

## FIZOSZTIGMINNEL GÁTOLHATÓ Na- ÉS K-CSERE EMBERI VÖRÖSVÉRTESTEKEN

SZABÓ BÉLA

Közlésre érkezett: 1973. IX. 16.

Taylor, Weller és Hastings 1952-ben közölték, hogy az emberi vörösvértestek K-cseréjét a fizosztigmin gátolja. Lindvig és munkatársai megkísérelték a fizosztigmin kationcserére és a kolineszteráz enzimre gyakorolt hatásait összefüggésbe hozni (Lindvig, Grieg és Peterson 1951). E szerzők megállapításait Parpart és Hoffman (1952) kétségbe vonták. A későbbi utánvizsgálóknak nem sikerült kimutatni a fizosztigmin K-transzportra gyakorolt gátló hatását. (Gárdos, 1954; Kahn és Acheson, 1955; Glynn, 1957a). Újabban Giberman és munkatársai (1973) majom-vörösvértesteken végzett kísérleteikben ismét kimutatták, hogy a K-felvétel fizosztigminnel gátolható.

Kísérleteinkben radioaktív izotópok fölhasználásával tanulmányoztuk a K-ionok befelé irányuló, és a Na-ionok mindkét irányú mozgását.

### *Módszer*

Kísérleteinket friss, heparinnal alvadágátolt, egészséges egyénekből származó emberi vörösvértesteken végeztük. A teljes vért — a levételt követően — 6 percen át  $+2$  °C-on centrifugáltuk ( $g = 1500$ ) majd a plazmát és a fehérsejtteket tartalmazó legfelső sejtréteget eltávolítottuk. A vörösvértest masszát saját térfogatához képest ötszörös mennyiségű hideg (olvadó jégben hűtött) „mosó oldatban” szuszpendáltuk, majd az előbbi módon újra centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk. Ezt a „mosási eljárást” összesen háromszor végeztük el.

A „mosó oldat”: 150 mM NaCl és 5 mM TRIS-foszfát puffert tartalmazott, kivéve amikor a kísérlet megkívánta, hogy a vörösvértestek felszínéről a Na ionokat eltávolítsuk. Ilyenkor a „mosó folyadék” a NaCl helyett 150 mM kolinkloridot tartalmazott.

### A K és Na influx vizsgálata

A mosási eljárást követően a vörösvértesteket a kísérleti terv szerint összeállított hideg izotoniás oldatban szuszpendáltuk arra törekedve, hogy a várható haematokrit 7% körül legyen. A szuszpenziót óvatos mozgatással

kevertük, és az egyenletessé tett szuszpenzióból 2 ml-es mintákat mértünk ki 50 ml térfogatú műanyag centrifuga csövekbe.

A radioaktív —  $^{42}\text{K}$ -ot vagy  $^{24}\text{Na}$ -ot tartalmazó — oldatokat előre elkészítettük és ezekből is 2–2 ml-es mintákat mértünk ki kémcsövekbe. Az ilyen módon előre kimért oldatokat, az előkészített vörösvértest szuszpenzióhoz gyorsan hozzá lehetett tölteni, így nagyszámú minta fölhasználása esetén is a legkorábban és legkésőbbben összetöltött minta inkubálási ideje közötti különbség nem haladta meg a két percet.

A vörösvértest szuszpenziókat mind ez ideig hidegen tartottuk és ezután kerültek a 37 °C-ra beállított termosztátba. Az inkubálási idő végén a mintákat jeges vízfürdőbe helyeztük és hideg „mosó oldattal” 40 ml-re feltöltöttük. Elkeverés után centrifugálás és leszívás útján a mosó oldatot eltávolítottuk. Ezt az eljárást még háromszor megismételtük. Az utolsó centrifugálás után eltávolított „mosó oldat” radioaktivitást nem tartalmazott. A mosott vörösvértesteket 5 ml térfogatú desztillált vízben haemolyzáltuk és a haemolyzátumok radioaktivitását NaJ/Tl-üreges kristályban scintillációs módszerrel, Packard gyártmányú analizátor segítségével meghatároztuk.

Az inkubáló oldatokból vett mintákból azok K és Na tartalmát, valamint radioaktivitását is meghatároztuk. Ezen adatok felhasználásával a haematokrit figyelembevételével, a vörösvértestek által felvett radioaktivitás alapján kiszámítottuk az influxot = 1 liter vörösvértest massa által 1 óra alatt felvett K vagy Na mennyisége (mM).

A haematokrit értékét legalább négy párhuzamosan (Janetzky mikrohaematokrit centrifugával) végzett vizsgálat átlag eredményeiből számítottuk ki. A radioaktív oldatban, az inkubálás megkezdésekor fellépő felszíni adszorpcióból származó hibák kiküszöbölésére az influxot általában két különböző időpontban végzett meghatározás eredményeinek különbsége alapján számítottuk ki, amely kísérlet ismertetésénél erre külön nem térünk ki, az influxot a 45–15 percgig tartó inkubálás alapján nyert értékek különbségéből számítottuk ki.

#### A Na-leadás vizsgálata

Az alvadásgátolt mosott vörösvértesteket 6 órán át tartottuk K-mentes  $^{24}\text{Na}$ -tartalmú 37 °C-os fiziológiás oldatban. Ezután a radioaktív oldatot a vörösvértestek felszínéről centrifugálás útján eltávolítottuk, majd inaktív hideg „mosó oldattal” a vörösvértesteket szuszpendáltuk és ismét centrifugáltuk. Az extracelluláris radioaktivitás teljes eltávolítása után a vörösvértesteket a kívánt teszt-oldatban szuszpendáltuk és 37 °C-os termosztátba helyeztük. Meghatározott időközönként vett mintákból a vörösvértesteket és az inkubáló oldatot centrifugálással elválasztottuk, és radioaktivitásukat megmértük. Az eredmények ismertetésénél a Na leadás jellemzésére a 30 perces

inkubáció végén, a vörösvértetekben maradó  $^{24}\text{Na}$  radioaktivitás és az inkubáció kezdetén a vörösvértetekben levő  $^{24}\text{Na}$  radioaktivitás hányadosát adtuk meg.

A kísérleti részben szereplő valamennyi adatunk több (2–10) párhuzamosan végzett meghatározás átlageredménye.

A kísérletek egész időtartama alatt gondot fordítottunk a haemolízis elkerülésére. A módszer beállítása során spektrofotométerrel mértük a felülúszók 541 nm-nél jelentkező adszorpcióját, a későbbiekben a haemolízist szabad szemmel ellenőriztük. Munkánk során csak haemolízis-mentes mintákon nyert eredményeket használtunk fel.

A kísérleteinkben használt valamennyi vegyszer laboratóriumi tisztaságú volt. A fizosztigmint (Sandoz; USP) szulfát sója ( $M_s = 666,4$ ) formájában használtuk mindig frissen oldva. A ouabaint (Serva; USP  $M_s = 728,8$ ) hidegen tárolt ethanolos törzsoldatból hígítottuk úgy, hogy az alkohol végső koncentrációja ne haladja meg a 0,5 ezreléket. A  $^{24}\text{Na}$  és  $^{42}\text{K}$  izotópokat az MTA Izotóp Intézetéből szereztük be.

A kísérleteinkben használt inkubáló oldat alapösszetétele a következő volt (mM):

$\text{K}^+$  5;  $\text{Na}^+$  145;  $\text{Ca}^{++}$  2;  $\text{Mg}^{++}$  2; Tris 5 (ortofoszforsavval 20 °C-nál pH: 7,4-re titrálva)  $\text{Cl}^-$  156; glucose 10.

Egyes kísérletekben a Na illetve a K koncentrációját változtattuk, a többi alkotórész azonban valamennyi oldatban változatlan volt, ezért a kísérletek ismertetésénél és az ábraszövegeknél az oldatoknak csak a Na és K tartalmát ismertetjük. Alacsony Na-tartalmú és Na-mentes oldatokban az izotoniát kolinklorid hozzáadásával biztosítottuk. A Na-mentesnek nevezett oldataink a szennyeződésből eredően 20–25  $\mu\text{M}$  Na-ot tartalmaztak.

Dolgozatunk szövegében a  $[\text{K}_0]$  és  $[\text{Na}_0]$  szimbólumok a K, ill. a Na extracelluláris koncentrációit jelentik.

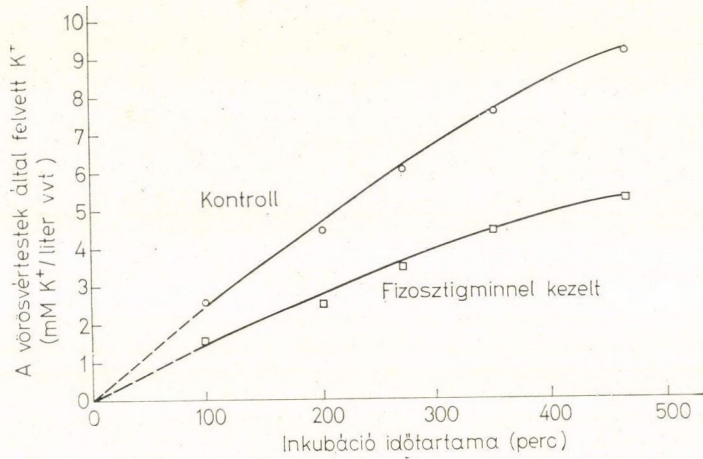
### Eredmények

Kísérleteinkben először magas, 5 mM-os koncentrációban alkalmaztuk a fizosztigmint, mert e szert más szerzők korábban hatástalannak találták az emberi vörösvértetek K-transzportjában (Glynn 1957a).

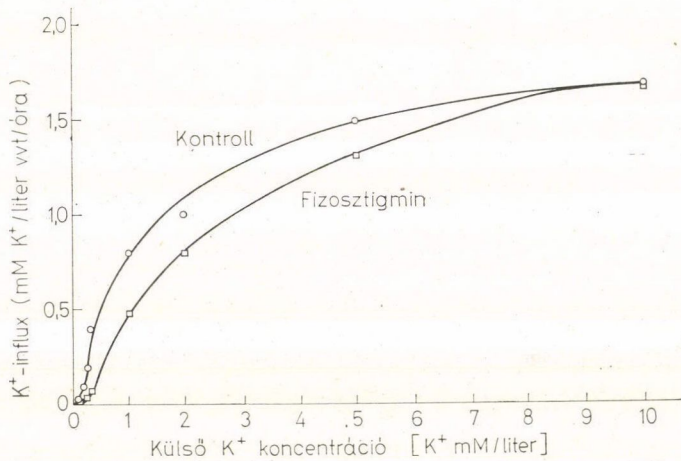
A 37 °C-on 5,8 mM K koncentrációjú Ringerben inkubált vörösvértetek 100, 200, 270, 350 és 470 percig tartó 42-K felvételét vizsgáltuk. Amint az 1. ábrán is látható, e kísérletekben a fizosztigmin gátolta a K-felvételt. A K-belépés — a vizsgált időtartamban — mind a kontroll, mind a kezelt vörösvértetekben megközelítően egyenletes volt. A 100. és 200. perc között fölvett K-mennyiség alapján kiszámított influx értéke 1,22 mM K/liter vvt/óra a kontrollokban, és 0,63 mM K/liter vvt/óra a kezeltékben.

Sachs és Welt (1967), valamint Garrahan és Glynn (1967b) szerint a külső K-koncentráció és a K-influx közötti összefüggés S-alakú görbével írható le.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy 1 mM fizosztigmin az extracelluláris K-koncentráció és a K-influx közötti összefüggést megváltoztatja. A 2. ábrán látható K-influx görbe a kezelés hatására ellapošodott. A fizosztigmin a kezletlen sejtekben mért maximális influxot (1,6 mM K/liter vvt/óra) nem befo-



1. ábra. Kezletlen és 5 mM fizosztigminnel kezelt vörösvértestek K-felvétele. Ordinata: a vörösvértestek által 37° C-on felvett K mennyisége (mM K/liter vvt). Abszcissa: az inkubáció időtartama (perc). A K koncentrációja az inkubáló oldatban: 5,8 mM, a fizosztigmin koncentrációja 5 mM (az alsó görbe jelzi a fizosztigminnel kezelt sejtek K-felvételét)

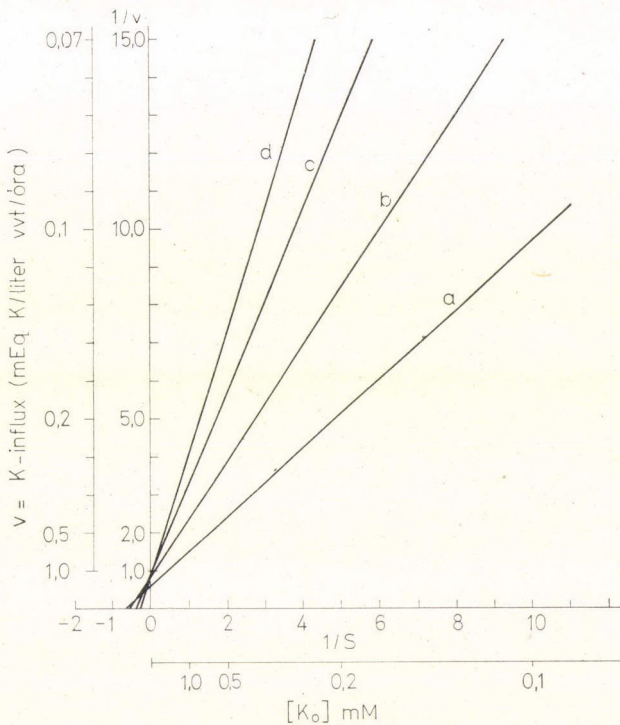


2. ábra. Fizosztigmin hatása a K-influxra különböző K-tartalmú oldatokban. Ordinata: K-influx mM K/liter vvt/óra. Abszcissa: extracelluláris K-koncentráció (mM). Az inkubáló oldat 140 mM NaCl-t és 10 mM kolin-kloridot tartalmazott. A K hozzáadásakor a kolin koncentrációját azonos mértékben csökkentettük. A fizosztigmin koncentrációja 1 mM. Alsó görbe: fizosztigminnel kezelt vörösvértestek.

lyásolta, ezzel szemben a maximális influx félértékéhez tartozó K-koncentrációt 1,0–1,5 mM  $[K_0]$ -ról 2,0 mM  $[K_0]$  fölé emelte.

A továbbiakban részletesebben tanulmányoztuk a K-influxot különböző gátló szer és extracelluláris K-koncentrációk jelenlétében. Az ilyen módon nyert eredmények alapján Lineweaver Burk rendszerben olyan egyeneseket lehetett szerkeszteni, amelyek hiba-határon belül közös pontban metszik az  $1/v$  tengelyt (3. ábra). A  $V_{max}$  számított értéke 2,6 mM K/liter vvt/óra körül van, függetlenül a gátló szer jelenlététől. A  $K_M$  számított értéke 2,5 és 9,6 mM  $[K_0]$  között változik, ha a fizosztigmin koncentrációját 0 és 10 mM között növeljük.

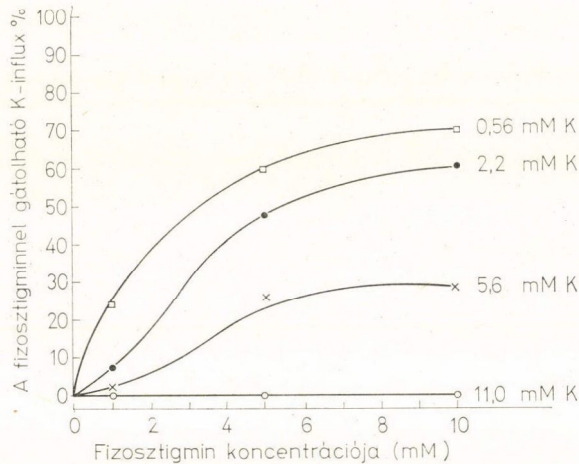
Ezek az összefüggések kompetitív gátlásra utalnak a K-ionokat megkötő transzport-helyeken, vagy a membrán egyéb helyein, amelyek a transzport rendszer aktiválódásáért felelősek.



3. ábra.  $K^+$ -influx a külső kálium koncentráció függvényében kettős reciprok ábrázolásban, különböző koncentrációjú gátló szer jelenlétében. A fizosztigmin koncentrációja  $a = 0$  mM;  $b = 1$  mM;  $c = 5$  mM;  $d = 10$  mM. A kísérletben a K koncentrációját 0,075 és 11,1 mM között változtattuk. Az egyeneshez tartozó regressziós egyenletek:  $y = a (\pm SE) + b (\pm SE) x$

a) $a = 0,3850 \pm 0,0360$	$b = 0,9624 \pm 0,0223$	$n = 19$
b) $a = 0,3855 \pm 0,0854$	$b = 1,6560 \pm 0,0489$	$n = 16$
c) $a = 0,4121 \pm 0,2607$	$b = 2,5630 \pm 0,1330$	$n = 13$
d) $a = 0,3668 \pm 0,1322$	$b = 3,5429 \pm 0,1410$	$n = 9$

A kompetícióra utaló adatainkat olyan kísérletben nyertük, melyek során a  $[K_0]$  nem volt magasabb, mint 5 mM, ezzel szemben a K-influx fizosztigmin iránti érzékenysége magasabb K-tartalmú oldatokban jobban csökkent, mint az a K és fizosztigmin kompetíciója alapján várható volna.



4. ábra. Összefüggés a fizosztigmin koncentrációja és a gátló hatása között, különböző  $[K_0]$  tartalmú oldatokban. Az ordinátán a fizosztigminnel gátlható K-influxot a kontroll vörösvértetekben mért influx százalékában fejeztük ki (bővebben l. a szövegben). Abszcissza: a fizosztigmin koncentrációja. A K extracelluláris koncentrációját (0,56, 2,2, 5,6, 11 mM) az egyes görbék mellett az ábrán jeleztük. Az ábrát egyugyanazon vörösvértest populáción egyidejűleg végzett kísérlet adatai alapján szerkesztettük.

A 4. ábra ordináta értékeit az alábbi összefüggés alapján számítottuk ki:

$$\frac{M_K^i - M_F^i}{M_K^i} \times 100$$

ahol az

$$M_K^i$$

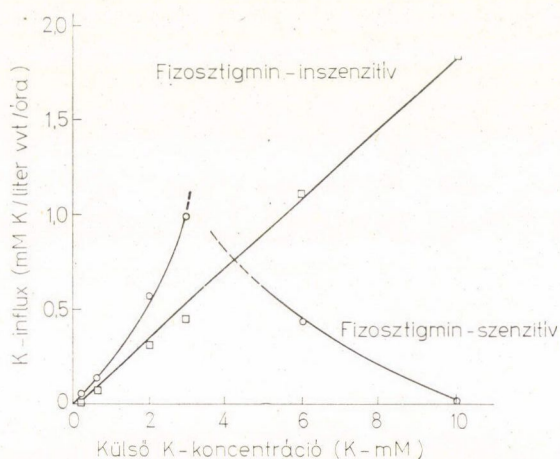
a kezeletlen vörösvértetekben mér K-influx, a feltüntetett  $[K_0]$  mellett,

$$M_F^i$$

a fizosztigminnel kezelt vörösvértetekben mért K-influx, a feltüntetett  $[K_0]$  mellett.

A 4. ábrán látható, hogy a fizosztigmin-koncentráció függvényében ábrázolt valamennyi vizsgált extracelluláris K-koncentrációhoz tartozó gátlási görbe derékszögű hiperbolához, ill. S-alakhoz hasonló. A fizosztigmin 10 mM koncentrációban alkalmazva gátló hatásának maximumát fejtette ki mind 0,56, 2,2 és 5,6 mM  $[K_0]$  jelenlétében, míg ezeknél a K-koncentrációknál a kontroll influxnak maximálisan 70, 61, ill. 28 százaléka volt gátlható fizosztigminnel.

Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy alacsonyabb  $[K_0]$  tartományban a K-ionok részben olyan mechanizmus útján lépnek be a vörösvértestekbe, amely — a koncentráció viszonyoktól függően — fizosztigminnel gátolható, míg a  $[K_0]$  növelésével egy fizosztigminnel nem gátolható mechanizmus válik kizárólagossá.



5. ábra. A fizosztigminnel gátolható és nem gátolható K-influx a külső K-koncentráció függvényében. Ordinata: a 10 mM fizosztigmin jelenlétében mért K-influx, mint „alkaloida érzéketlen influx”. A kontroll és a 10 mM fizosztigmin jelenlétében mért influxok különbségét, mint fizosztigmin-érzékeny influxot ábrázoltuk Abszcissza:  $[K_0]$  mM.

Az 5. ábrán a fizosztigminnel nem gátolható és gátolható K-influxot tüntettük fel a  $[K_0]$  függvényében. Az előbbi mértékének a 10 mM fizosztigmin jelenlétében mért influxot tekintettük. Kísérleteink tanúsága szerint a fizosztigmin ennél a koncentrációnál gátló hatásának maximumát fejt ki, anélkül, hogy haemolizist okozna. A kezeletlen kontrollokban és a 10 mM fizosztigminnel kezelt vörösvértestekben egyidejűleg mért K-influxok különbségét ábrázoltuk mint fizosztigmin-érzékeny K-influxot.

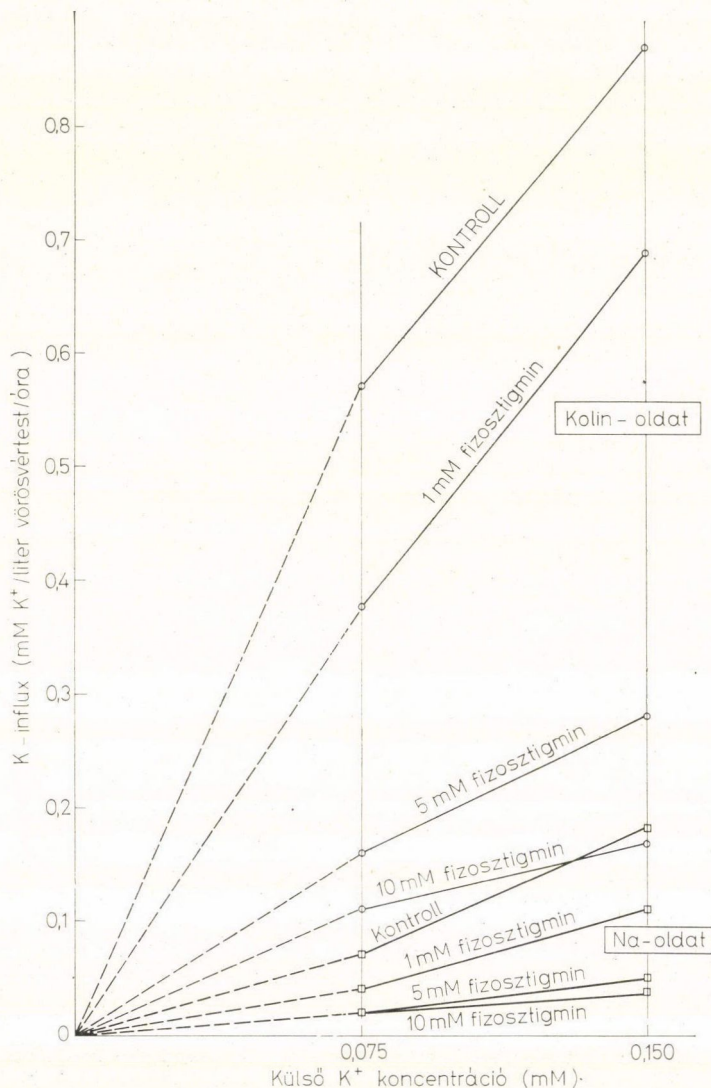
E vizsgálatokból kitűnik, hogy a fizosztigmin-érzéketlen K-influx alacsony  $[K_0]$  esetén lineárisan változik a külső K koncentráció függvényében. A fizosztigminnel gátolható K-influx ezzel szemben a 2,0–4,0 mM  $[K_0]$  között maximumot mutat, melynek értéke 0,8 mM K/liter vvt/óra (a mérési pontok elhelyezkedése miatt kissé bizonytalan érték).

#### A Na-ionok hatása a fizosztigminnel gátolható és nem gátolható K-influxra

Garrahan és Glynn (1967b) közölték, hogy alacsony K-koncentrációjú oldatokban tartott vörösvértestek K-felvétele jelentősen fokozódik, ha az extracelluláris Na-ot kolinnal helyettesítjük.

Megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a fizosztigmin K-influxra gyakorolt gátló hatását az inkubáló oldat Na-tartalma. Kísérleteink során 0,075 mM  $[K_0]$

jelenlétében 8,0-szorosára fokozódott, 0,15 mM  $[K_0]$  esetén pedig 4,8-szeresére emelkedett mind a kontroll, mind a 10 mM fizosztigminnel kezelt sejtekben a K-influx, ha az extracelluláris Na-ot equimoláris mennyiségű kolinnal helyettesítettük (6. ábra).



6. ábra. Fizosztigmin és Na-ionok hatása a fizosztigminnel gátlható és nem gátlható K-influxra alacsony  $[K_0]$  jelenlétében. Ordinata: K-influx (mM K/liter vvt/óra). Abszcissza: extracelluláris K koncentráció (mM K). Az inkubáló oldatok 150 mM kolint, vagy 140 mM Na-t és 10mM kolint tartalmaztak. A fizosztigmint 1,0; 5,0; 10,0 mM koncentrációban alkalmaztuk (az egyes görbékhez tartozó fizosztigmin koncentrációkat az ábrán feltüntettük). A fizosztigmin hozzáadása során az izotónia fenntartására az oldatok kolin-tartalmát csökkentettük. A „Na-mentes” kolin-oldat szennyeződéséből eredő Na-tartalma — a lángfotometriás ellenőrzés szerint — nem haladta meg a 20  $\mu$ M-t.



A 6. ábra egyes adatait a II. táblázatban is közöljük. Látható, hogy a 0,15 mM  $[K_0]$  esetén Na-mentes oldatban 10 mM fizosztigmin azonos mértékben gátolja a K-influxot, mint a 140 mM koncentrációjú nátrium, fizosztigminmentes oldatban. A 10 mM fizosztigminnel kezelt és nem kezelt sejtek K-felvételének aránya megegyezett a Na-tartalmú és Na-mentes oldatokban.

## II. táblázat

*Na-ionok hatása a fizosztigminnel gátolható és nem gátolható K-influxra*

Oldat: $[K_0] = 0,15$ mM	K-influx mM/liter vvt/óra $\pm$ S. D.
Na-mentes	0,87 $\pm$ 0,0057
Na-mentes + 10mM fizosztigmin	0,16 $\pm$ 0,05
140 mM Na	0,18 $\pm$ 0,041
140 mM Na + 10 mM fizosztigmin	0,04 $\pm$ 0,0042

Kísérleti feltételeink nem tették lehetővé, hogy megfelelő pontossággal mérjük a 0,075 mM-nál alacsonyabb K-koncentrációjú oldatokban az influxot, ezért a 6. ábrán a 0,075  $[K_0]$ -hoz tartozó mérési pontokat szaggatott vonallal kötöttük össze az origóval, így szemléltetve a Na-hatását, amely a K-influxot az egyes  $[K_0]$  értékeknél nem arányosan csökkentette, és így megváltoztatta a K-influx görbék meredekségét.

### A fizosztigmin és a ouabain gátló hatásának összehasonlító vizsgálata

A ouabain a kation pumpa jólismert gátló szere (Glynn 1957b). További kísérleteinkben ugyanazon vörösvértest-populációból származó mintákon hasonlítottuk össze a fizosztigmin és a ouabain K-influxot gátló hatását. A maximális gátló hatás eléréséhez a fizosztigmint lényegesen nagyobb moláris koncentrációban kell használni, mint a ouabaint. (4. ábra). Kísérleteinkben a ouabaint  $10^{-5}$  M, a fizosztigmint  $10^{-3}$  M koncentrációban alkalmaztuk. A K-influxot 5,0, 1,5 és 0,075 mM  $[K_0]$  jelenlétében tanulmányoztuk (7. ábra). A ouabain valamennyi kísérletünkben hatásosabban gátolta a K-influxot, mint a fizosztigmin. Ha a K koncentrációja 0,075 mM volt, a kezeletlen vörösvértestekben mért influx 51,00 ( $\pm 0,64$ )  $\mu$ M K/liter vvt/óra, aminek a fizosztigmin 47%-át, a ouabain pedig 71%-át gátolta.

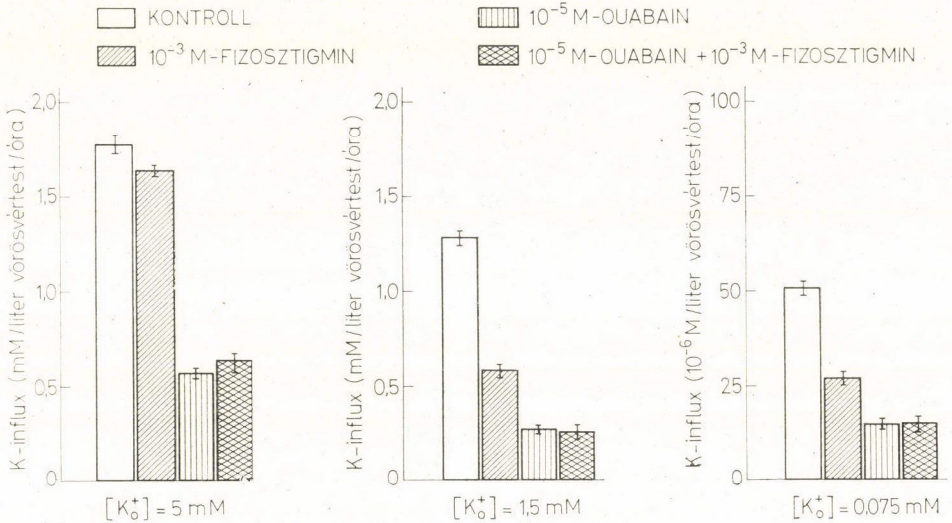
Ha a két szert együttesen alkalmaztuk, a hatás sohasem haladta meg a ouabain által egymagában kiváltott gátlás mértékét. Alacsony  $[K_0]$  esetén a ouabain jelenlétében mért influx 14,6 ( $\pm 0,39$ ), ouabain és fizosztigmin együttes jelenlétében pedig 14,6 ( $\pm 0,45$ )  $\mu$ M K/liter vvt/óra volt.

### Fizosztigmin hatása a Na-influxra és a Na-leadásra

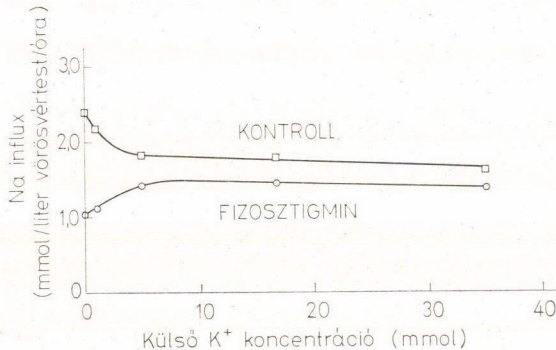
Ismertetett kísérleteinkben azt találtuk, hogy mind a fizosztigmin, mind az extracelluláris Na ionok gátolják a K-influxot, ha a K extracelluláris

koncentrációja alacsony. Együttes alkalmazás esetén a két gátló anyag erősítette egymás hatását (7. ábra). Mindezek alapján fölvetődött, hogy van-e hatása a fizosztigminnek és az extracelluláris K-ionoknak a Na-influxra.

A Na-influxot különböző K-koncentrációjú oldatokban vizsgáltuk. Magas  $[K_0]$  jelenlétében a fizosztigmin csak kevésbé befolyásolta a Na-ionok belépését, ezzel szemben K-mentes oldatban  $10^{-3}$  M fizosztigmin a kontroll influx 50%-át gátolta. (8. ábra).



7. ábra. Fizosztigmin ( $10^{-3}$  M) és ouabain ( $10^{-5}$  M) hatása a K-influxra. Az oszlopok magassága a K-influxot jelzi. A különböző K-koncentrációkhoz tartozó influxokat nem azonos léptékben ábrázoltuk. Az első két oszloposoporthoz: mM K/liter vvt/óra, a harmadik oszloposoporthoz  $\mu$ M K/liter vvt/óra. Az oszloposoporthoz tartozó extracelluláris K-koncentrációkat az ábrán feltüntettük:  $[K_0] = 5,0; 1,5; 0,075$  mM.



8. ábra. Fizosztigmin hatása a Na-influxra. Az inkubáló oldat 115 mM NaCl-t és 35 mM kolinkloridot tartalmazott. K-tartalmú oldatokban a kolin koncentrációját az izotónia által megkívánt mértékben csökkentettük. Felső görbe: kontroll influx; alsó görbe: 1 mM fizosztigmin jelenlétében mért influx.

Garrahan és Glynn (1967a, b, c) megfigyelései szerint K-mentes oldatban a kation-pumpa működése megváltozik. E mechanizmus — fiziológias körülmények között — K : Na cserét katalizál, K-mentes oldatokban azonban a pumpa Na-ionokat szállít a vörösvértetek belseje felé is. Kísérleti adataink alapján föltételezhető, hogy a fizosztigmin a Na : Na cserét katalizáló pumpa mechanizmus gátlása révén csökkentette a Na-influxot. E föltételezés helyességét kívántuk ellenőrizni, amikor megvizsgáltuk, hogy van-e a fizosztigminnek hatása a Na-leadásra is.

A Na-ionok koncentráció gradiense ellenében jutnak ki a vörösvértetekből, a Na-pumpa működése révén. Fiziológias körülmények között az intracelluláris Na-ionok leadása és az extracelluláris K-ionok fölvétele ugyanazon mechanizmus által, összekapcsoltan megy végbe.

A Na-pumpa fizosztigmin iránti érzékenységét különféle összetételű oldatokban vizsgáltuk (9. ábra). A 10 mM K-ot tartalmazó oldatokban a K : Na cserét katalizáló mechanizmust tanulmányoztuk. (9. ábra A, B, C). A fizosztigmin, 1 mM-os koncentrációban alkalmazva, ezt a folyamatot gátolta, függetlenül attól, hogy tartalmazott-e az extracelluláris oldat Na-ot vagy sem. Ugyanilyen koncentrációjú fizosztigmin 10 mM  $[K_0]$  jelenlétében a K-influxot ezzel szemben nem gátolta. (2. és 4. ábra).

K-mentes, Na-tartalmú oldatokban, amikor a pumpa mindkét irányba Na-ionokat szállít, a fizosztigmin ugyancsak gátolta a Na-leadást. A 9. ábrán feltüntetett adatok (B és C) azt mutatják, hogy K-mentes oldatban a fizosztigmin a teljes Na-leadás nagyobb hányadát gátolja, ha a Na extracelluláris koncentrációja magas (135 mM), mintha alacsony (5 mM).

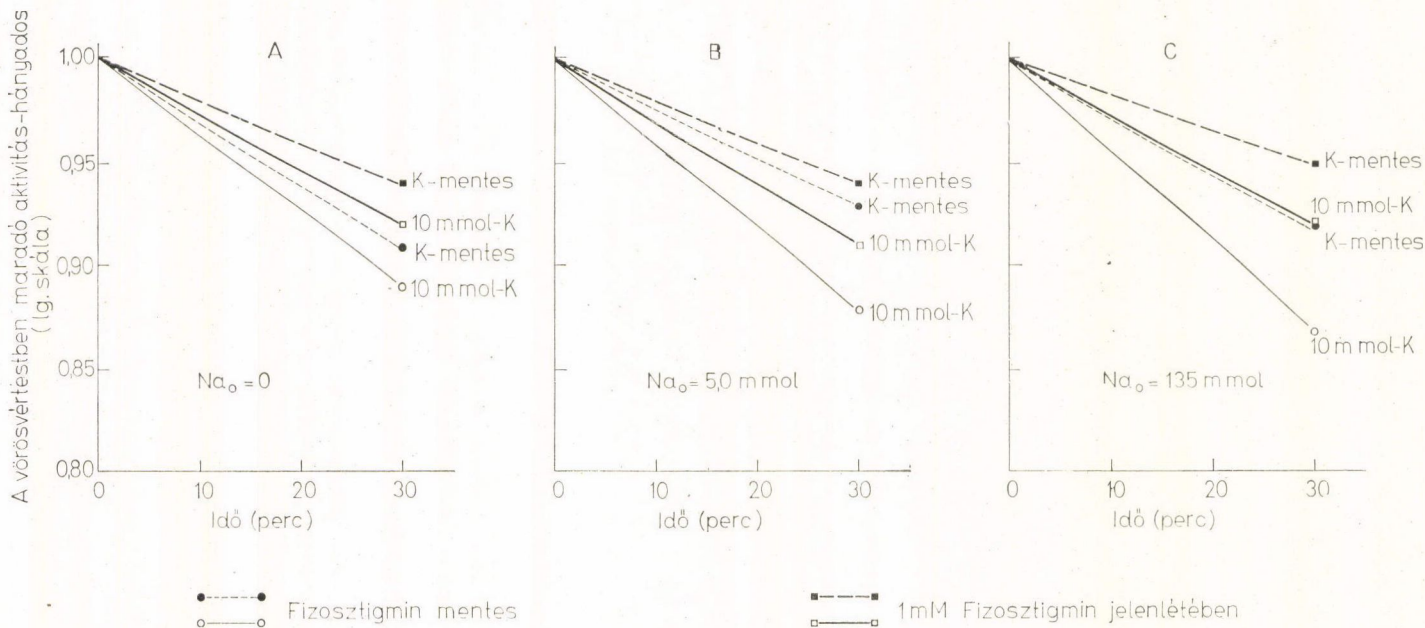
Mind ez ideig tisztázatlan, hogy az olyan oldatokban, amelyekben a Na és K teljes mennyiségét kolinnal helyettesítettük, milyen mechanizmus révén kerülnek ki a vörösvértetekből a Na-ionok (Garrahan és Glynn 1967a; Hoffmann és Kregenow 1966). Kísérleteinkben a fizosztigmin hatásosan gátolta a Na-leadást K- és Na-mentes, kolin-tartalmú oldatban is (9. ábra A).

#### A fizosztigmin gátló hatásának hő-koefficiense

Általában feltételezik, hogy magas látszólagos aktivációs energia a transzport-folyamatokban aktív, anyagcserétől függő mechanizmusra utal (Tosteson 1955).

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a K- és a Na-influxot 27 és 37 °C-on, 5 mM koncentrációjú fizosztigmin jelenlétében és fizosztigmin-mentes közegben.

A K-influx meghatározására használt inkubáló oldat 0,75 mM K-ot és 150 mM Na-ot tartalmazott. Az eredményeket a III. táblázatban közöljük. A fizosztigminnel gátolható K-influx 2,69-szeresére növekedett, ha a hőmérsékletet az influx mérése alatt 27 °C-ról 37 °C-ra növeltük.



9. ábra. Furosztimin ( $10^{-3}$  M) hatása a Na-leadásra különböző extracelluláris Na- és K- koncentrációjú oldatokban. A kísérleti eljárás részletes ismertetését l. a „Módszer” fejezetben. Ordinata: a 30 percig tartó leadási periódus végén a vörösvértestekben talált, valamint a leadatási periódus kezdetén a vörösvértestekben meghatározott  $^{24}\text{Na}$ -ból eredő radioaktivitás hányadosainak logaritmusai. Az ábrán szereplő három grafikon adatai ugyanazon vörösvértestpopuláció végzett kísérletekből származnak. A-grafikon: kolin oldatban ( $[\text{Na}_o] = 20 \mu\text{M}$ ) mért Na-leadás. B-grafikon: 5,0 mM Na-tartalmú oldatban mért Na-leadás. C-grafikon: 135 mM Na-tartalmú oldatban mért Na-leadás. A Na-leadás vizsgálata során alkalmazott oldatok K-tartalmát az egyes görbék mellett feltüntettük. Az izotónia fenntartására kolinat használtunk.

## III. táblázat

A fizosztigminnel gátolható és nem gátolható K-influx hőmérséklet függése

K <sup>+</sup> -influx mM K/liter vvt/óra			
	Kontrollinflux A	5 mM fizosztigmin jelenlétében mért influx B	Fizosztigminnel gátolt influx A-B
27° C	0,31	0,08	0,23
37° C	0,80	0,18	0,62

A Na-influxot K-mentes oldatban vizsgáltuk. A Na extracelluláris koncentrációja 150 mM, a fizosztigminé 5 mM volt. A 27, ill. 37 °C-nál mért influxok a IV. táblázatban találhatók.

## IV. táblázat

A fizosztigminnel gátolható és nem gátolható Na-influx hőmérséklet függése

Na-influx mM Na/liter vvt/óra			
	Kontroll A	5 mM fizosztigmin jelenlétében B	Fizosztigminnel gátolt A-B
27° C	0,83	0,40	0,43
37° C	2,18	1,15	1,03

A fizosztigminnel gátolható Na-influx 2,39-szeresére növekedett 10 °C hőmérséklet-emelés hatására.

A vörösvértest membránban a kation-csere mechanizmusa túlságosan komplex ahhoz, hogy a hőmérséklet-változtatás hatását pontosan elemezhesük. Azonban a fizosztigminnel gátolható K- és Na-influx  $Q_{10}$  értékének eltérése mégis arra utalhat, hogy a fizosztigmin és a Na-influx, valamint a fizosztigmin és a K-influx közötti kölcsönhatás különbözik.

## Megbeszélés

Megállapítottuk, hogy a fizosztigmin gátolja valamennyi vizsgált ioncsere-folyamatot — megfelelő kísérleti körülmények között.

A fizosztigmin elsősorban alacsony  $[K_0]$  esetén gátolta a K-influxot, ezzel szemben nagy koncentrációban alkalmazva is hatástalanná vált, ha a K extracelluláris koncentrációja meghaladta a 10mM-t. Kísérleteinkben észlelt legnagyobb mértékű gátlás esetén a kontroll K-influxot 0,3-szeresére csökkentette. Magas, 10 mM koncentrációjú fizosztigminnel mintegy 0,8 mM K/liter

vvt/óra értékű influx komponens gátolható, ha a  $[K_0]$  2 és 4 mM között van (5. ábra). Ez az adat azért figyelemre méltó, mert csaknem a felét teszi ki a  $[K_0]$  emelésével elérhető maximális influxnak.

Kezeletlen vörösvértestekben a  $[K_0]$  emelésével a K-influx hiperbolikusan emelkedik (2. ábra), a fizosztigmin ezzel szemben, az influx-görbét ellaposítja. Ha a gátlószer koncentrációja 10 mM, az influx a  $[K_0]$  lineáris függvényévé válik, amikor a  $[K_0]$  nem nagyobb, mint 10 mM. A K-influx —  $[K_0]$  összefüggés elveszti ezáltal a Michaelis összefüggésekre emlékeztető jellegét, amely a carrier által közvetített aktív transzport-folyamatokra jellemző. A megfigyelés arra utal, hogy a fizosztigmin a K aktív transzportját gátolja. Ebben a tekintetben hatását összehasonlítva a ouabainnal, megállapítható, hogy a fizosztigmin kevésbé gátolja a K-transzportot, mint a ouabain, együttes alkalmazásuk esetén azonban hatásuk nem összegződik, hanem mindig a ouabainra jellemző mértékű gátlás érvényesül (7. ábra). Az egyes szövetféleségekben a K-influx érzékenysége a ouabain, ill. a fizosztigmin iránt érdekes módon különbözik. Így Szabó és Kovács (1971) kimutatták, hogy harántcsikolt békaizmon a fizosztigmin sokkal hatásosabban gátolja a K-felvételt, mint a ouabain.

Alacsony  $[K_0]$  tartományban a fizosztigmin több mint 50 százalékát gátolja a K-influxnak. A  $[K_0]$  emelése során (0 és 4 mM  $[K_0]$  között) a fizosztigmin-szenzitív influx jobban aktiválódik, mint a fizosztigmin-inszenzitív. Ebben az alacsony K-tartományban a fizosztigmin az extracelluláris K-ionokkal kompetícióban van és ezáltal gátolja a K-influxot. A fizosztigmin hatására a számított  $V_{max}$  változatlan marad, míg az  $1/2 V_{max}$ -hoz tartozó  $[K_0]$  értékek emelkednek.

Nem tudjuk, hogy a K-ionok és a gátlószer közötti kompetíció a transzport reakció melyik ciklusában játszódik le.

A fizosztigmin K-influxra gyakorolt gátló hatása emlékeztet az extracelluláris Na-ionok által kifejtett gátlásra. Emellett szól, hogy a fizosztigmin a kísérleteinkben alkalmazott H-ion koncentrációnál (pH 7,4) teljes egészében kationos formában van (Wilson, 1957). Ismeretes továbbá, hogy a kationokat transzportáló rendszer K-kötő helyei meglehetősen kevésbé szelektívek és a K helyett más ionokat is képesek megkötni, ill. transzportálni (Love és Burck, 1953; Post és Jolly, 1957; McConaghey és Maizels, 1962). Kimutatták azt is, hogy a vörösvértestek a fizosztigmin is akkumulálják a környezetükből és az extracelluláris K-ionok ezt a folyamatot gátolják (Christensen és Riggs, 1951).

A fizosztigmin a Na-influxot is gátolta kísérleteinkben. Garrahan és Glynn (1967a, b, c) megállapításai szerint K-mentes, Na-tartalmú oldatban inkubált vörösvértestekben a transzport rendszer Na:Na cserét katalizál. A 8. ábrán bemutatott kísérleteinkben azt találtuk, hogy ugyancsak K-mentes körülmények között 1 mM fizosztigmin a Na-influxot felére csökkentette.

Eszerint a fizosztigmin nemcsak a K-ionokkal lép kompetícióba a kation-kötő helyeken, hanem a Na : Na cserét végző transzport-rendszerről a Na-ot is leszorítja.

Alacsony  $[K_0]$  tartalmú oldatokban az extracelluláris Na-ionok jelentős mértékben csökkentik a K-influxot. Sachs és Welt (1967), valamint Garrahan és Glynn (1967b) transzportkinetikai vizsgálatai arra utaltak, hogy a K carrier két kation-kötő hellyel rendelkezik, amelyek közül az egyik K-tartalmú oldatban csak K-ot köt meg, míg a másik kötő-helyért alacsony K-koncentrációjú oldatokban a Na-ionok is versengenek.

Ezek alapján tehát föltételezhető volna, hogy a K carrier egyik kötőhelyén a K és Na ionokon kívül a fizosztigmin is verseng a kötődésért. A II. táblázatban közölt eredményeink azonban úgy látszik, hogy ellentmondanak e föltételezésnek; e kísérletben a fizosztigmin is és az extracelluláris Na-ionok is, külön-külön mintegy 1/5-ére csökkentették (0,87-ről 0,18 mM K/liter vvt/óra-ra) a kolin oldatban mért K-influxot. A fizosztigmin és a Na együttes alkalmazására a K-influx kevesebb, mint 1/20-ára (0,87-ről 0,04 mM K/liter vvt/óra-ra) csökkent a Na-mentes körülmények között mért kontroll influxhoz képest.

A fizosztigmin és a Na-ionok tehát egymástól független támadásponton gátolják a K-influxot. E megállapítást az is alátámasztja, hogy a fizosztigmin Na-leadásra gyakorolt hatása független a K extracelluláris koncentrációjától. A 9. ábrán bemutatott kísérletek szerint a Na-leadás gátlása olyan körülmények között is bekövetkezik, amikor sem a K, sem a Na influxban nem észleltünk gátlást.

Valamennyi kísérleti adatunk egybevetése alapján valószínűnek látszik, hogy a fizosztigmin nem, vagy pedig nemcsak a carrier molekula K-kötő helyein lép versengésbe a K-ionokkal, hanem a transzport-rendszer aktiváló mechanizmusát bénítja.

A K-ionok transzportjuk során aktiválják a Na-pumpát, ill. a transzportban fontos szerepet játszó ATPáz enzim-aktivitását, ezáltal gyorsítják mind a saját, mind a Na-ionok transzportját. Ez idő szerint nem ismert, hogy az aktiváló helyek azonosak-e magukkal a transzportáló helyekkel. Kísérleteink alapján valószínűnek látszik, hogy a két hely egymástól különbözik, és a fizosztigmin az aktiváló helyeken fejt ki gátló hatását.

### Összefoglalás

A 42-K-felvételt, valamint a 24-Na-felvételt és leadást tanulmányozták  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  M fizosztigminnel kezelt és kezeletlen, friss, mosott, emberi vörösvértesteken. A fizosztigmin mind a három vizsgált ionmozgást gátolta.

A fizosztigmin K-influxra gyakorolt hatása függ a K extracelluláris koncentrációjától ( $[K_0]$ ). A  $[K_0]$  függvényében ábrázolt K-influx S-alakot

ölt, amely fizosztigmin jelenlétében ellaposodik. A Lineweaver-Burk rendszerben ábrázolt eredmények a fizosztigmin és az extracelluláris K-ionok közötti kompetícióra utaltak, ha a  $[K_0]$  alacsonyabb volt, mint 5 mM. A K-influx  $V_{\max}$  értéke valamennyi esetben 2,6 mM K/liter vvt/óra körüli volt, míg a számított  $K_M$  2,5 és 9,6 mM  $[K_0]$  között változott a fizosztigmin koncentrációtól függően (0–10 mM). A fizosztigmin-érzékeny K-influx a  $[K_0]$  emelésével fokozódik és 2 mM  $[K_0]$ -nál eléri maximális értékét (0,8 mM K/liter vvt/óra). A  $[K_0]$  további növelésével a K-influx érzékenysége fokozatosan csökken és 10 mM  $[K_0]$ -nál megszűnik.

A ouabain ( $10^{-5}$  M) hatásosabban gátolja a K-influxot, mint a fizosztigmin ( $10^{-3}$  M). A két gátlószer együttes alkalmazása során hatásuk nem összegződik, hanem mindig a ouabainra jellemző gátlás érvényesül.

Alacsony  $[K_0]$  esetén, ha az extracelluláris Na-ot kolinnal helyettesítjük, a K-influx 4–8-szorosára emelkedik. A fizosztigmin a Na-mentes oldatokban is gátolja a K-influxot. Az  $[Na_0]$  változtatása a fizosztigmin-szenzitív és inszenzitív K-influx arányát nem változtatja meg, szemben a külső K-mal.

A Na-influxot  $10^{-3}$  M fizosztigmin felére csökkenti K-mentes oldatban, a  $[K_0]$  növelésével a gátlás mértéke csökken.

A 24-Na leadást valamennyi vizsgált körülmény között gátolta a fizosztigmin ( $10^{-3}$  M), tehát olyan oldatokban is, amelyekben a Na vagy K influxot nem befolyásolta.

A kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy a fizosztigmin a ouabain-szenzitív kationcsere valamely részfolyamatát gátolja, feltehetően olyan módon, hogy kompetitíve leszorítja a K-ionokat a transzport rendszert aktiváló kötőhelyekről.

Több mint 20 éve ismeretes, hogy a fizosztigmin és egyéb kolineszteráz gátlók hatást gyakorolnak a különböző szövetek kation-transzportjára (Bullock és mtsai 1946, 1947; Rothenberg 1950; Kirschner 1953; Wright 1956).

Kovács és Szabó (1971) újabban közölték, hogy Na-mentes közegbe helyezett, izolált békaizmok Na-leadásának 60%-a fizosztigminnel gátolható, ha az izmok intracelluláris Na koncentrációja viszonylag magas, ezzel szemben alacsony Na-tartalmú izmokban a fizosztigmin nem befolyásolta a Na-leadást.

Emberi vörösvértesteken végzett vizsgálatok ellentmondó eredményeit Glynn (1957a) foglalta össze, aki saját kísérleteiben a fizosztigmint hatástalannak találta.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a fizosztigmin hatásosan gátolja a kálium fölvételt az emberi vörösvértestekben, ha a kálium koncentrációja az extracelluláris térben alacsony. Ilyen körülmények között a fizosztigmin és az extracelluláris K ionok között kompetitív jelenségek észlelhetők.

A fizosztigmin a Na-influxot is gátolja K-mentes, vagy alacsony K-tartalmú oldatokban, ezzel szemben a Na-leadást mind K-mentes, mind pedig magas K-tartalmú oldatokban csökkenti.



Köszönetemet nyilvánítom Dr. Kovács Tibornak a kísérletek kivitelezése és a kézirat elkészítése során nyújtott hasznos tanácsaiért, Dr. Lengyel Imrénének a kézirat megírásában és Oláh Istvánnak a kísérletek kivitelezésében nyújtott technikai segítségéért.

## IRODALOM

- Bullock, T. H., Nachmansohn, D. és Rothenberg, M. A.: J. Neurophysiol. **9**, 9 (1946).  
 Bullock, T. H., Grundfest, H., Nachmansohn, D. és Rothenberg, M. A.: J. Neurophysiol. (**10**, 63 (1947)).  
 Christensen, N. H. és Riggs, T. R.: J. Biol. Chem. **193**, 621 (1951).  
 Gárdos, Gy.: Acta Physiol. Hung. **6**, 191 (1954).  
 Garrahan, P. J. és Glynn, I. M.: J. Physiol. (Lond.) **192**, 159 (1967).  
 Garrahan, P. J. és Glynn, I. M.: J. Physiol. (Lond.) **192**, 175 (1967).  
 Garrahan, P. J. és Glynn, I. M.: J. Physiol. (Lond.) **192**, 189 (1967).  
 Gibermann, E., Silman, I. és Ederly, H.: Biochem. Pharmacol. **22**, 271 (1973).  
 Glynn, I. M.: Progr. Biophys. **8**, 242 (1957/a).  
 Glynn, I. M.: J. Physiol. (Lond.) **136**, 148 (1957/b).  
 Hoffman, J. F. és Kregenow, F. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **137**, 566 (1966).  
 Kahn, J. B. és Acheson, G. H.: J. Pharmacol. **115**, 305 (1955).  
 Kirschner, L. B.: Nature (Lond.) **172**, 348 (1953).  
 Kovács, T. és Szabó, B.: Acta Physiol. Hung. **40**, 13 (1971).  
 Lindvig, P. E., Grieg, M. és Peterson, S. W.: Arch. Biochem. **30**, 241 (1951).  
 Love, W. D. és Burck, G. E.: J. Lab. Clin. Med. **41**, 337 (1953).  
 McConaghey, P. D. és Maizels, M.: J. Physiol. (Lond.) **162**, 485 (1962).  
 Parpart, A. K. és Hoffman, J. F.: Fed. Proc. **11**, 117 (1952).  
 Post, R. L. és Jolly, P. C.: Biochim. Biophys. Acta **25**, 118 (1957).  
 Rothenberg, M. A.: Biochim. Biophys. Acta **4**, 96 (1950).  
 Sachs, J. R. és Welt, L. G.: J. Clin. Invest. **46**, 65. (1967).  
 Szabó, B. és Kovács, T.: Proc. Internat. Union Physiol. Sci. Vol. IX. 1633. abstr. (1971).  
 Taylor, J. M., Weller, J. M. és Hastings, A. B.: Amer. J. Physiol. **168**, 658 (1952).  
 Tosteson, D. C.: Sodium and potassium transport in red blood cells In: Electrolytes in biological systems (Ed: Shanes, A. m.) pp. 123–156. Washington. (1955).  
 Wilson, I. B.: Specificity in cholinesterase reactions. In: Molecular structure and biological specificity (Ed: Pauling, L., Itano, H. A.) pp. 174–195. Washington D. C., (1957).  
 Wright, E. B.: Amer. J. Physiol. **184**, 209 (1956).