mentén ennek hatására az ionpopuláció valamennyi ionja azonos sebességgel mozdulna el.

A különböző természeti jelenségek leírásánál és megértésénél gyakran hasznos szolgálatot tesz, ha először a formális vagy fenomenológiai egyenletet

írjuk le. Ezt tesszük mi is akkor, amikor a további tárgyalásunk alapját képező Teorell egyenletet (1 e) ilyen formában írjuk fel [50]. Ez az egyenlet azt állítja, hogy ha ismerjük a rendszer adott pontjában valamilyen ion species koncentrációját és mobilitását a közegben, valamint az adott pontban a ráható erőt, a fluxus leírható:

$$\text{Fluxus} = \text{Mobilitás} \times \text{Koncentráció} \times \text{Teljes hajtóerő} \quad (1e)$$

Ez esetben a fluxus nem más, mint a termodinamikai erő hatására bekövetkező, a rendszer egyik helyéről a másikra történő anyagáramlás, vagy transzport sebessége, ami a transzport irányára merőleges egységnyi felszínen keresztül, időegység alatt átlépett anyagmennyiséget jelent.

Ha az anyagmennyiséget molban fejezzük ki, a felszínt cm^2 -ben és az időt secundumban, akkor a fluxus (J) dimenziója:

$$J = \text{mol} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1} \quad (2e)$$

Az általános formában leírt Teorell egyenlet alkalmas bármilyen specifikus transzport folyamat leírására. Ez esetben a megfelelő hajtóerőt kell az egyenletbe behelyettesíteni. Ha töltéssel rendelkező részecske mozog az elektromos erőterben, akkor az elektromos potenciál gradiens és a részecske moláris töltésének szorzata (Faraday szám szorozva a partikulumonkénti töltésszámmal) szerepel majd hajtóerőként. Ez esetben a transzportot az elektromos erőterben lejátszódó ionvándorlásnak nevezzük és a Teorell egyenlet az oldatra vonatkozó Ohm törvényt írja le.

Ha töltéssel nem rendelkező részecskéről van szó, és a rendszer adott pontjai között koncentráció különbség van, akkor a kémiai potenciál gradiens lesz a hajtóerő. Kémiai potenciálnak μ_j nevezzük az oldat j-ik töltetlen komponensének parciális szabad energiáját állandó hőmérsékleten és nyomáson. Az ionok esetében a „kémiai potenciál” kifejezés a parciális moláris szabad energia azon részére alkalmazható, amelyik nincs kapcsolatban az elektromos töltéssel, míg a komplett parciális moláris szabad energiát elektrokémiai potenciálnak nevezzük. Ideális oldat esetében a j-ik komponens kémiai potenciálját az alábbi képlettel írhatjuk le:

$$\mu_j = \mu_j^\circ + RT \ln c_j \quad (3e)$$

ahol μ_j° a kémiai standard potenciál, c_j a j-ik ion moláris koncentrációja, R, T a szokásos jelentésű.

Ez esetben a fluxusra vonatkozóan a Teorell egyenlet a következő formában írható:

$$J = - U c \text{ grad } \mu \quad (4e)$$

ahol U jelenti a mobilitást, $\text{grad } \mu$ pedig a kémiai potenciál gradienst. Az egyenletben a mínusz előjel onnan ered, hogy a fluxus a kémiai potenciállal ellentétes irányban történik. A diffúzió legegyszerűbb esetében, amikor híg oldatban a részecske elmozdulása csak egyetlen irányban, a koordináta mentén történik, a fluxus így írható fel:

$$I = - U c \frac{\partial \mu}{\partial x} = - U c R T \frac{\partial \ln c}{\partial x} \quad (5e)$$

Mint látjuk, az 5. egyenlet a Teorell egyenlet alkalmazása a nem elektrolit diffúziójára. A képlet $R T \frac{\partial \ln c}{\partial x}$ kifejezése jelenti tehát a hajtóerőt, vagyis a kémiai potenciál gradienst. Az egyenletet átrendezve a következő formában írhatjuk le:

$$J = - R T U \frac{\partial c}{\partial x} \quad (6e)$$

Az $R T U$ kifejezést diffúziós koefficiensnek nevezzük és D -vel jelöljük. Így módon jutunk el Fick első törvényéhez.

$$J = - D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (7e)$$

Ha a diffúzió folyamata nem csupán egyetlen irányra korlátozódik, a Fick törvény így írható fel:

$$J = - D \text{grad } c = - D \left(i \frac{\partial c}{\partial x} + j \frac{\partial c}{\partial y} + k \frac{\partial c}{\partial z} \right) \quad (8e)$$

A kémiai potenciál és a diffúziós koefficiens taglalása során azt az egyszerűsítést hajtottuk végre, hogy töltetlen részecskéről tárgyaltunk. Ha a transzportál részecske ion, annak mozgását az elektromos erőtér is befolyásolja. Ha az elektromos erőtér hatását az iontraszportra le akarjuk írni, ehhez ismerni kell a tér bármelyik pontjában a vektorális erőtér intenzitását. A leírás másik módja, ha adott pontra megadjuk a skaláris elektromos potenciált, amit a továbbiakban ψ -el jelölünk. Két pont elektromos potenciáljai közötti különbség azzal a munkával egyenlő, amit akkor végzünk, ha egységnyi töltést viszünk át egyik pontból a másikba. E definíció értelmében az elektromos potenciál additív arbitrarius konstansnak is felfogható. A konstans értéke fix oly módon, hogy a végtelen távoli pont potenciálját elméletileg 0-nak vesszük. Abban az esetben, ha az ionra ható elektromos potenciál csak egyetlen irányban (az x tengely mentén) változik, a Teorell egyenlet a következő formában írható:

$$J = - c U z F \frac{\partial \Psi}{\partial x} \quad (9e)$$

ahol z az ion valenciája, F a Faraday konstans ($96\,487\text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$), ψ az elektromos potenciál, J , U , c és x a korábbiakkal azonos. A 9. egyenlet leírja az ion vándorlását az elektromos erőterben, ha az ionra más erő nem hat. Amikor azonban az elektromos potenciál gradiensen kívül a kémiai potenciál gradiens is hat az ionra, a diffúzió okozta fluxus szuperponálódik az elektromigráció okozta fluxusra. A következményes elektrodifúziót leíró egyenlet

$$J = -cU \text{ grad } (\mu + zF\psi) = -cU \text{ grad } \bar{\mu} \quad (10e)$$

ahol $\bar{\mu}$ jelenti az elektrokémiai potenciált.

Ha az elektrokémiai potenciál csak egyetlen irányban változik, a 6. és 9. egyenletet összevonva

$$J_x = -RTU \frac{\partial c}{\partial x} - cUzF \frac{\partial \Psi}{\partial x} \quad (11e)$$

A 11. differenciál egyenlet a további elméleti számítások alapegyenlete. Ahhoz, hogy ez az egyenlet olyan közvetlenül mérhető mennyiségekre vonatkozzon, mint pl. a membrán két oldala közötti potenciálkülönbség, az ionspeciestek koncentráció különbsége, vagy hogy deriválható legyen egyetlen ionféleség fluxusának leírására, ha az függvénye a koncentráció különbségnek, ill. a membrán potenciálnak, az egyenletet integrálni kell. A legkorábbi megoldást PLANCK [45] végezte, később HENDERSON [20], megoldásaiknál azonban olyan egyszerűsítő feltételezéseket vezettek be (elektroneutralitás, lineáris koncentráció gradiens), melyek nem érvényesek a nagy ellenállású, vékony membránra. A 11. egyenlet jól használható és mindmáig széles körben elterjedt megoldása GOLDMANN-tól [17] származik, amit HODGKIN és KATZ [26] tovább fejlesztett. A partikuláris megoldás során a következő egyszerűsítő feltételezéseket alkalmazták:

1. Az ionok a membránban a diffúzió és az elektromos erőter hatása alatt mozognak, lényegében hasonló módon, mint a vizes oldatban.

2. A membránban a feszültség gradiens konstans.

3. A membrán két felszínénél az ionok koncentrációja egyenesen arányos a membránnal érintkező vizes oldatokéval.

4. A membrán homogén.

A feltételezésből következően steady state állapotban valamely ion fluxusa konstans, csakúgy, mint az elektromos potenciál gradiens, s ez utóbbi egyenlő lesz a membrán két felszínével érintkező oldatok potenciál különbségével.

$$\frac{\partial \Psi}{\partial x} = \frac{\Psi_0 - \Psi_i}{\delta} = \frac{E}{\delta} \quad (12e)$$

ahol ψ_0 és ψ_i jelenti a külső és belső oldat potenciálját, δ a membrán vastagságát. Ha a koncentráció csak egyetlen irányban változik, tehát csak az x koor-

dináta függvénye, akkor az eredeti deriváltakat lehet használni és az egyenlet közvetlenül integrálható. A 12. egyenlet a j -ik ionspecies fluxusára megoldva

$$J_j = \frac{Uz EF}{\delta} \frac{(C_j)_i e^{-\frac{EF}{RT}} - (C_j)_0}{1 - e^{-\frac{EF}{RT}}} \quad (13e)$$

Minthogy a feltételezés szerint a j -ik ionspecies koncentrációja a membrán külső felszínénél egyenesen arányos a külső oldatban levő koncentrációjával és ez igaz a membrán belső felszínére is, az arányossági tényezőként HODGKIN és KATZ bevezette a particiókoefficiens β_j -t [26]. A három legfontosabb ion esetében

$$\begin{aligned} (C_K)_0 &= \beta_K [K]_0 & (C_K)_i &= \beta_K [K]_i \\ (C_{Na})_0 &= \beta_{Na} [Na]_0 & (C_{Na})_i &= \beta_{Na} [Na]_i \\ (C_{Cl})_0 &= \beta_{Cl} [Cl]_0 & (C_{Cl})_i &= \beta_{Cl} [Cl]_i \end{aligned}$$

ahol $\beta_K, \beta_{Na}, \beta_{Cl}$ rendre a K^+, Na^+ és Cl^- ionok megoszlási koefficiense a membrán és a vizes oldat között, $[K]_0, [Na]_0, [Cl]_0$ a külső oldatban és $[K]_i, [Na]_i, [Cl]_i$ a belső oldatban (szarkoplazma vagy axoplazma vizes fázisában) a K^+, Na^+ és Cl^- koncentrációja. A 13. egyenlet a monovalens K^+ ionra ($z = +1$) a következő formában írható

$$J_K = \frac{U_K \beta_K EF}{\delta} \frac{[K]_i e^{-EF/RT} - [K]_0}{1 - e^{-EF/RT}} \quad (14e)$$

HODGKIN és KATZ [26] bevezette a permeabilitási koefficienset, ami a j -ik ionra a következőképpen írható fel:

$$P_j = \frac{RT U_j \beta_j}{\delta} \quad (15e)$$

A 13. egyenletbe behelyettesítve a 15. egyenletet

$$J_j = P_j \left[\frac{(C_j)_i e^{-zEF/RT} - (C_j)_0}{1 - e^{-zEF/RT}} \right] \quad (16e)$$

Ha a fluxus potenciál függését $f(E)$ -vel jelöljük, akkor a K, Na és Cl ionok fluxusát nagyon egyszerű formában írhatjuk

$$J_K = P_K ([K]_i e^{-EF/RT} - [K]_0) f(E) \quad (17e)$$

$$J_{Na} = P_{Na} ([Na]_i e^{-EF/RT} - [Na]_0) f(E) \quad (18e)$$

$$J_{Cl} = P_{Cl} ([Cl]_i - [Cl]_0 e^{-EF/RT}) f(E), \quad (19e)$$

ahol

$$f(E) = EF/[RT(1 - e^{-EF/RT})]. \quad (20e)$$

A töltéssel rendelkező ionok fluxusát úgy is fel lehet fogni, mintha elektromos áram folyna a membránon keresztül, és a j -ik ion által szállított áram sűrűségét az alábbi összefüggés fejezi ki

$$I_j = z_j F J_j, \quad (21e)$$

ahol J_j jelenti a fluxust, z_j a j -ik ion valenciáját. Ha különféle ionok szimultán lépnek át a membránon eltérő sebességgel, akkor az iondiffúzió elektromos áramot hozhat létre és a membrán által elválasztott két oldatban jól mérhető töltés akkumuláció következhetne be. Gyakorlatilag azonban ilyen „makroszkópos” töltés akkumuláció nem jön létre, mivel a membrán két felszíne között elektromos potenciál különbség alakul ki és ez pontosan olyan értéket vesz fel, amennyi biztosítja azt, hogy az ionfluxusok pontos egyensúlyban legyenek és így az ionáramok szummája zéró. A membránpotenciál ezen értékét az alábbi feltétel biztosítja:

$$\sum_{j=1}^n I_j = \sum_{j=1}^n [F z_j P_j (C_{j0} - C_{ji} e^{-zEF/RT})] = 0. \quad (22e)$$

Általánosságban a 22. egyenletet nem lehet explicite E -re megoldani, de ha feltételezzük, hogy konstans potenciál gradiens van a membránban (konstans erőtér), és csupán a monovalens ionok diffúzióját vesszük tekintetbe, akkor a jól ismert Goldman—Hodgkin—Katz egyenlet írja le a membránpotenciált

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_{j=1}^n (P_j C_{j0}^+) + (P_j C_{ji}^-)}{\sum_{j=1}^n (P_j C_{ji}^+) + (P_j C_{j0}^-)} \quad (23e)$$

ahol a $+$ és $-$ jelölés a kationokra és anionokra utal.

Ez az egyenlet azt mutatja, hogy a membránpotenciált azok az ionok határozzák meg, melyekre nézve a membrán a leginkább átjárható és a legnagyobb koncentrációban vannak jelen. Általánosságban a membránpotenciál nem egyenlő az equilibrium potenciállal, de ahogy a relatív membrán permeabilitás nő, azzal párhuzamosan egyre inkább megközelíti az equilibrium potenciált. Equilibrium potenciálnak nevezzük azt a membránpotenciál értéket, melynél az adott ion passzív fluxusa zéró, ezt fejezi ki a 24. egyenlet:

$$E_{ej} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[C_j]_0}{[C_j]_i}, \quad (24e)$$

ahol E_{ej} jelenti a j -ik ionspecies equilibrium potenciálját, $[C_j]_0$ és $[C_j]_i$ a külső és belső oldatban levő koncentrációját. Ha a membránpotenciál egyenlő egy adott ion equilibrium potenciáljával, akkor az ion nettó diffúziója nem következik be és az ioneloszlás a membrán két oldalán végtelen ideig változatlan marad anélkül, hogy munkát kellene végezni, azaz az ioneloszlás egyensúlyban van. Amennyiben a membránpotenciál különbözik az equilibrium potenciáltól, akkor az iondiffúzió és ioneloszlás megváltozása következik be, kivéve azt az esetet, ha a membrán teljesen impermeabilis az adott ionra nézve. A diffúzió és az ioneloszlás megváltozásának sebességét részben a permeabilitási koefficiens határozza meg.

Visszatérve az izom- vagy idegsejt membránpotenciáljához, a 23. egyenlet alkalmazásával az a következő formában írható fel:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K]_0 + P_{Na} [Na]_0 + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_0}, \quad (25e)$$

ahol P_K , P_{Na} , P_{Cl} a K^+ , Na^+ és Cl^- permeabilitási koefficiense, $[K]_i$, $[Na]_i$, $[Cl]_i$ szimbólum az ionok termodinamikai aktivitását jelenti, az i és o index mutatja, hogy intra- vagy extracelluláris folyadékra vonatkozik. Ez az egyenlet kifejezi a különböző ionok részvételét a membránpotenciálban. Ezt az egyenletet a következő formában is írhatjuk:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_0 + \alpha [Na]_0 + \beta [Cl]_i}{[K]_i + \alpha [Na]_i + \beta [Cl]_0}, \quad (26e)$$

ahol α és β jelenti a relatív permeabilitást, amit a következőképpen definiálhatunk

$$\alpha = \frac{P_{Na}}{P_K} \quad \beta = \frac{P_{Cl}}{P_K}.$$

A tintahal óriás axonjában a $P_K : P_{Cl} : P_{Na} = 1:0,45:0,04$, ill. nagy külső koncentrációnál $1:0,3:0,025$ [1, 26, 30]. A békaizomban a $P_K : P_{Na} = 1:0,01$ [22], a $P_K : P_{Cl} = 1:0,28$ [2]. A relatív permeabilitás bevezetésének elsősorban technikai előnye van az abszolút permeabilitással szemben. A relatív permeabilitást kísérletesen könnyen lehet mérni. A külső oldat Na vagy K koncentrációját változtatják és mérik a membránpotenciál változását és így számítják ki az α és β arányt.

A 25. egyenlet segítségével könnyű megmagyarázni az ideg- és izomrost nyugalmi és akciós potenciáljának eredetét. A nyugalmi potenciál elsősorban a külső K koncentrációjától függ, hiszen ennek relatív permeabilitása sokkal

nagyobb, mint a Na, ill. Cl ioné. Az akciós potenciál alatt a Na permeabilitás gyorsan nő, majd visszatér a nyugalmi szintre. Az akciós potenciál csúcsán a $P_{Na} > P_K$ és $P_{Na} > P_{Cl}$, ezért a membránpotenciál megközelíti a Na equilibrium potenciált [26].

Az elmondottakból világosan kitűnik, hogy adott ion passzív transzportját a membránon keresztül végső soron három tényező: a membrán permeabilitási koefficiens, az ion koncentráció gradiense és végül a membránpotenciál határozza meg. A membrán permeabilitási koefficiensét csak az esetben lehetne pontosan megmérni, ha a membránpotenciál gradiense zéró volna, ilyenkor ui. kizárólag a membrán geometriai tulajdonságától, az ion diffúziós koefficiensétől és a partíciós koefficiensétől függene.

E fejezetben választott modellünkben feltételeztük, hogy a permeáló ion a többi iontól függetlenül mozdul el, ezekkel nem lép kölcsönhatásba és a diffundáló ion fluxusa tág koncentráció tartományban egyenes arányban áll a koncentráció gradienssel. A membrán passzív tulajdonságait kvantitatíve a permeabilitási koefficiens fejezi ki. Az ismertett elemi diffúziós teória csupán elvi vázlatul szolgál a koefficiens definíciójához, és változásának molekuláris szinten történő magyarázatához. A megközelítésnek az a velejáró veszélye, hogy a valóságban a membránon keresztüli ionmozgás teljesen más lehet, mint az elvi modellként szolgáló híg, vizes oldatban lejátszódó diffúziós folyamat. Egyetlen interpretáció sem tekinthető ezért véglegesen megoldottnak, csupán meglehetősen durva első közelítésnek.

Nem szükséges különösebben bizonyítani, hogy a membrán permeabilitási tulajdonságait annak strukturális szerkezete nagymértékben befolyásolja. A szilárd szerkezeti matrix teljesen impermeabilis lehet, így az átjutás csak a megfelelő pórusokon vagy csatornákon mehet végbe, következképpen a membrán úgy viselkedik, mintha csak kis geometriai frakciója lenne alkalmas a diffúzióra. A membránon átvezető, vízzel telt „csatornák” vagy „pórusok” természetesen nem a membrán síkjára merőleges utakat jelentenek, hanem kanyargósan tekerednek a strukturális elemek között. Ha membrán valamely rétegében fix töltéssel bíró csoportok vannak, akkor ennek hatására az egyes ionok koncentrációja a membránban jelentősen eltérhet, egyeseket taszít, másokat vonz. A membránon átlépő ionok az átjutás során erős kapcsolatot teremthetnek egymással, vagy akár a membrán elemeivel.

A vázolt komplex folyamatot a permeabilitási koefficiens csak globálisan tudja mérni. Annak ellenére, hogy a membránpotenciál külső médium ionkoncentrációjától való függését kiterjedten vizsgálják [59, 42], és a különböző ionok relatív membrán-permeabilitására vonatkozóan hasznos adatokat szolgáltatottak e vizsgálatok nyomán, azonban a permeabilitási koefficiens abszolút értékére vonatkozóan semmiféle felvilágosítást nem nyújtottak. A permeabilitási koefficiens azonban relatíve könnyen meg lehet határozni radioaktív izotópokkal.

II. Radioaktív nyomjelzők fluxusa

A tintahal óriás axonja a membrán transzport tanulmányozásának rendkívül alkalmas objektuma, mert az axon átmérője nagy, az axoplazmát könnyű eltávolítani anélkül, hogy a membrán megsérülne, mindez lehetővé teszi, hogy közvetlenül az axon belsejébe injiciálják a vizsgálni kívánt radioaktív iont, vagy hogy mesterségesen áramoltassák át radioaktív vagy inaktív oldattal, s így folyamatosan vizsgálják a nyomjelző ionok ki-, vagy beáramlását [4, 5, 6, 28, 29, 36, 46, 48]. Legújabban a rák és a csendes-óceáni makkok (*Balanus*) óriás idegrostjaiba is sikerült közvetlen injekció formájában bejuttatni a radioaktív izotópot, így az efflux kísérletesen könnyen vizsgálható [7, 10].

Ha az ion kezdeti belépési sebességét akarjuk meghatározni, akkor a sejtet körülvevő oldathoz adjuk, s ebben a radioaktív ion koncentrációja C_{j0}^* lesz. Minthogy a $t = 0$ időpontban a sejt belsejében a radioaktív koncentráció $C_{ji}^* = 0$, ezért a j -ik radioaktív ion kezdeti belépési sebessége

$$M_{ji}^* = P_j C_{j0}^*, \quad (27e)$$

ahol M_{ji}^* jelenti a radioaktív nyomjelző influxát.

Mint említettük, az idegrost axoplazmájába is be lehet vinni a radioaktív iont, és ha folyamatos átáramlással biztosítjuk, hogy az idegrostot körülvevő oldatban a radioaktív koncentráció mindig zéró legyen, akkor az axonból a leadás kezdeti sebessége vagy az efflux

$$M_{j0}^* = P_j C_{ji} e^{zEF/RT}. \quad (28e)$$

Adott ion influxát vagy effluxát közvetlenül kiszámíthatjuk a radioaktív fluxusból, mivel kémiaiilag a stabil és radioaktív izotópok azonosak és valamennyi reakciófolyamatban koncentrációjuk arányában vesznek részt, ezért a stabil izotóp influxa M_{ji} , a következő összefüggés alapján kiszámítható, ha ismerjük a radioaktív ion influxát, a jelzett és jelzetlen ionkoncentráció hányadosát, mivel

$$M_{ji} = M_{ji}^* C_{j0}/C_{j0}^*, \quad (29e)$$

hasonlóképpen a stabil izotóp effluxa

$$M_{j0} = M_{j0}^* C_{ji}/C_{ji}^*. \quad (30e)$$

Ha adott ion a membránon keresztül kizárólag passzív diffúzióval jut át, a permeabilitási koefficiens meghatározása könnyű. A tintahal óriás axonjában a Na influx átlagértékét $17 \text{ pM/cm}^2 \cdot \text{sec}$ -nak találták, a membránpotenciál

$E = -60$ mV nagyságú volt $[Na]_0 = 423 \mu\text{M}/\text{cm}^3$ külső koncentráció esetén [11]. A fenti értékeket az alábbi egyenletbe behelyettesítve

$$P_{Na} = M_{Na} \frac{RT}{-EF} \left[\frac{(1 - e^{EF/RT})}{[Na]_0} \right] \quad (31e)$$

a Na permeabilitási koefficiensének értéke $1,5 \times 10^{-8}$ cm/sec-nak adódott [11].

Ha adott ion passzív fluxusát akarjuk tanulmányozni, akkor természetesen nem tekinthetünk el az elektrokémiai potenciál gradienstől és az adott ion permeabilitásától. Az előző részben láttuk és részletesen is foglalkoztunk a fluxust leíró, meglehetősen komplikált egyenletekkel. A probléma egyszerűsítését jelentette és egyben a legkonveniábilisabb módszerét szolgáltatta a passzív ionmozgás tanulmányozásának az USSING [51] és TEORELL [50] által bevezetett fluxus hányados analízis. Ez abból a feltevésből származik, hogy a membrán homogén, és a permeabilitási koefficiens a membránon keresztül lezajló, mindkét irányú ionmozgás esetén is egyenlő, a nettó transzport mindenütt arányos az elektrokémiai gradienssel és az egyirányú fluxusok függetlenek egymástól. Eszerint adott ion fluxusa a membrán egyik oldaláról a másikra, $J_{(I \rightarrow II)}$, arányos a membrán azon oldalán levő elektrokémiai aktivitással, A_I vel, ahonnan a penetráció megtörténik

$$J_{(I \rightarrow II)} = PA_I = PC_I e^{zF(E_I - E_m)/RT}, \quad (32e)$$

ahol P a permeabilitási koefficiens, F a Faraday konstans, z az ion valenciája, E_I a membrán I oldalán levő potenciál, E_m a membránban levő maximális potenciál.

Az ellenirányú fluxusra is érvényes ez a kifejezés

$$J_{(II \rightarrow I)} = PA_{II} = PC_{II} e^{zF(E_{II} - E_m)/RT}, \quad (33e)$$

így a Ussing fluxus hányados

$$\frac{J_{(I \rightarrow II)}}{J_{(II \rightarrow I)}} = \frac{A_I}{A_{II}} = \frac{C_I}{C_{II}} e^{zFE/RT} \quad (34e)$$

Amennyiben a fluxus hányados összhangban van a 34. egyenlettel, akkor adott ion kizárólag egyszerű diffúzióval jut át a membránon mindkét irányban.

* Az egyenletet lehet a következő formában is írni:

$$\frac{I_{(I \rightarrow II)}}{I_{(II \rightarrow I)}} = e^{(E - E_{ej})z_j F/RT}$$

ahol E jelenti a membránpotenciált, E_{ej} a j-ik ion equilibrium potenciálját, Z_j a j valenciáját.

Egyensúlyban a két ellenkező fluxus egyenlő, $A_I = A_{II}$ és a membránon keresztül elektrokémiai gradiens nem lép fel.

A legtöbb esetben azonban a fluxus hányadosa nem a 34. egyenlet alapján számított értéket veszi fel, hanem annál kisebb vagy nagyobb lesz.

Vizsgáljuk most meg közelebbről azt az esetet, amikor a fluxus hányadosa nagyobb, azaz

$$\frac{I_{(I \rightarrow II)}}{I_{(II \rightarrow I)}} > \frac{A_I}{A_{II}},$$

és bár steady state állapotban az ellenirányú fluxusok egyenlők, mégis tartós elektrokémiai gradiens áll fenn a membrán két felszíne között. A béka *m. sartorius* izmában a Na influx és efflux dinamikus egyensúlyi állapotban (steady state) csaknem egyenlő [35, 21]. Az elektrokémiai aktivitási hányadosok azonban lényegesen különböznek, $A_I > A_{II}$, ahol A_I jelenti az extracelluláris, A_{II} az intracelluláris folyadék elektrokémiai potenciálját. Ez azt bizonyítja, hogy az effluxnak csupán elenyésző frakcióját teszi ki a passzív diffúzió.

HODGKIN és KEYNES [28] óriás axonon végzett kísérleteikben dinitrofenollal kezelték az idegrostot, hogy kikapcsolják az esetleges aktív transzport folyamatot, amihez az energiát a sejt kémiai reakciói szolgáltatják. Az ily módon mérgezett axonban a K fluxus hányadosa — adataik szerint:

$$\frac{K \text{ efflux}}{K \text{ influx}} = \frac{27}{3} = 9 \text{ volt,}$$

míg a Ussing-féle fluxus hányados várt értéke 2,2 lett volna. Ha a K transzport az egymástól független ionok egyszerű diffúziója lenne, akkor a mért és számított hányadosoknak egyenlőknek kellene lenniük. Nyilvánvaló, hogy a Ussing-féle fluxus hányados nem veszi figyelembe a penetráló ionok között, ill. a penetráló ionok és a membrán egyes komponensei között fellépő kölcsönhatásokat, az esetleges aktív transzportot stb.

Az irreverzibilis termodinamika alapján KEDEM és KATCHALSKY [31, 32, 33] igazolták, hogy a j -ik ion species fluxusának teljes egyenlete a következőképpen írható fel:

$$I_{j(i \rightarrow II)} = R_{jj} A_{jI} + R_{jk} J_{k(I \rightarrow II)} + R_{jr} J_{rI}, \quad (35e)$$

ahol R_{jj} a j -ik ion species permeabilitását meghatározó, közvetlen fenomenológiai koefficiens; R_{jk} keresztkoefficiens, mely leírja, hogy a j -ik ion fluxusa hogyan kapcsolódik a másik, a k -ik ion species $J_{k(I \rightarrow II)}$ fluxusához; végül az R_{jr} fenomenológiai koefficiens a j -ik ion fluxusa és a membránban végbemenő r kémiai reakció J_r sebességének kapcsolatát jelöli. Nyilvánvaló, hogy hasonló egyenlet írható fel az ellenirányú $J_{j(II \rightarrow I)}$ fluxusra is. A két fluxus hányadosa csak akkor lehet egyenlő az elektrokémiai potenciál hányadosával, A_I/A_{II} -vel,

ha $R_{jk} = 0$ és $R_{jr} = 0$. Ha a j -ik ion fluxusa valamilyen módon kapcsolódik a k ion fluxusához, vagy valamilyen r kémiai reakcióhoz, akkor a j -ik ion aktívan transzportálódik a II oldalról, a sejtből, az I oldalra.

Visszatérve a dinitrofenollal mérgezett axonon nyert adatokhoz, a transzporttal kapcsolt vektoriális kémiai reakciókat feltehetően bénították, tehát $R_{jr} = 0$, így az irreverzibilis termodinamikai analízis alapján arra lehet gondolni, hogy a K fluxusa és más fluxus vagy fluxusok közötti kölcsönhatással kell számolni. HODGKIN és KEYNES [28] magyarázata szerint a K efflux és influx egymással interferál. Egyik lehetséges mechanizmus, amire gondolni lehet, az, hogy a K^+ ionok átlépése keskeny csatornákon keresztül történik. Ezek átmérője alig valamivel nagyobb, mint a hidrált K^+ átmérője, azonban a membránt átszelő csatornák elég hosszúak ahhoz, hogy több ion egy időben, egymás mögött helyezkedjen el, s így 2 vagy 3 K^+ halad át a csatornán mint egység és ezek mozgása gátolja az ellenirányú influxot.

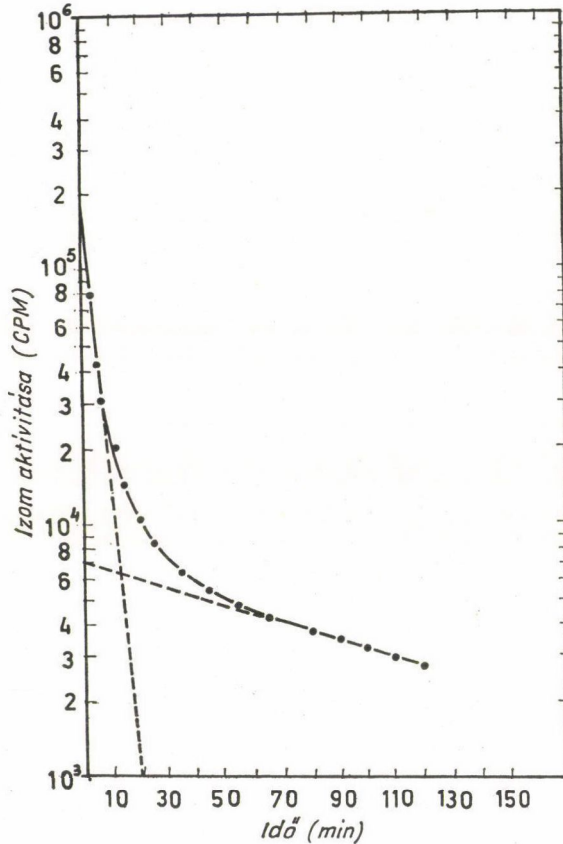
III. Radioaktív Na-csere a harántesíkkolt izmokban

Az elméleti kérdések rövid áttekintése után ebben a részben elsősorban saját kísérleti anyagunkból vett példák felhasználásával gyakorlati — a radioaktív izotópos mérések alkalmazásával, az eredmények analízisével és interpretációjával kapcsolatos — problémákkal szeretnénk foglalkozni.

Kísérleteinkben — csakúgy, mint mások — előszeretettel használjuk tesztobjektumként a kecskebéka m. sartoriusát, mivel jól preparálható, megközelítően homogén rostátmérővel rendelkezik és planparalel geometriát mutat. Mindez hozzájárul ahhoz, hogy kedvezőek a diffúziós adottságai. Az izmot mikroszkóp alatt preparáljuk ki, gondosan ügyelve arra, hogy a rostok ne sérüljenek és minél kevesebb kötőszövetes állományt tartalmazzon az izom. Erre azért van szükség, mert a sérült rostokhoz adszorbeálódott izotóp mozgásának kinetikája más, mint a membránon keresztül transzportálté. A kiperparált izmot mindig a nyugalmi hosszuknak megfelelően megfeszítve, e célra kialakított üvegbotra kötözzük fel. Ez arra is szolgál, hogy segítségével az izmot a kísérlet-során a kívánt aktív vagy inaktív oldatokba áthelyezzük.

Az üvegbotra felkötözött izmot — ha az influx kezdeti sebességét akarjuk meghatározni — rövid ideig (10–15 percig) tartjuk radioaktív Ringerben, melyben a $NaCl$ egy részét $^{24}NaCl$ -dal helyettesítjük. A „forró” Ringerből az expozíció után kiemeljük az izmot és megkezdjük a felvett izotóp kimosását. Előre elkészített 20–40 kémcsőbe pontosan azonos térfogatú, a radioaktív Ringerrel megegyező összetételű inaktív oldatot mérünk és a kimosás során ezeken a kémcsőveken visszük végig az izmot. A legelső kémcsőben csak 10 mp-ig tartjuk, ez lényegében a felszín, az üvegbot lemosását szolgálja. A következő inaktív Ringert tartalmazó csőben 1 percig van az izom, ezt több, 3 percig tartó mosás követi, majd öt, ill. tíz percre növeljük az inaktív Ringerrel

történő kimosás időtartamát. Az egész periódus rendszerint 120–150 percig tart. Amikor az izmot a legutolsó csőből kiemeljük, felszínét óvatosan leitatjuk, s az izom nedves súlyát, majd beszárítás után száraz súlyát is meghatározzuk, majd az izmot elroncsoljuk. E célra a koncentrált salétromsavval



I. ábra. Az izomsejtbe belépett ^{24}Na aktivitás meghatározása kimosási módszerrel. A folytonos vonal az izom aktivitás csökkenését jelenti, az idő függvényében (abscissa lineáris, ordinata logaritmusos lépték). A szaggatott vonalak a két komponens interpolációját jelzik.

történt roncsolást találtuk a legalkalmasabbnak. A roncsolás befejeztével az izommintát a kimosásra használt inaktív Ringer térfogatára töltjük fel. A kémcsöveket úgy válogatjuk össze, hogy azok pontosan beleilljenek a scintillációs lyukkristály furatába és így mérjük meg a minták aktivitását.

Ezzel az eljárással folyamatosan lehet mérni az inaktív Ringerbe leadott radioaktivitást. A radioaktív Ringer „specifikus aktivitásától” és a mérőberendezés érzékenységétől függ, hogy milyen felbontásban végezzük az analízist, azaz mennyi időközönként cseréljük a kémcsöveket a kimosás során.

Az influx meghatározásához a mérési eredmények felhasználásával meg kell szerkeszteni az izom radioaktivitását az idő függvényében ábrázoló görbét.

Megvan a lehetőség arra is, hogy az egyes kémcsövekben mért aktivitások és az aktuális gyűjtési idők hányadosait ábrázoljuk a kimosási idő függvényében, és így az ún. „differential effluent counts”-ot, vagyis a kimosott aktivitások differenciál görbét szerkesszük meg. Azonban az influx kiszámításánál az izomban maradt radioaktivitás görbét használjuk, az ún. integrált aktivitást. Ezt a következőképpen nyerjük. Az izomban a kimosási szekvencia végén visszamaradt aktivitáshoz hozzáadjuk a legutolsó kémcsőben mért aktivitást. Az így kapott összeghez hozzáadjuk az utolsó előtti csőbe leadott aktivitást, majd az azt megelőzőt, tehát fordított sorrendben valamennyi cső aktivitását. Így tehát kiszámítjuk, hogy a kimosás egyes lépésének megkezdésekor mennyi volt az izomban levő radioaktivitás. Az így nyert integrált beütéseket ábrázoljuk az idő függvényében. Egyik kísérletünkből származó görbét demonstráltuk az 1. ábrán. Az ordinátán az aktivitás logaritmus van feltüntetve, az abszcisszán az idő numerikus léptékben. Az ábrán feltüntetett mérési pontokból látható, hogy a görbe kezdetben meredeken csökken, majd a 60–80. perctől az izom radioaktivitása egyenletesen csökken. A jelen ábrázolási mód mellett a mérési pontok egy egyenes mentén helyezkednek el. Amennyiben az aktív Ringerből az izomba lépett ^{24}Na egyetlen régióba vagy kompartmentbe jutna be és csak egyetlen kompartmentből ürülne, akkor a kiürülés sebességének arányosnak kellene lenni az abban a régióban levő ^{24}Na mennyiségével, azaz

$$\frac{d [\text{Na}^*]}{dt} = -k [\text{Na}^*], \quad (36e)$$

ahol Na jelenti a jelzett ^{24}Na koncentrációját, k a kiürülés sebességi konstansát, $d \text{Na}/dt$ az adott kompartmentből a nyomjelzett Na leadásának sebességét. A 36. egyenletet integrálva a következő formában írhatjuk fel

$$\ln [\text{Na}^*] = -kt + \ln [\text{Na}_0^*], \quad (37e/a)$$

és

$$[\text{Na}^*] = [\text{Na}_0^*] e^{-kt}, \quad (37e/b)$$

ahol $[\text{Na}]_0^*$ jelenti a nyomjelző radionátrium mennyiségét $t = 0$ időben.

Ezek szerint, ha az izomban maradt aktivitás logaritmusát az idővel szemben ábrázoljuk és a ^{24}Na egyetlen kompartmentből ürül, egyenest kapunk. Az egyenes meredekségéből a k értéke, a rate konstans meghatározható. Az egyenest az ordinátára vetítve a metszéspont megadja a $t = 0$ időben a Na_0 értékét.

Az 1. ábrán demonstrált kísérlet eredménye azonban nem kompatibilis ezzel az interpretációval, mert a mérési pontok nem egyetlen egyenes mentén

helyezkednek el. Ha az izmot két független régióként kezeljük, mondjuk egy extracelluláris és egy intracelluláris kompartmentet tételezünk fel, akkor megközelítően a következő egyenlettel írhatjuk le a Na kimosását:

$$Na = Na_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t} + Na_2 \cdot e^{-k_2 \cdot t}, \quad (38e)$$

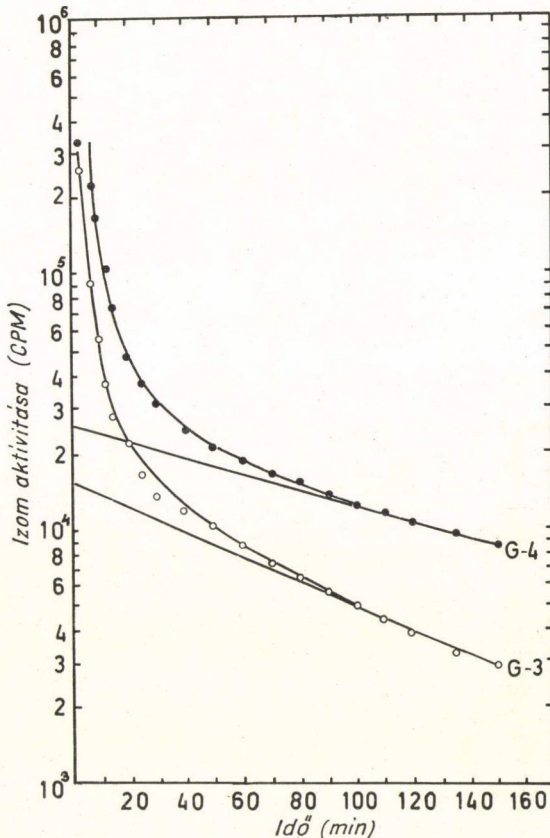
ahol 1 és 2 index jelzi a két kompartmentben a kezdeti ^{24}Na „mennyiséget” és a sebességi konstansokat.

Mint látható az 1. ábrán, az izomban maradt radioaktivitás, vagy az integrált izomaktivitás görbe két eltérő iránytangensű egyenes mentén csökken. A k_1 és k_2 rate konstans a két egyenesből határozható meg. Az egyenesek metszéspontjai adják a Na_1 és Na_2 értékét $t = 0$ időpontban, vagyis a radioaktív Ringerben történő expozíció végén az 1. és 2. kompartmentbe belépett ^{24}Na „mennyiségét”. A kimosás kezdetén a felvett aktivitás 3,2 perces felezési idővel ürült, amiből számított k_1 rate konstans értéke $0,216 \text{ min}^{-1}$ volt. A második kompartment lassabban ürült, ennek felezési ideje 90 perc volt, ebből számított k_2 értéke $0,0077 \text{ min}^{-1}$. Az ábrából leolvasható, hogy a Na_1 aktivitása 230 000 CPM (impulzus per perc); a Na_2 -be az expozíció alatt 7100 CPM aktivitás halmozódott fel. Amennyiben három független hipotetikus régiót tételezünk fel, az izotópeserét három exponenciális kifejezés szummájával lehet leírni. Természetesen n számú hipotetikus tér feltételezése esetén n exponenciális tényező összegével írható le a folyamat. Ez a módszer erősségét jelenti, de egyben ez a gyengéje is. Erőssége, mert a kimosási görbe vagy az efflux görbe ily módon matematikailag leírható. Ez a matematikai leírás azonban félrevezető lehet, ha az eredeti arányossági hipotézist nem igazoljuk, és ez jelenti a módszer gyengeségét. Az 1. ábrán látott görbe esetében a két kompartmentre és a két arányossági konstansra vonatkozóan szerencsénkre van másirányú bizonyítékunk, mert ezt a legkülönbözőbb fiziológiai körülmények között tanulmányozták. Ezért az interpretáció nem csupán az algebrai analízisen, hanem az alábbi bizonyítékokon is nyugszik:

Az izomból történő Na-leadás leggyorsabb periódusa az első öt percre esik, ami megfelel a Na-nak az extracelluláris térből történő diffúziójának. Ez fordítva, a Na-felvételre vonatkozóan is igaz. Ez a diffúziós folyamat, jól lehet leírható speciális diffúziós egyenlettel, azonban szem előtt kell tartani, hogy az extracelluláris teret számos, egymás között eserét lebonyolító kompartmentek összegeződésékként kell felfogni. Következésképpen e fázis diffúziós egyenlete valójában sok exponensből áll és ezek szummája adja az extracelluláris Na mennyiség kiürülését.

A diffúziós folyamatokra az is jellemző, hogy ezek kevésbé érzékenyek a hőmérséklet változására, mint a kémiai reakciók, azonban sokkal hőérzékenyebbek, mint egyéb fizikai jelenségek. A jellegzetes Q_{10} értékük 1,5 körül van, ami azt jelenti, hogy a diffúzió sebessége kb. 50%-kal növekszik, ha a hőmérséklet 10°C -al emelkedik. A Na-leadás gyors fázisának Q_{10} -e éppen ennyi.

További jellegzetessége a diffúzióknak, hogy a külső médium ionösszetételének változása nem befolyásolja, következésképpen ha a Na-ot más ionnal helyettesítjük, pl. Li-mal, az extracelluláris gyors fázisra vonatkozóan ugyanilyen képet kapunk.

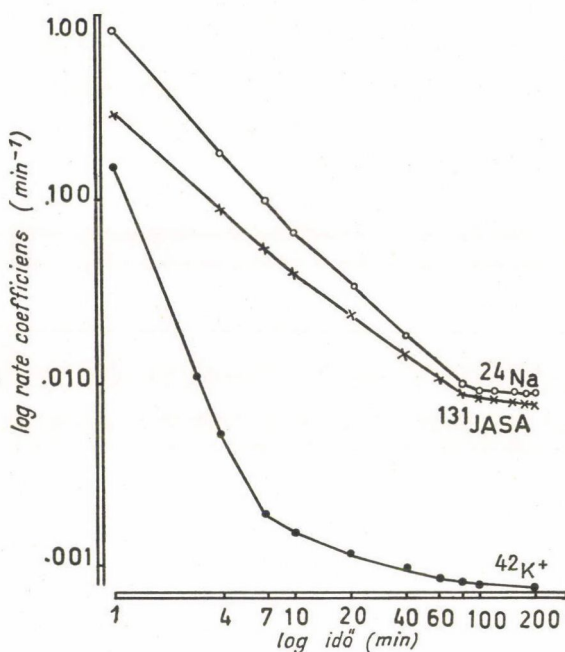


2. ábra. Fizosztigmin hatása a békaizom Na-influxára. A G-3 testizom (o) fizosztigmint tartalmazó (10^{-3} M) Ringerben 30 percig előkezelve, ezután 15 percig 24-Na-Ringerben. A kontroll G-4 izom (o) 15 percig 24-Na Ringerben. Az aktivitás leadása normál inaktív Ringerbe 22 °C.

Végül, az extracelluláris fázisból történő diffúzió nem érzékeny olyan vegyületek hatására, melyek a Na-pumpát gátolják, pl. ouabain vagy fizosztigmin [37, 39].

Ezt bizonyítja a 2. ábrán látható kísérletünk is. Ez esetben az izompár egyik tagját a 24-Na felvétel során fizosztigminnel kezeltük, míg a pár másik tagja kontrollként szolgált. Látható, hogy a kezelt izom lassú kompartmentjében felvett aktivitás jóval több, mint a fizosztigminnel kezelt izomban, azonban a gyors komponensek lényegileg azonosak maradtak.

Mindezen bizonyítékok alapján jogosnak tartjuk azt a feltételezést, hogy a kezdeti gyors fázisban valóban az extracellulárisan elhelyezkedett ^{24}Na kicserélődése játszódik le stabil ^{23}Na -ra. Nem zárható ki azonban annak lehetősége, hogy a Na egy része esetleg fix anion csoportokhoz kapcsolódva helyezkedik el, s így nem szabad diffúzibilis állapotban van jelen. Egyelőre nyitott kérdés, hogy ezek izotópkinetikai szempontból külön fázist alkotnak vagy sem.

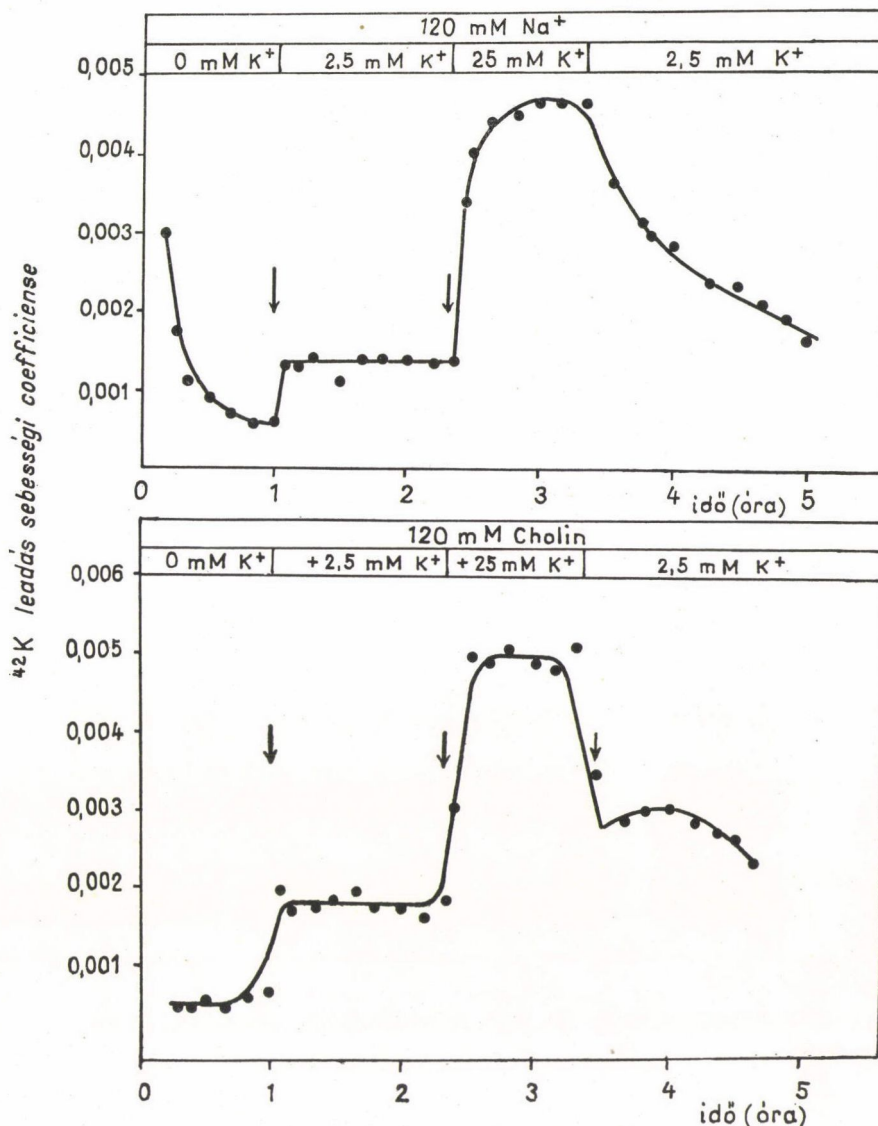


3. ábra. ^{24}Na , ^{42}K és ^{131}J -azo-serumalbumin ($^{131}\text{JASA}$) leadás sebességi koefficiensének változása az idő függvényében. A radioaktív nyomjelzőket 2 óráss előkezelés során vette fel a frissen kimetszett béka m. sartorius 22°C -on. Leadás inaktív Ringer oldatba.

Mint az 1. ábrán láttuk, 60–80 perc után valamennyi gyors exponenciális folyamat virtuálisan befejeződik és csak a lassú fázis 90 perces felezési idejű Na cseréje marad fenn. Ez minden valószínűség szerint az intracelluláris fázisból származik. E fázis Na leadását nagymértékben gátolja a hideg, a különböző gátlószerek, és a médium Na tartalma [37, 43, 47].

Összefoglalva, az egész izom Na leadása inaktív Ringerbe minimálisan két fázisban játszódik le. A két eltérő exponensú folyamat az extracelluláris és az intracelluláris térből történő leadást jelent. Anélkül, hogy részletesebben taglalnánk, számos bizonyíték szöveg harmadik, intermedier fázis mellett is [41].

Visszatérve az influx nagyságának meghatározásához, a lassú fázis egyenesét az ordinátára kivetítve a metszéspont adja az intracelluláris, transz-



4. ábra. ^{42}K leadás sebességi koeficiensének változása különböző kísérleti beavatkozás hatására. Felső ábrán 120 mM Na tartalmú, az alsó ábrán Na-mentes sóoldatban változott a K koncentráció. Jól látható, hogy a K-efflux sebességi koeficiens milyen érzékenyen követi a külső K-koncentráció változását.

membrán fázisban az expozíciós idő alatt belépett, jelzett Na aktivitását. Az aktív Ringer specifikus aktivitásának ismeretében kiszámítható az intracelluláris fázisba 15 perc alatt belépett Na mennyisége. Az 1. ábrán látható kísérletben a Ringer specifikus aktivitása $48 \times 10^3 \text{ CPM}/10^{-6} \text{ M Na}$ volt, és a

15 perc alatt felvett nettó Na mennyisége $0,17 \times 10^{-6}$ M. Amennyiben a felvett Na mennyiséget osztjuk az izom felszínével és a felvételi idővel, kiszámíthatjuk az influxot, ez jelen esetben 3×10^{-12} M/cm², sec volt.

A Na efflux meghatározása hasonlóan történik. Minthogy ilyen esetben nem az initialis belépés sebességét akarjuk meghatározni, arra törekszünk, hogy mennél jobban megközelítse az izom specifikus aktivitása az aktív Ringerét, azaz mennél nagyobb legyen az izomban a 24-Na „mennyisége”. Ezért lehetőleg hosszú expozíciós időt alkalmazunk, több órán keresztül tartjuk az izmot a radioaktív Ringerben. A kimosás menete lényegileg azonos a Na-influxnál alkalmazottal, azaz a radioaktivitást kimossuk az izomból inaktív Ringer állandó cseréje mellett.

A mérési eredményeket ugyancsak kétféle módon ábrázolhatjuk. Egyrészt megszerkeszthetjük az 1 perc alatt leadott aktivitás változását az idő függvényében, az ún. „differential effluent counts”-ot. Szokás ezt efflux görbének is nevezni, az elmondottak után azonban szükségtelen bizonyítani, hogy mennyire pontatlan fogalmazás ez. Ábrázolható továbbá az intracelluláris aktivitás változása „a kimosási idő” függvényében, úgy ahogy ezt az 1. és 2. ábrán láttuk.

Végül a harmadik módszer abból áll, hogy az ún. rate koefficienseket — szokás rate konstansnak is nevezni — az idővel szemben ábrázoljuk (3. ábra). A rate koefficiens úgy kapjuk meg, ha a leadás bármelyik időpontjában a „differential effluent counts” értékét osztjuk az ugyanazon időpontban mért „integral counts” értékével. A rate koefficiens dimenziója min⁻¹. Megjegyzem, hogy a meglehetősen sok időt igénylő számítás menete nagyon könnyen programozható digitális számítógépre. Intézetünkben több éve használjuk az erre a célra kidolgozott programot és ez nagyban megkönnyíti a kiértékelés munkáját és főleg feleslegessé teszi a pontatlan grafikus analízist. A rate konstans, ill. rate koefficiens nagyon érzékeny mutatója az efflux változásának, és különösen ott alkalmazható sikeresen — mint a 4. ábra is mutatja — ahol különböző gátló anyagok hatását akarjuk tanulmányozni, és a gátlás kifejlődését és megszűntét is jól lehet követni.

IRODALOM

1. ADRIAN, R. H.: The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. *J. Physiol. (Lond.)* **133**, 631—658 (1956).
2. ADRIAN, R. H.: Potassium chloride movement and the membrane potential of frog muscle. *J. Physiol.* **151**, 154—185 (1960).
3. ADRIAN, R. H., FREYGANG, W. H.: The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane. *J. Physiol. (Lond.)* **163**, 104—114 (1962).
4. BAKER, P. F., HODGKIN, A. L., SHAW, T. I.: Replacement of the protoplasm of a giant nerve fibre with artificial solutions. *Nature (Lond.)* **190**, 885—887 (1961).
5. BAKER, P. F., HODGKIN, A. L., SHAW, T. I.: The effects of changes in internal ionic concentrations on the electrical properties of perfused giant axons. *J. Physiol. (Lond.)* **164**, 355—374 (1962).

6. BAKER, P. F., HODGKIN, A. L., SHAW, T. I.: Replacement of the axoplasm of giant nerve fibres with artificial solutions. *J. Physiol. (Lond.)* **164**, 330–354 (1962).
7. BITTAR, E. E.: Effect of inhibitors and uncouplers on the Na pump of the Maia muscle fibre. *J. Physiol. (Lond.)* **187**, 81–103 (1966).
8. BOZLER, E., CALVIN, M. E., WATSON, D. W.: Exchange of electrolytes in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **195**, 38–44 (1958).
9. BRINLEY, F. J. Jr.: Sodium, potassium, and chloride ion concentrations and fluxes in the isolated giant axon of *Homarus*. *J. Neurophysiol.* **28**, 742–772 (1965).
10. BRINLEY, F. J.: Sodium and potassium fluxes in isolated barnacle muscle fibres. *J. gen. Physiol.* **51**, 445–447 (1968).
11. BRINLEY, F. J., MULLINS, L. J.: Ion fluxes and transference members in squid axons. *J. Neurophysiol.* **28**, 526–544 (1965).
12. CALDWELL, P. C., HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D., SHAW, T. I.: The effects of injecting, energy rich phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* **152**, 561–590 (1960).
13. CALDWELL, P. C., HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D., SHAW, T. I.: Partial inhibition of the active transport of cations in the giant axons of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* **152**, 591–600 (1960).
14. CALDWELL, P. C., KEYNES, R. D.: The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axons. *J. Physiol. (Lond.)* **137**, 12–13P (1957).
15. CONWAY, E. J., KERNAN, R. P., ZADUNAISKY, J. A.: The sodium pump in skeletal muscle in relation to energy barriers. *J. Physiol. (Lond.)* **155**, 263–279 (1961).
16. DEFFNER, G. G. J.: The dialyzable free organic constituents of squid blood; a comparison with nerve axoplasm. *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 378–388 (1961).
17. GOLDMAN, D. E.: Potential, impedance and rectification in membranes. *J. gen. Physiol.* **27**, 37–60 (1943).
18. GOODFORD, D. J., HERMANSEN, K.: Sodium and potassium movements in unstriated muscle of the guinea-pig *Taenia coli*. *J. Physiol. (Lond.)* **158**, 426–448 (1961).
19. HARRIS, E. J.: Transport and accumulation in biological systems. ed. by Butterworth, London and Washington, D. C. (1956).
20. HENDERSON, P.: idézve 26. szerzőtől. (1907).
21. HODGKIN, A. L., HOROWICZ, P.: Movements of Na and K in single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **145**, 405–432 (1959).
22. 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 (1959).
23. HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F.: Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* **116**, 449–472 (1952).
24. HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F.: The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* **116**, 497–506 (1952).
25. HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* **117**, 500–544 (1952).
26. HODGKIN, A. L., KATZ, B.: The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol. (Lond.)* **108**, 37–77 (1949).
27. HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D.: The mobility and diffusion coefficient of potassium in giant axons from *Sepia*. *J. Physiol. (Lond.)* **119**, 513–528 (1953).
28. HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D.: The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J. Physiol. (Lond.)* **128**, 61–88 (1955).
29. HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D.: Experiments on the injection of substances into squid giant axons by means of a microsyringe. *J. Physiol. (Lond.)* **131**, 592–616 (1956).
30. JENERICK, H. P., GERARD, R. W.: Membrane potential and threshold of single muscle fibres. *J. Cell. Comp. Physiol.* **42**, 79–102 (1953).
31. KATCHALSKY, A.: Membrane permeability and thermodynamics of irreversible processes. In: *Membrane Transport and Metabolism*. Ed. A. Klein Zeller and A. Kotyk, Publ. House of the Czechoslov. Acad. Sci. Praha. pp. 69–86 (1951).
32. KEDEM, O., ESSIG, A.: Isotope flows and flux ratios in biological membrane. *J. gen. Physiol.* **48**, 1047–1070 (1965).
33. KEDEM, O., KATCHALSKY, A.: A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability. *J. gen. Physiol.* **45**, 143–179 (1961).
34. KEYNES, R. D.: The ionic movements during nervous activity. *J. Physiol. (Lond.)* **114**, 119–150 (1951).
35. KEYNES, R. D.: The ionic fluxes in frog muscle. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* **142**, 359–382 (1954).

36. KEYNES, R. D., LEWIS, P. R.: The sodium and potassium content of cephalopod nerve fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **114**, 151–182 (1951).
37. KEYNES, R. D., STEINHARDT, R. A.: The components of the sodium efflux in frog muscle. *J. Physiol. (Lond.)* **198**, 581–599 (1968).
38. KOSTYUK, G. A., SOROKINA, Z. A., KHOLODOVA, Yu. D.: Measurement of activity of hydrogen, potassium, and sodium ions in striated muscle fibres and nerve cells. In: *Glass Microelectrodes*. Ed. M. Lavallée, O. F. Schanne, N. Hébert John Willy et Sons. New York pp. 322–348 (1969).
39. KOVÁCS, T., SZABÓ, B.: Effect of physostigmine on sodium efflux of frog muscle. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **40**, 13–26 (1971).
40. KOVÁCS, T., SZABÓ, B.: Radioaktív kationok transzportjának vizsgálata izolált vázizmokban. *Radioaktív Izotópok a Tudományos Kutatásban Symposium*. Budapest, 1969. nov. 12–13. 61. old.
41. KOVÁCS, T., SZABÓ, B., VARGA, E.: Veratrin hatása a béka *m. sartorius* 24-Na cseréjére. (Megjelenés alatt.)
42. MEVES, H., CHANDLER, W. K.: Ionic selectivity in perfused giant axons. *J. gen. Physiol.* **48**, 31–33 (1965).
43. MULLINS, L. J., FRUMENTO, H. S.: The concentration dependence of sodium efflux from muscle. *J. gen. Physiol.* **46**, 629–654 (1963).
44. NOBLE, D.: Application of Hodgkin–Huxley equations to excitable tissues. *Physiol. Rev.* **46**, 3–50 (1966).
45. PLANCK, M.: idézve 26. szerzőtől (1890).
46. SHANES, A. M., BERMAN, M. D.: Kinetics of ion movement in the squid giant axon. *J. gen. Physiol.* **39**, 279–300 (1955).
47. SJODIN, R. A., BEAUCÉ, L. A.: Strophantidin-sensitive components of potassium and sodium movements in skeletal muscle as influenced by the internal sodium concentration. *J. gen. Physiol.* **52**, 389–407 (1968).
48. TASAKI, I., TEORELL, T., SPYROPOULOS, C. S.: Movement of radioactive tracers across squid axon membrane. *Am. J. Physiol.* **200**, 11–22 (1961).
49. TASAKI, I., WATENABE, A., TAKENAKA, T.: Resting and action potential of intracellularly perfused squid giant axon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1177–1184 (1962).
50. TEORELL, T.: Transport processes and electrical phenomena in ionic membranes. In: *Prog. in Biophysic. Chem.* **3**, ed. Buttler J. A. V., Randall J. I., London Pergamon Press pp. 305–370 (1953).
51. USSING, H. H.: The distinction by means of tracers between active transport and diffusion. *Acta Physiol. Scand.* **19**, 43–56 (1949).