

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

"ÓRIÁS IDEGSEJTMEMBRÁNOK IONPERMEABILITÁSÁNAK
ANYAGCSERE FÜGGÉSE"

Készítette:

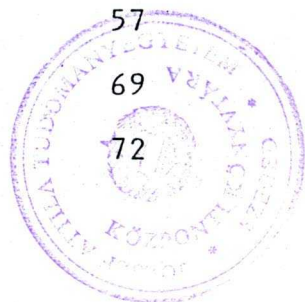
Vadász István

Veszprém, 1986.december 13.



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A nyugalmi potenciál és az anyagcsere- folyamatok kapcsolata	6
2.2. A membránpermeabilitás analitikus vizsgálata	12
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	17
4. EREDMÉNYEK	24
4.1. A bimodális pacemaker potenciál- generálás általános jellemzői	24
4.2. Tetrodotoxin hatása az RPa1 neuron spontán aktivitására és ionáramaira	27
4.3. Tetraetilammónium-klorid (TEA-Cl) hatása az RPa1 neuron spontán aktivitására és ionáramaira	31
4.4. CoCl_2 hatása az RPa1 neuron spontán aktivitására és ionáramaira	33
4.5. Ouabain hatása az RPa1 neuron spontán aktivitására	35
4.6. 2,4-DNP és CdCl_2 hatása az RPa1 idegsejt spontán aktivitására és ionáramaira	37
4.7. A hőmérsékletváltozás hatása az RPa1 neuron spontán aktivitására és ionáramaira	45
5. MEGBESZÉLÉS	57
6. ÖSSZEFOGLALÁS	69
7. IRODALOMJEGYZÉK	72



BEVEZETÉS

A különböző sejtek membránjának nyugalmi potenciálját vizsgálva Goldman az ún. "constans erőterek" elméletét használta fel /Goldman, 1943/. Az elmélet alapjául a következő megállapítások szolgáltak:

- 1./ Az ionok a membránban a diffúzió, valamint az elektromos erőter hatására mozognak megfelelő irányba;
- 2./ az elektromos erőter nagysága a membránban állandó, s így a potenciál nagysága a membrán vastagságának lineáris függvénye;
- 3./ a membránban az ionkoncentráció - a membrán-oldat határon - egyenesen arányos az oldatban meglévő koncentrációval;
- 4./ a membrán homogén, egyenlő elektromos állandóval rendelkezik a felületet metsző, merőleges irányban.

A fenti feltételezéseket felhasználva, a membránon átfolyó áram sűrűsége a következő kifejezéssel adható meg:

$$I_i = -z_i u_i RT \frac{dc_i}{dx} - F z_i^2 u_i c_i \frac{dV}{dx}, \text{ ahol:} \quad /1/$$

z_i - az i-dik ion vegyértéke,

v - adott pontban a potenciál értéke,

x - távolság a felületet metsző, merőleges irányban, az extracelluláris oldaltól mérve,

u_i - az i-dik ion mozgékonyági együtthatója.

Állandó elektromos tér esetén ($dV/dx = \text{const} = V/a$) a membrán permeabilitása (P_i) i -dik ionra nézve a következő kifejezéssel adható meg:

$$P_i = u_i d_i \frac{RT}{aF}, \quad \text{ahol} \quad /2/$$

d_i - az i -dik ion eloszlási állandója a vizes oldat és a membrán között,

u_i - az adott ion mozgékonyága,

a - a membrán vastagsága,

R, F - állandók,

T - abszolút hőmérséklet.

A kiinduló kifejezés átalakítása, valamint annak feltételezése után, hogy nyugalmi állapotban a membránon átfolyó, összegzett ionáram egyenlő nullával, a következő egyenlettel írható le a nyugalmi membránpotenciál:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K/K/o + P_{Na}/Na/o + P_{Cl}/Cl/i + \dots}{P_K/K/i + P_{Na}/Na/i + P_{Cl}/Cl/o + \dots} \quad /3/$$

(Megjegyzés: a későbbi vizsgálatok igazolták, hogy a kifejezésben szereplő ionokon kívül mások is résztvesznek a nyugalmi potenciál kialakításában, pl.: Ca^{++})

Megállapítást nyert továbbá, hogy az ionok (passzív) mozgását a membránon át a következő tényezők határozzák meg döntően:

- 1./ a koncentrációgradiens, mely a magasabb tartomány felől az alacsonyabb felé kényszeríti az ionokat;
- 2./ a feszültséggradiens, mely a kationokat a sejtbe, az anionokat a sejtből igyekszik kihajtani;
- 3./ a permeabilitás, mely a koncentráció és feszültség gradiens eredőjének megfelelően meghatározza az időegység alatt a membránon áthaladó ionok mennyiségét.

E passzív folyamattal párhuzamosan érvényesül az un. aktív iontranszport, mely nemcsak mennyiségileg járul hozzá az eredő ionmozgáshoz, de minőségileg is meghatározza azt. Az aktív folyamat tükröződhet a különböző - nem stacionarius - ionpermeabilitások meghatározásában, illetve befolyásolásában, vagy ezen egyenletek alapját képző elmélettel nem megmagyarázható folyamatok léteiben.

Ilymódon nagy jelentőséggel bírhat az aktív elektrogén transzport folyamatok vizsgálata, a különböző típusu szövetek elektromos potenciálképzésének, illetve permeabilitásának metabolikus függése.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A nyugalmi potenciál és az anyagcserefolyamatok kapcsolata

Vizsgálatok sora bizonyította, hogy az idegszövetek a rendelkezésükre álló energia 50-90 %-át az ún. nátrium-pumpa mechanizmus működtetésére használják fel, melynek feladata a Na ionok eltávolítása és ezzel egyidőben a K ionok bevitele a sejt citoplazmájába. Megállapítást nyert, hogy a pumpa mechanizmushoz szükséges energia forrása az ATP (adenozintrifoszfát), melynek reszintézise az oxidatív foszforiláció segítségével történik az idegszövetben. E reszintézist gátló anyagok bevitele (cianid, 2,4-dinitrofenol (DNP), stb) a foszforiláció gátlása révén a sejt ATP-jének csökkenéséhez, ezen keresztül pedig az intracelluláris Na^+ koncentráció növekedéséhez, illetve jelentős K^+ veszteséghez vezet. Az ekkor bevitt ATP időlegesen képes növelni a Na ion kiáramoltatást és a K ion reabszorpciót (Coldwell et al., 1960).

Az ATP hasítása, amely lényegében az energiafelszabadulás alapja, a transzport ATP-áz enzim által történik.

A membrán ATP-áz működéséhez Mg ionok, aktiválódásához pedig Na és K ionok jelenléte szükséges. Míg ilyen szempontból a K^+ helyettesíthető más kationokkal (Rb^+ , Cs^+ , stb), a Na^+ helyettesíthetősége mindeztidáig nem bizonyított. Ugyancsak

gátolják a membrán ATP-áz működését egyes glukozidák (pl.: ouabain) (Thomas, 1972).

A membrán ATP-áz két, ún. "aktivitási zónával" rendelkezik: az egyik a membrán belső, a másik a külső oldalán helyezkedik el. A külső zónában a K ionok eltávolítása a pumpa működésének gátlását eredményezi (bár a K ionok helyettesítése pl. Rb ionokkal a gátlás mértékét csökkentheti); a belső zóna csak a Na ionokkal képes reakcióba lépni (Baker, 1965).

Az első ilyenirányú vizsgálatok (Hodgkin, 1958) a Na-pumpa neutrális jellegét, vagyis a Na illetve K ionok 1:1 arányu cseréjét mutatták ki, valamint azt, hogy az ionok aktív transzportja csak a koncentrációgradiens fenntartását eredményezi, közvetlen hatása az elektrogenézisre nincs. Későbbi vizsgálatok során kitűnt, hogy a K-Na cserearány nagysága 2:3 között mozog, s így a pumpa nem lehet neutrális, más szóval potenciálkülönbséget hoz létre (Baker, 1965, Coldwell et al., 1960). A Na-pumpa elektrogenitását bizonyították vázizom szövetekben is (Kernan 1962, Mullins és Awod, 1965, Adrian és Slayman, 1966). Molluszkák óriás idegsejtjein végzett kísérletek ugyancsak bizonyították az ezen kísérleti objektumokban is jelentős szerepet játszó pumpa mechanizmus elektrogén jellegét (Kerkut és Thomas, 1975). Említett szerzők kimutatták, hogy intracelluláris Na^+ injekció esetén a membránpotenciál

jelentősen növekszik, meghaladva az un. K^+ equilibrium potenciál értékét. Az észlelt membránpotenciál növekedés gátolható a hőmérséklet csökkentésével, ouabain applikálásával, valamint a K ionok eltávolításával a külső oldatból. Thomas (1968, 1969) adata, mely szerint 25 pM Na bevitel mintegy 20 mV-os hiperpolarizációt okoz, ugyanakkor hasonló mennyiségű Li bevitel csak maximum 2 mV-tal növeli a nyugalmi potenciált, azt bizonyítja, hogy a pumpa működése erősen Na-függő.

Későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy az elektrogén pumpa nemcsak mesterségesen aktiválható, de normál körülmények között is működésével hozzájárul a membránpotenciál kialakításához (Аўпанеман, 1969a, Gorman és Marmor, 1970, Carpenter, 1970, Thomas, 1972). A felsorolt és más munkák alapján ma már tisztázott, hogy a nyugalmi membránpotenciál két komponensből áll: az első, un. passzív komponens a nyugalmi (passzív) permeabilitás és az ionkoncentráció, míg a második, un. metabolitikus komponens elsősorban az anyagcsere folyamatok függvénye. Felmerülhet a kérdés, hogy a bevezetőben leírt egyenletekben vajon miért nem szerepel az un. metabolitikus komponens. Ez az azal magyarázható, hogy az említett egyenletek leírása olyan objektum (tintahal óriásaxon) vizsgálata alapján készült, melynek membránellenállása nagyságrenddel kisebb, mint azoké az óriás idegsejteké, melyen az utóbbi vizsgálatokat végezték. Az

utóbbiak esetében a viszonylag kismértékű Na ion kiáramlás is jelentős feszültségesést, tehát potenciálkülönbséget eredményezett. Későbbiekben bizonyították az elektrogén pumpa mechanizmus létét simaizom sejtekben is (Casteels, 1969), jelzett anyagok segítségével mérték a különböző ionáramlás intenzitást a membránon át. Az eredetileg számolt és a később kapott membránpotenciál értékek között tapasztalt különbség csak az elektrogén pumpa létevel és működésével volt magyarázható.

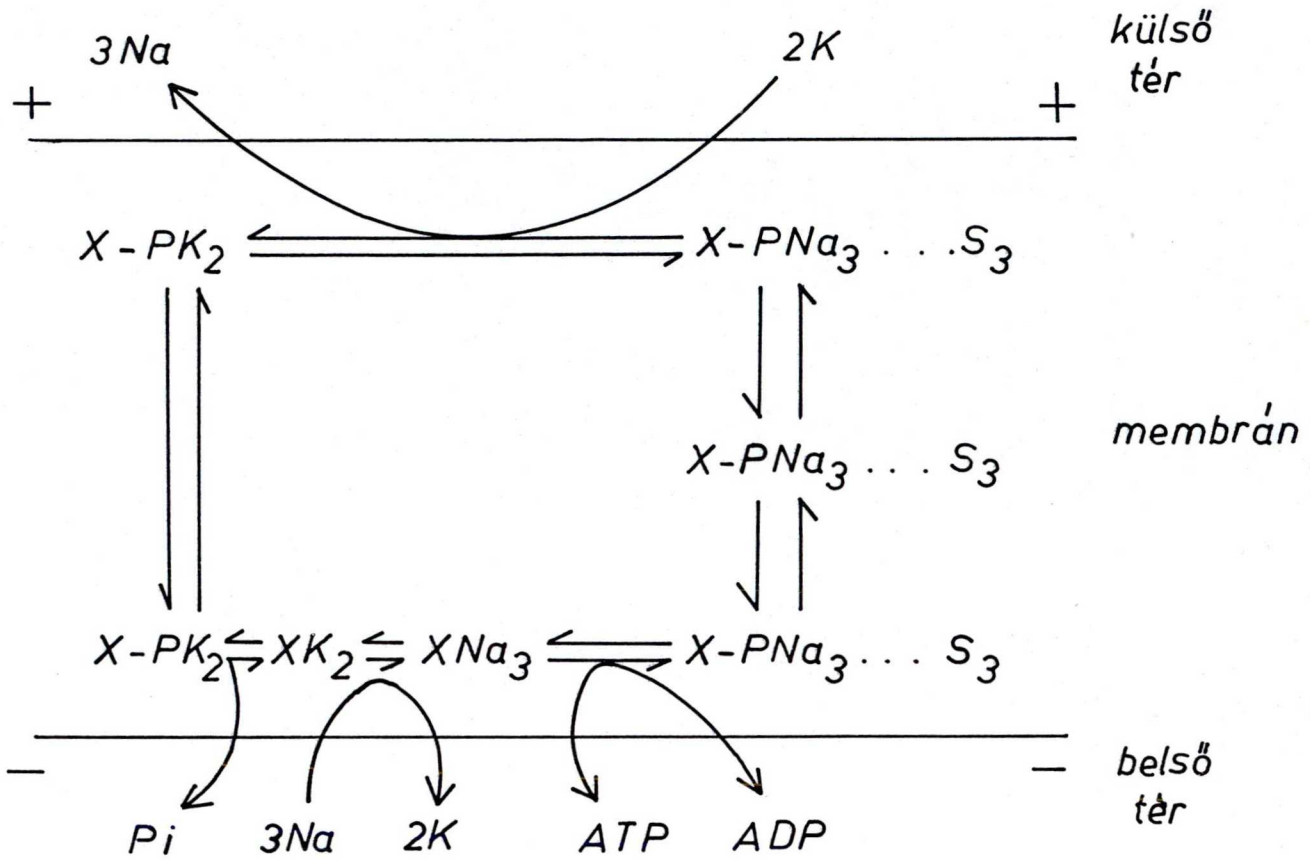
Megállapítható tehát, hogy az aktiv iontranszport kettős hatással bír a nyugalmi potenciálra: a Na-pumpa (vagy Na-K pumpa) révén biztosítja a membrán két oldala közti iongradienst, másrészt pedig az elektrogén Na-pumpa működése növeli az iongradiens által meghatározott nyugalmi potenciált. Ezen utóbbi komponens nagysága erősen függ - több tényező mellett - a membrán specifikus ellenállásától is.

A Na-pumpa működésének molekuláris mechanizmusát leíró modellek közül az egyik legelfogadottabbat Baker (1966) készítette (1. ábra). Az adott modell lényege az, hogy az ún. X (carrier) képes szelektív módon felvenni és leadni a Na illetve K ionokat, miközben foszforilálódik, illetve defoszforilálódik.

Más elképzelések szerint (Adrian és Slayman, 1966) a carrier molekula csak a Na ionok kilépését biztosítja, míg a K ionok bevitele (vagy visszavitele) a sejtbe az elektrogén Na pumpa működésekor létrejövő elektromos gradiens által történik.

A metabolitikus folyamatok szerepét a nyugalmi potenciál kialakításában a következőképpen foglalhatjuk össze: ATP szükséges (mint energia forrás) az ionkoncentrációk létrejöttéhez, illetve fenntartásához, melyet a Na-K pumpa működése biztosít, valamint a nem neutrális (elektrogén) Na pumpa működéséhez, mely növeli az ionkoncentráció különbségek biztosította membránpotenciál értéket.

A membránpotenciál végső nagyságának kialakításához a felsoroltakon kívül még más tényezők is hozzájárulhatnak (pl.: a membránfelszínen lévő ún. fix töltések nagysága (Elul, 1967)). Kétségtelen jelentőségük ellenére ezen faktorokra - mivel csak közvetve kapcsolódnak a disszertáció témájához - most nem térünk ki.



1. ábra

A nátrium pumpa működésének teoretikus modellje a közbülső foszforiláció és defoszforiláció folyamatának sematikus fel-tüntetésével (Baker, 1966).

2.2. A membránpermeabilitás analitikus vizsgálata

Anélkül, hogy az elméleti és technikai részletek bővebb leírásába bocsátkoznánk, röviden ismertetjük az ún. "feszültség rögzítés" (voltage clamp) módszer lényegét. E módszer kiemelkedő jelentősége abban áll, hogy bár első kidolgozása óta számos korrekcióra szorult, mind a mai napig az egyik legfontosabb analitikus eszköze a membrán fiziológiai folyamatok in vivo vizsgálatának.

Negatív visszacsatolású erősítő segítségével a membránpotenciált konstans (tetszőlegesen megválasztható) szinten rögzítjük. Az áram, melyet a potenciál azonos szinten tartása végett bocsátunk át a membránon speciális visszacsatoló áramkör segítségével, abszolút értékében megegyezik azokkal az ionáramokkal, melyek e feszültség szinten - a kiindulási ("holding") szintről való, gyors potenciálváltozás hatására folynak a sejtmembránon át.

E módszer kidolgozást nyert - mind elméletét, mind pedig gyakorlati kivitelezést tekintve - a legkülönbözőbb szövet- és sejt-típusok esetére, Molluszkák óriás idegsejtjeinek vizsgálatára például a Dodge és Frankenhauser (1958) által leírt, módosított séma alkalmas.

A membránon átfolyó totál áram (I_m) két komponensből áll: a feszültségugrás elején és végén jelentkező kapacitív, valamint

a rögzített feszültség tartomány alatt megjelenő ionáramok összegéből:

$$I_m = C \frac{dV}{dt} + I_i \quad /4/$$

Az állandósult feszültség tartományban: $\frac{dV}{dt} = 0$, tehát:

$$I_m = I_i \quad /5/$$

Ugyanakkor:

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_L + I_S \quad \text{ahol:} \quad /6/$$

I_{Na} - Na ionáram,

I_K - K ionáram,

I_L - un. kifolyási ("leak") ionáram,

I_S - egyéb ionok által hordozott áram.

Az óriás idegsejten átfolyó ionáram (I_m):

$$I_m = C \frac{dV}{dt} + g_{Na}(V-V_{Na}) + g_K(V-V_K) + g_L(V-V_L) + g_S(V-V_S), \quad /7/$$

továbbá:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h, \quad \text{ahol} \quad /8/$$

$$\frac{dm}{dt} = a_m(1-m) - b_m m, \quad /9/$$

$$\frac{dh}{dt} = a_h(1-h) - b_h h; \quad /10/$$

$$g_K = \bar{g}_K n^4, \quad \text{ahol} \quad /11/$$

$$\frac{dn}{dt} = a_n(1-n) - b_n n \quad /12/$$

Az a és b konstans értékek empirikusan határozhatók meg.

A csak nagyon vázlatosan ismertetett egyenletekből is kitűnik az, hogy az adott módszer igen alkalmas a permeabilitás, illetve transzformált formájának, a membrán különböző ionokra vonatkoztatott vezetőképességének vizsgálatára. Éppen a módszer analitikus jellege tette lehetővé már az ezzel a módszerrel végzett kutatások legelején a membránpermeabilitás hőmérsékletfüggésének vizsgálatát, mely tulajdonképpen e mennyiség anyagcsere függésére is utalt.

E technika szisztematikus alkalmazása és továbbfejlesztése sok új, az eredeti egyenlet rendszerrel (Hodgkin és Huxley, 1952) modellezhető "működési mechanizmustól" eltérő részletet tárt fel. Ily módon nemcsak a permeabilitás fogalmának fontosabb értelmezésére, lehetséges mennyiségi és minőségi változásaira derített fényt, de alapjául szolgált új membránmodellek alkotásához is (Connor és Stevens, 1971 a, b, c; Noble és Tsien, 1969, a, b).

A teljesség igénye nélkül felsorolnánk néhány olyan hipotézist, illetve kísérleti tény, melyek a gerinctelen állatok idegrendszerének kutatása során születtek, de jelentőségük, sőt bizonyos esetekben bizonyításuk is a gerinces idegélettanban is vitathatatlan.

a) Többkomponensű kifeléirányuló ("outward") K^+ áram (I_K)

A kifeléirányuló K^+ áram egyes sejttípusok esetében két, mennyiségileg és minőségileg is eltérő komponensből áll (Neher, 1971). Az un. gyors komponens csak előzetes hiperpolarizációval váltható ki, a nyugalmi membránpotenciál szintjén teljesen inaktiválódik. Aktivációs állandója (τ) legalább egy nagyságrenddel kisebb az un. késői kifelé irányuló áramkomponens esetében mérhető értéknél. Míg a késői komponens gyakorlatilag csak igen kismérvű, illetve elhanyagolható inaktivációval bír, a gyors áram inaktivációs együtthatója (h) a befelé irányuló áram inaktivációs értékével azonos nagyságrendű.

A késői (lassu) K -áram komponens teljesen blokkolható tetraetilammonium-kloriddal (TEA-Cl), a gyors komponens TEA-Cl-ra érzéketlen. Máig sem tisztázott, hogy vajon azonos vagy különböző ioncsatornák működnek-e a két áramtípus esetén. Bár a különböző csatorna típusok bizonyítása ezideig nem sikerült, egytípusú csatornák esetén kielégítőleg nem lehet magyarázni például a TEA-Cl specifikus hatását adott esetben.

b) Többkomponensű és kétionos befelé irányuló ("inward") áram

Megállapítást nyert, hogy a befelé irányuló áramot mind Na, mind pedig Ca ionok hordozhatják (gyakran egyidőben is). Míg a Na^+ komponens blokkolható tetrodotoxinnal (TTX), a Ca^{++} komponens TTX-inszenzitív, ugyanakkor pl. CoCl_2 -dal gátolható. (Geduldin és Junge, 1968; Geduldin és Grüner, 1970).

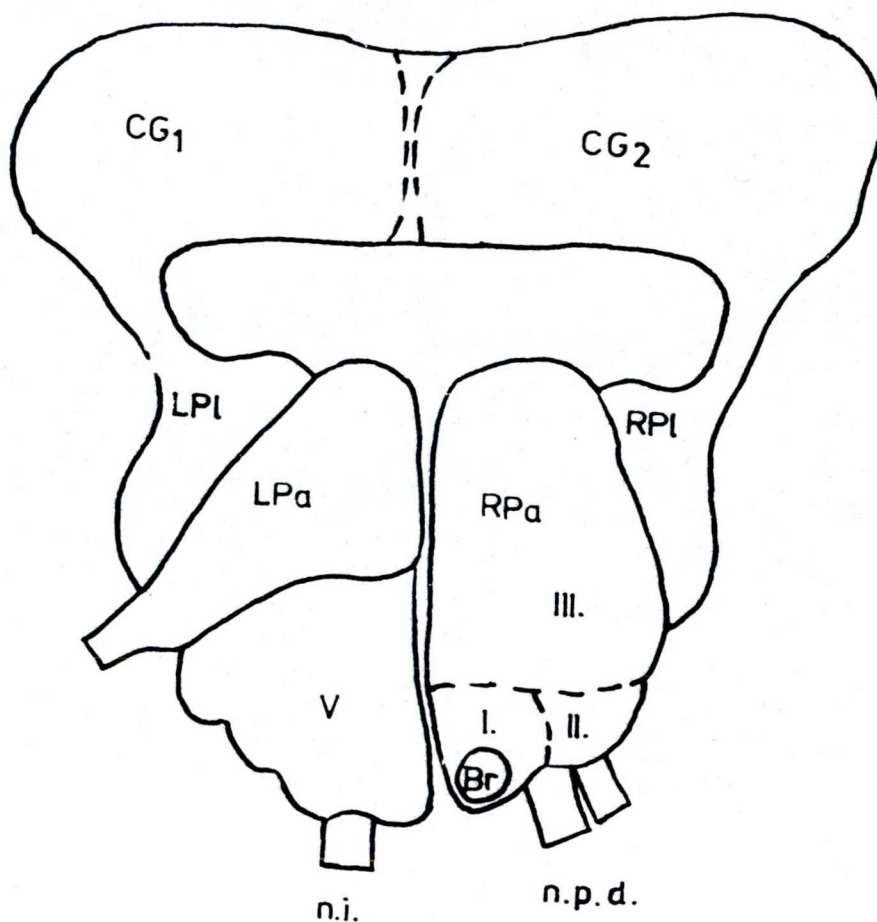
c) A kalcium kettős szerepe

E kettős szerep lényege az, hogy a Ca^{++} egyrészt mint áramhordozó, másrészt mint a más ionok által hordozott áram "modulátora" is szóba jön. Ez utóbbi szerep bizonyosan összefügg a kalciumnak a membránszerkezetben játszott jelentőségével (melynek tárgyalására nem térünk ki most részletesebben). Bizonyított pl., hogy a lassu kifelé irányuló (I_K) áramkomponens nagysága, kinetikai paraméterei erősen Ca^{++} függők, de elképzelhető az is, hogy ezen komponens maga is két összetevőből áll, melyek közül csak az egyik Ca^{++} függő (Heyer és Lux, 1976 a, b).

ANYAG ÉS MÓDSZER

A *Helix pomatia* L. központi idegrendszerét alkotó garatkörüli gangliongyűrű felépítése a 2. ábrán látható (Bullock és Horridge, 1965): cerebrális ganglionpár (CG_1 és CG_2), pleurális ganglionpár (LP_1 és RP_1), parietális ganglionpár (LPa és RPa), valamint a viscerális ganglion (V). A cerebrális ganglionpárt a garat alatti ganglion egyes részeivel rövid konnektívumok kötik össze, míg a garat alatti ganglion egyes tagjai szinte teljesen egybeépültek. A parietális ganglionpár jobboldali (RPa) tagja mindig nagyobb, mint a baloldali (LPa). E ganglionpárból kilépő idegek szintén aszimmetrikus elrendezésűek; az RPa ganglionból kilépő idegtörzs két, jól elkülöníthető ideget tartalmaz (2. ábra). A vizsgálataink tárgyát képező bimodális pacemaker idegsejt a jobb parietális ganglionban helyezkedik el (Sakharov és Salánki, 1968), jelzése: RPa_1 .

A ganglion dorzális felszínén - a többrétegű kötőszöveti burok eltávolítása után - az idegsejtek jól láthatóvá váltak. 2 cm^3 térfogatú kísérleti kamrában helyeztük el a preparátumot, melyet az általunk készített (kb. 3 mm^2) fényvezető üveg tárgyasztalra fektettük fel, majd megfelelően rögzítettük. Az alkalmazott megvilágítás biztosította - az átesőfény magas intenzitása által - az idegsejten történő műveletek viszonylag nagy nagyítás mellett történő végrehajtását.



2. ábra

A *Helix pomatia* L. központi idegrendszerének felépítése
CG₁ és CG₂ - cerebrális ganglionpár, LPl - bal pleurális
ganglion, RPl - jobb pleurális ganglion, LPa - bal parietá-
lis ganglion, RPa - jobb parietális ganglion (I., II. és III.
lebenye), V - viscerális gnaglion, Br - Br-tipusu idegsejt
(RPa1 sejt), n.i. - intestinális ideg, n.p.d. - nervus
pallialis dexter.

A kamrában elhelyezett oldat és preparátum hőmérsékletét 7°C és 33°C között folyamatosan lehetett változtatni, valamint 7°C , 22°C , és 33°C -os hőmérsékleti értékeket tartósan lehetett biztosítani. A hűtést, illetve fűtést Peltier elemek segítségével biztosítottuk, melyet speciális áramkör vezérelt (Véró, 1974 a).

A fiziológiás vagy más összetételű oldatok átáramoltatással (perfúzió) kerültek a kamrába (3-10 ml/perc) úgy, hogy a folyadék-szint magassága állandó volt.

Az intracelluláris jelek regisztrálását biztosító elektronikus rendszer blok-diagramja a 3. ábrán látható.

A vizsgálataink során használt fiziológiás oldat összetétele a következő volt: NaCl_2 : 3 g, KCl : 0,35 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 2,4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1,5 g, NaHCO_3 : 0,2 g/l desztillált víz. A fiziológiás oldat pH-ja 7,2 volt.

A PPal sejt mintázatára az alábbi anyagok hatását vizsgáltuk:

- | | | |
|-----------------------|---|------------------------------|
| 1. Tetrodotoxin (TTX) | } | extracellulárisan applikálva |
| 2. TEA-Cl | | |
| 3. Ouabain | | |
| 4. CoCl_2 | } | intracellulárisan applikálva |
| 5. 2-4 DNP | | |
| 6. CdCl_2 | | |

A vizsgálatok során az anyagokat perfúzióban adtuk a preparátumhoz. Későbbiekben lehetőség nyílt a vizsgálandó anyagok elektroforetikus applikálására, illetve intracelluláris injekálására is.

A (Pyrex alapanyagu) üvegapillárisból huzott mikroelektrodák ellenállása 2-20 Mohm között váltakozott, a kísérlet típusától függően; így membrán és akcióspotenciál elvezetésére 10-20 Mohm, ionáramok regisztrálására 5-10 Mohm, különböző anyagok iontoforetikus bevitelére 3-5 Mohm, nyomással történő anyaginjekció esetében 2-3 Mohm ellenállásu üvegmikroelektrodát használtunk. Az iontoforetikusan, illetve nyomással történő anyagbevitel esetének kivételével az elektrodákat 2,5 M KCl oldattal töltöttük.

A sejtől regisztrált jeleket nagybemenőellenállásu, FET bemenetű erősítő bemenetére (Véró, 1971), illetve a voltage clamp mérések esetén az áram elektrodán regisztrált jel konverteren át áramerősítőre csatlakozott (Véró, 1974 b). E mérési összeállításban a kétlépcsős négyszögimpulzus generátor biztosította a szükséges vezérlő jeleket, melyek időtartama és nagysága megfelelő határok között váltakozhatott. Ugyancsak lehetőség volt a kiinduló (holding) szint szükség szerinti megválasztására.

Néhány esetben szívóelektrodával végeztünk elvezetést az idegekről, mely elektroda az idegek ingerlésére is alkalmas volt

négyszög jelgenerátor segítségével.

A kapott jeleket Tektronix R5103N storage oszcilloszkóp képernyőjéről filmre rögzítettük, illetve az Intézetünkben készült analóg jeltárolón tároltuk, esetenként papírirószerkezettel rajzoltattuk ki.

A membránon átfolyó ionáramok mérése az un. voltage clamp mérési módszer szerint történt. Megfelelő elektronikus rendszer segítségével (Véró, 1974 b) a sejtbe 2 mikroelektródát bevezetve a membránpotenciált egy konstans kiindulási (holding) szinten rögzítjük. Az áram, melyet e potenciál azonos szinten tartása végett bocsátunk át a membránon egy negatív visszacsatolással, abszolút értékében megegyezik azokkal az áramokkal, melyek e kiindulási szintről való gyors (négyszögalaku pozitív vagy negatív) potenciálváltozás hatására folynak a sejtmembránon át.

A vizsgálatok során nyert és rögzített bioelektromos jelek alábbi paramétereit mértük, illetve származtattuk:

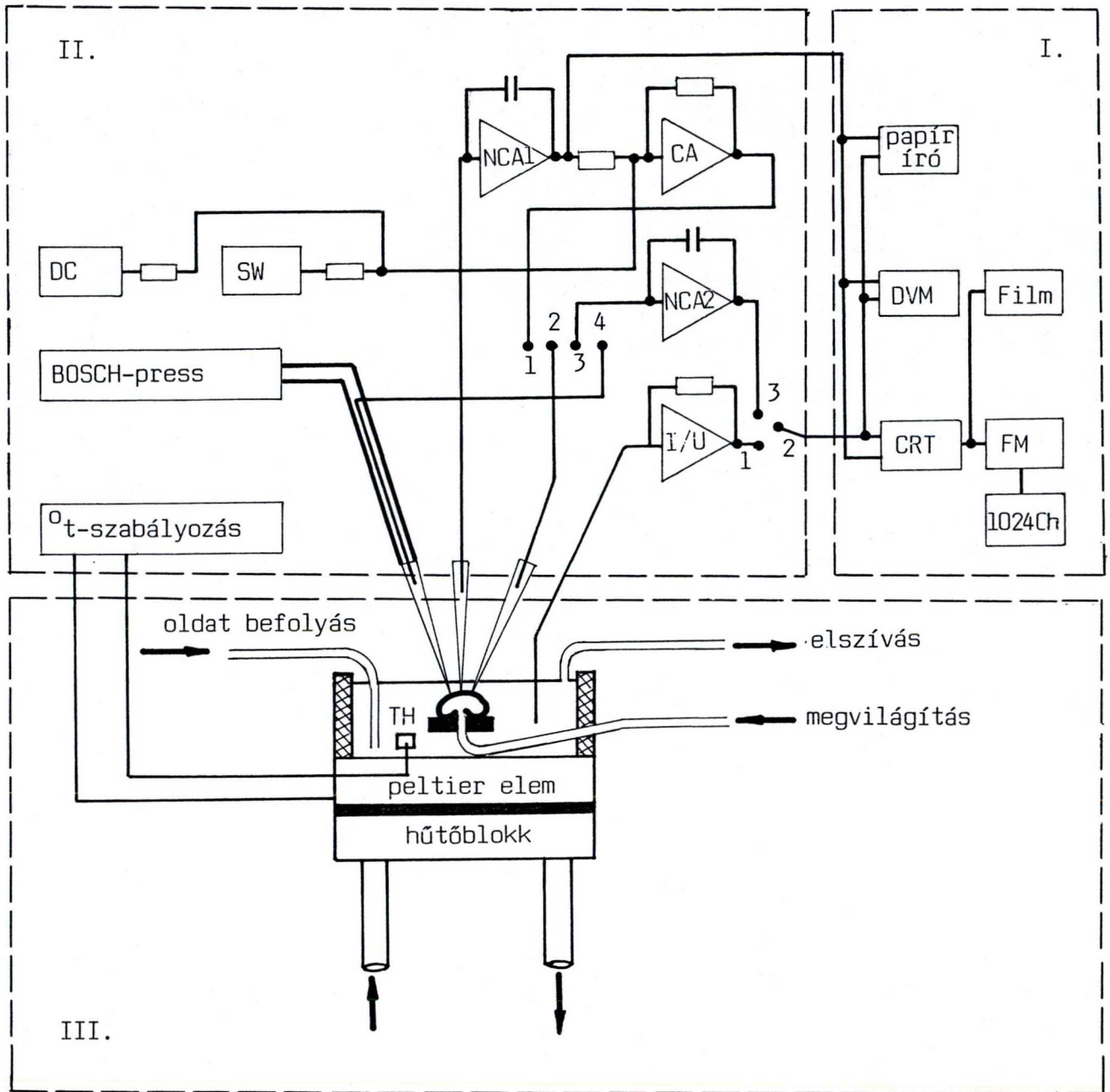
- a) nyugalmi potenciál értékek,
- b) egyes akciós potenciálok (csúcs)amplitudói, illetve jellegzetes értékei (kisülési küszöb, negatív csúcspotenciál, hullóvész),

- c) akciós potenciálok impulzusszélessége, fel- és leszálló szár meredeksége, időtartama,
- d) egymást követő akciós potenciálok és akciós potenciál sorozatok azonos fázisai közötti időtartamok,
 - intervallum eloszlás függvények (hisztogram)
 - intervallum sorszám-időtartam függvények (szukcessziv hisztogram),
- e) ionáramok mérésekor kapott áramgörbék alapján:
 - áram-feszültség karakterisztikák,
 - vezetőképesség feszültségfüggése.

Az RPal sejt aktivitás mintázata anyagcsere függésének vizsgálata során az intracelluláris nyomás segítségével történő anyagbevétel technikáját is alkalmaztuk.

Elektromos uton vezérelhető pneumatikus szelep segítségével az előre beállított (1-10 atm) (nitrogén) gáz nyomást az injektálandó oldattal töltött elektródára kapcsoltuk. Ily módon az 1 μ feletti csúcsátmérőjű elektródából az adott anyagokat be lehetett injektálni a sejtbe, illetve a sejtfelszínre kis mennyiségben applikálni.

Vizsgálataink során az egyszeri injekció alatt a sejtbe jutott folyadék (oldat) mennyiség nem haladta meg a sejt térfogatának 5 %-át. E mennyiség beviteléhez szükséges nyomásértéket - elektródánként - előzetes kalibrációval határoztunk meg. Vizsgálataink során 2,4-DNP és CdCl_2 injekciójára került sor.



I. kísérleti kamra

II. elvezetés és jelformálás

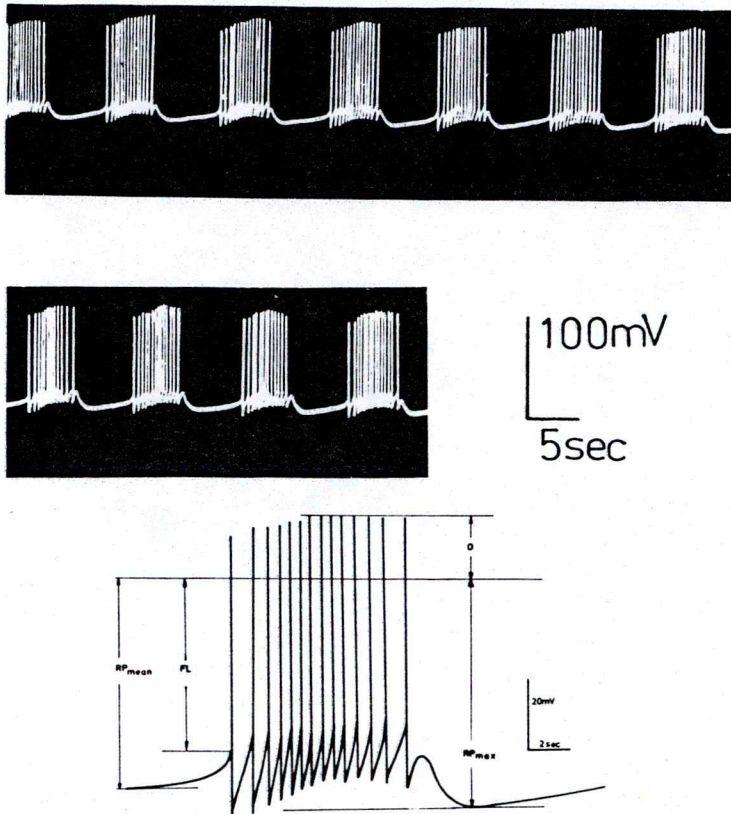
III. megjelenítés és jelfeldolgozás

3. ábra

EREDMÉNYEK

4.1. A bimodális pacemaker potenciálgenerálás általános jellemzői

A különböző sejteket a potenciál generálás alapmechanizmusa alapján két nagyobb csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba az un. szinaptikusan vezérelt, míg a másik csoportba a spontán működő, autoaktív (pacemaker) sejtek tartoznak. Ez utobbiakhoz sorolhatók a szivizom sejtek, valamint az idegsejtek egy jelentős része. A különböző autoaktív típusú sejtek vizsgálata egyértelműen bizonyította, hogy a pacemaker potenciál generálás alapját a membránpermeabilitás paramétereinek időbeli változásai, paramétereinek speciális értékei, feszültségfüggése, stb. biztosítja. A spontán működő sejtek egy csoportját jellegzetes, un. burst-szerű akciós potenciál generálás jellemzi. Ezen mintázat (4. ábra) vizsgálata során kitűnt, hogy e működés jelentősen befolyásolható a hőmérséklet, a pH, a megvilágítás változtatásával (Arvanitaki és Chalazonitis, 1968), különböző membránpermeabilitás moduláló ágensek - ioncsatorna blokkolók - (TTX, TEA-Cl) applikálásával (Mathieu et al., 1971, Junge és Stephens, 1973), anyagcsere gátlók (DNP, ouabain) alkalmazásával (Аўпанемях, 1969 b, Isenberg és Trautwein, 1974), az ionösszetétel változtatásával (Carpenter, 1970). Az idézett munkák, valamint saját kísérleteink is megmutatták e speciális működési



4. ábra

Az RPa1 jelzésű bimodális pacemaker óriásidegsejt spontán aktivitásmintázata (felül) és egy impulzussorozat jellemző paramétereit (alul). RP_{mean} , a nyugalmi potenciál átlagértéke; RP_{max} , a nyugalmi potenciál maximális értéke; FL , kisülési szint; 0, tullövés (J.Salánki, I. Vadász és K. Elekes, 1972).

forma közvetett és közvetlen anyagcsere függését és azt a feltételezést erősítették meg, hogy a burst-szerű működés a jelentősen anyagcsere függő membránpermeabilitás eredménye, illetve az adott mintázatot mutató sejtek rendelkeznek időben is változó (oszcilláló típusu) metabolizmussal (elektrogén Na-pumpa).

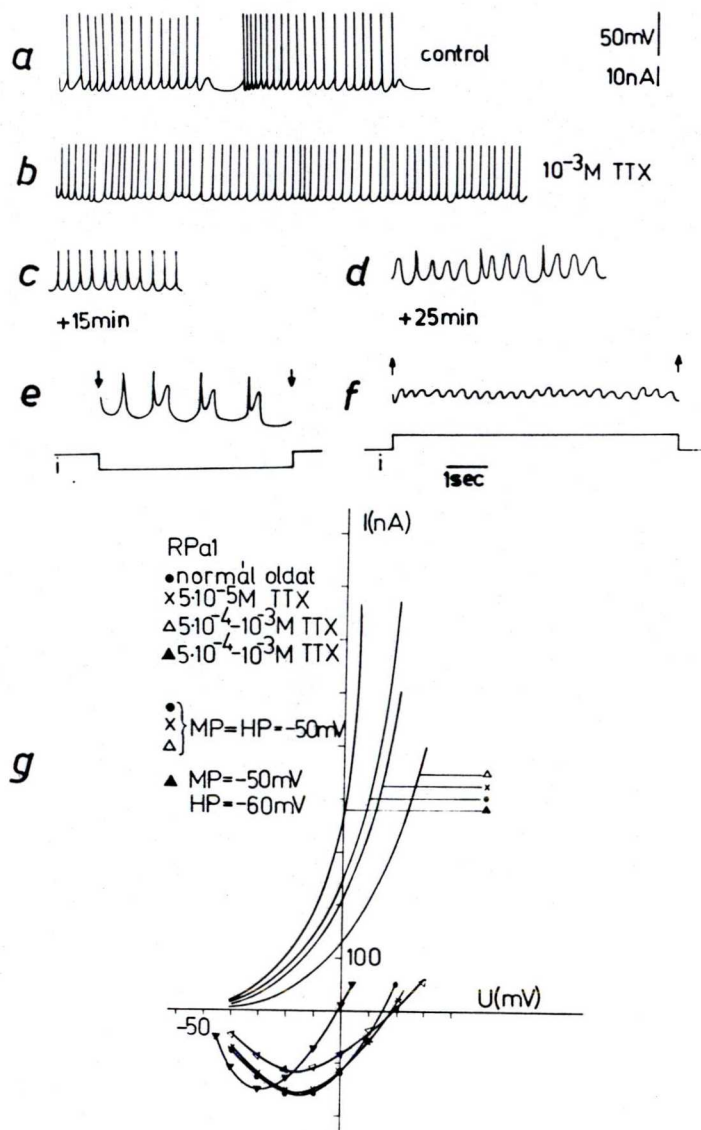
Több éve vizsgáljuk *Helix pomatia* L. központi idegrendszerében található, bimodális aktivitási mintázatot mutató idegsejt (RPa1 jelzésű neuron, Sakharov és Salánki, 1969) sajátosságait, különös tekintettel az aktivitásmintázat generálása és a membrántulajdonságok összefüggésére. Munkánk során - a feszültség rögzítés (voltage clamp) technika alkalmazása révén - lehetőség nyílt a membránpermeabilitás különböző faktorainak analitikus vizsgálatára. Így a különböző kísérleti szituációkban nyert adatok alkalmasak voltak a bimodális (burst-szerű) működéssel együttjáró ionfolyamatoknak, s ezeken keresztül a permeabilitás analízisére. A membránpermeabilitás anyagcsere függés vizsgálatának megkezdése előtt elvégeztünk néhány kísérletet, melyek lehetőséget adtak az adott sejttípus membránfiziológiai tulajdonságainak tisztázására. Meghatároztuk továbbá, hogy a kifelé és befelé irányuló áramot - voltage clamp mérési feltételek között - milyen ionok hordozzák.

A membránpermeabilitás anyagcsere függésének vizsgálata során részletesen a hőmérséklet változás, mint az anyagcsere folyamatok sebességének generális szabályozója, valamint különböző kémiai anyagok hatásának elemzését végeztük el az RPa1 sejt esetében.

4.2. Tetrodotoxin hatása az RPal neuron spontán aktivitására és ionáramaira

Az RPal sejten a TTX 10^{-7} - 10^{-6} M koncentrációban hatástalan volt, ugyanakkor más, Na^+ hiányra érzékeny sejteken már ebben a koncentrációban is blokkolta a potenciálképzést. Emelve az alkalmazott koncentrációt 10^{-4} - 10^{-3} M-ra, az aktivitás szakszerűsége megszűnt, az akciós potenciálok amplitudója pedig fokozatosan lecsökkent (5. ábra b, c). Az anyag adását követően mintegy 25 perc múlva a membránpotenciál erős oszcillációja volt megfigyelhető. Az oszcillációt rendszeresen megszakítja egy olyan hiperpolarizációs hullám, ami az interburst periódus első, gyors komponensére emlékeztet, amit mindig egy abortív akciós potenciál követ (5. d ábra). A membránpotenciál hiperpolarizációs irányba történő eltolása esetén kifejezettebbé vált a hiperpolarizációs hullám, melyet követett egy csökkent amplitudójú akciós potenciál (5. e ábra). A membrán depolarizálása esetén a membránoszcilláció meggyorsult, amplitudója csökkent és sem a hiperpolarizációs hullám, sem spike képzés nem volt megfigyelhető (5. f ábra).

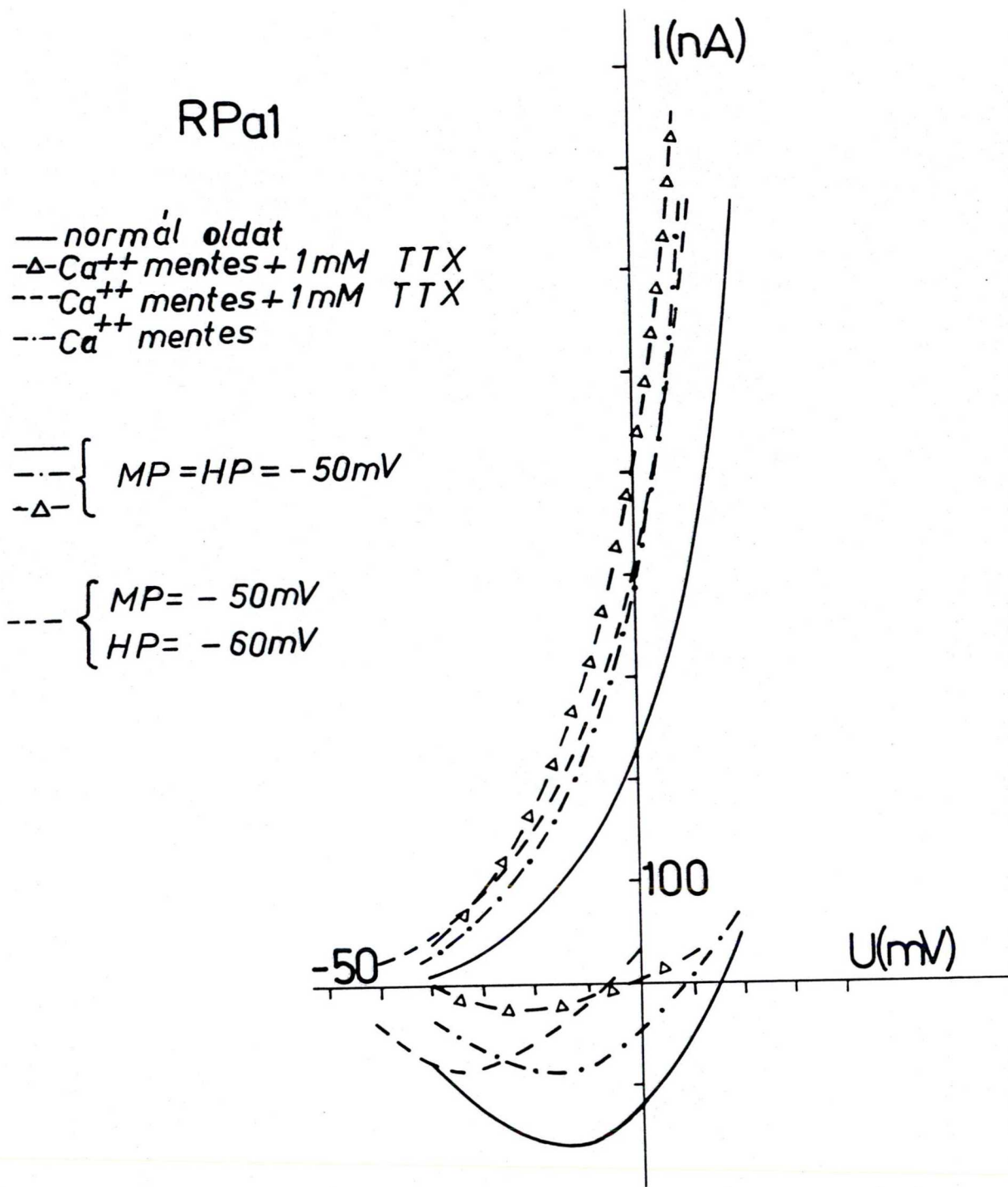
Az adott koncentrációju TTX hatására a sejt befelé irányuló árama 30 %-kal, a kifelé irányuló áram pedig 40 %-kal csökkent (5. g ábra). Ha azonban a feszültség ugrások kiinduló szintjét



5. ábra

Tetrodotoxin (TTX) hatása az RPa1 sejt spontán aktivitására és ionáramaira
(felülről: kontroll aktivitás; 10^{-3} M TTX hatása a spontán aktivitásra; a hatás 15 perc majd 25 perc múlva; a hiperpolarizáló és depolarizáló áram hatása a TTX-t tartalmazó oldatban.
alul: a voltage clamp mérés során kapott feszültség-áram karakterisztikák különböző TTX koncentráció és kiindulási feszültség-szint (holding szint) esetén).

MP = nyugalmi potenciál; HP = holding potenciál



6. ábra

Tetrodotoxin hatása Ca^{++} -mentes oldatban az RPa1 sejt ion-
áramaira

(a voltage clamp mérés során kapott feszültség-áram karakterisztikák különböző kiindulási (holding) szintek esetén.)

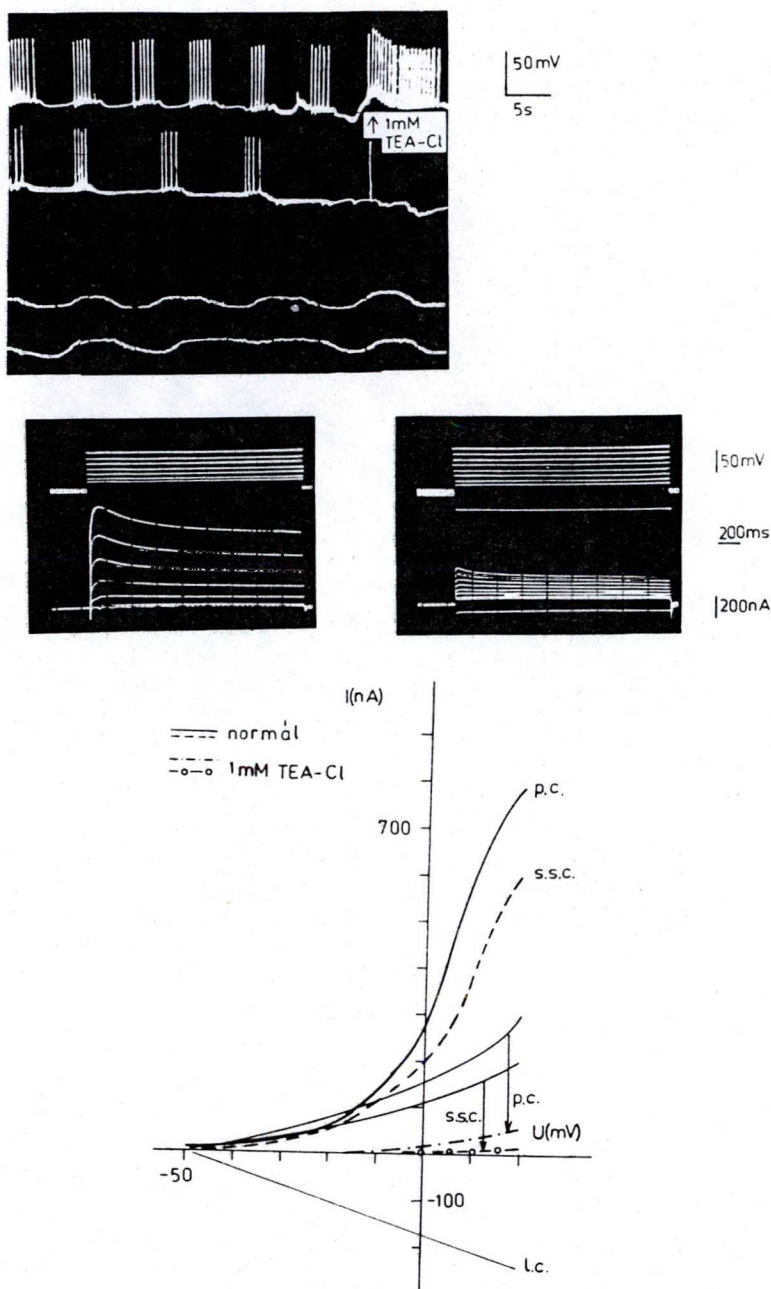
MP = nyugalmi potenciál; HP = holding potenciál.

a nyugalmi potenciálnak megfelelő -50 mV-os szintről -60 mV-ra emeltük, az ekkor mérhető áramok megegyeztek a kontroll értékkel. A fentiekkel analóg hatást tapasztaltuk Ca^{++} -mentes oldatban alkalmazott TTX kezeléskor, vagyis ekkor is a be- és kimenő áramok lényeges redukciója következett be. Ha azonban a kiindulási (holding) szintet 10 mV-tal eltoltuk hiperpolarizációs irányba, ez esetben is észleltük az áramértékek visszaállítódását. E visszaállítódás azonban a TTX-t nem tartalmazó, Ca^{++} -mentes oldatban mért értékig terjedt (6. ábra), más szóval a TTX hatás kiiktatása következett be.

4.3. Tetraetilammónium-klorid (TEA-Cl) hatása az RPal neuron spontán aktivitására és ionáramaira

Az 1 mM TEA-Cl-ot tartalmazó fizioológias oldat hatása a sejt spontán aktivitására és ionáramaira a 7. ábrán látható. Megfigyelhető az egyes burst-ök akciós potenciál számának gyors csökkenése, anélkül, hogy az akciós potenciálok amplitudója változna, majd mintegy 30 sec időtartam alatt a potenciál-generálás teljesen megszűnik. Ekkor azonban egy igen kifejezett membránpotenciál oszcilláció figyelhető meg, melynek periódusideje lényegében megegyezik a kontroll körülmények között is meglévő, bár kevésbé szimmetrikus oszcillációval.

Voltage clamp körülmények között vizsgálva a TEA-Cl hatását azt tapasztaltuk, hogy a kifelé irányuló K^+ áram jelentősen lecsökkent, olyannyira, hogy az időközben megnövekedett kifolyási áram miatt elvégzett korrekciós számítás után a K^+ áram teljes blokkolásáról beszélhattünk. Fontos megjegyezni, hogy e hatás mind a korai, csucs (p.c.) értékre, mind a késői, stacionárius (s.s.c.) értékre is vonatkozott.



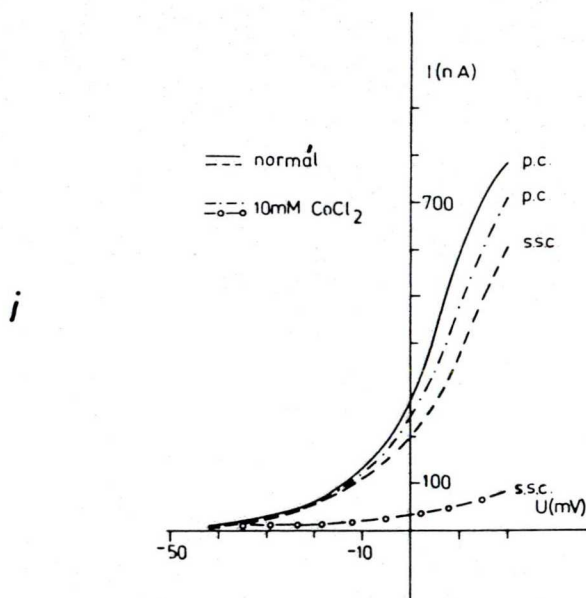
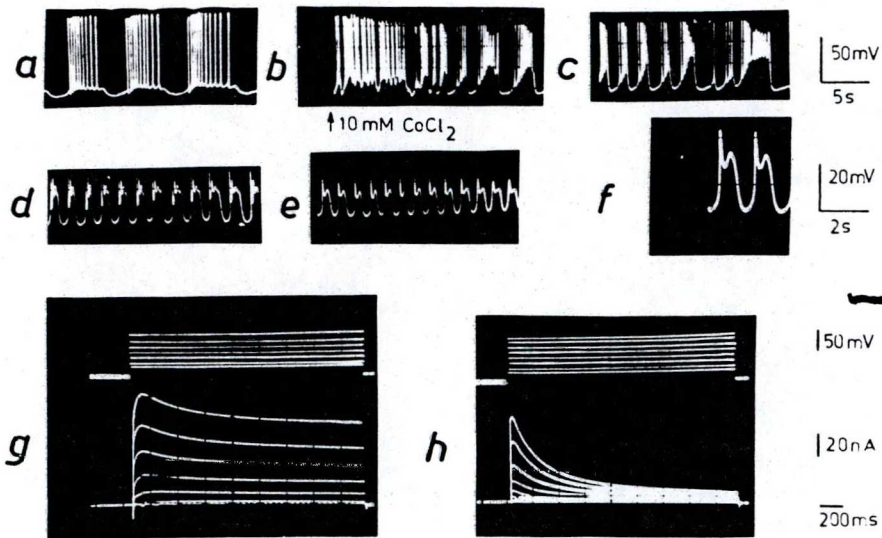
7. ábra

A tetraetilammonium-klorid (TEA-Cl) hatása az RPa1 sejt spontán aktivitására és ionáramaira
 (felül: kontroll aktivitás és a TEA-Cl applikálás utáni mintázat;
 középen: a kontroll körülmények között mért áramválaszok (balra) és 1 mM TEA-Cl után (jobbra);
 alul: feszültség-áram karakterisztikák (p.c., a kifelé irányuló áram maximális értéke; s.s.c., a kifelé irányuló áram állandósult értéke; l.c., a kifolyási "leak" áram.)

4.4. CoCl_2 hatása az RPal neuron spontán aktivitására és ionáramaira

A sejt aktivitási mintáuatának és ionáramainak igen érdekes változásai voltak megfigyelhetők 10 mM CoCl_2 -ot tartalmazó fiziológiás oldat alkalmazásakor. A 8. ábrán látható, hogy az anyag adását követően az akciós potenciál sorozatok frekvenciája nőtt meg, valamint a mintázat alapját képző un. lassu oszcilláció amplitudója vált kifejezettebbé, olyannyira, hogy a hullámzás depolarizációs fázisában a potenciálgenerálás blokkolódása következett be, s csak mintegy 7 sec múlva tért vissza a membránpotenciál a kiindulási szintre. A hatás későbbi fázisában csak egy pseudo-akciós potenciál, valamint a lassu hullámzás gyors komponensét tartalmazó mintázat figyelhet meg (8.d, f ábra).

Az adott anyag hatására igen sajátosan változtak meg a különböző amplitudóju feszültségugrásokra jelentkező áramgörbék: egyrészt a befelé irányuló áram megszűnt, másrészt pedig a kifelé irányuló K^+ áram igen nagy, kontroll körülmények között adott sejttípuson sohasem tapasztalható inaktivációval bírt. Mint ahogyan a felvett feszültség-áram karakterisztika is mutatja (8. i ábra), a korai áramértékek lényegében meg egyeznek a kontroll körülmények között mért értékekkel, ugyanakkor a kifelé irányuló áram stacionárius értéke a kontrollhoz képest 90 %-kal csökkent.



8. ábra

CoCl_2 hatása RPa1 sejt spontán aktivitására és ionáramaira

(felső két sor: kontroll aktivitás és a 10 mM CoCl_2 utáni mintázat;

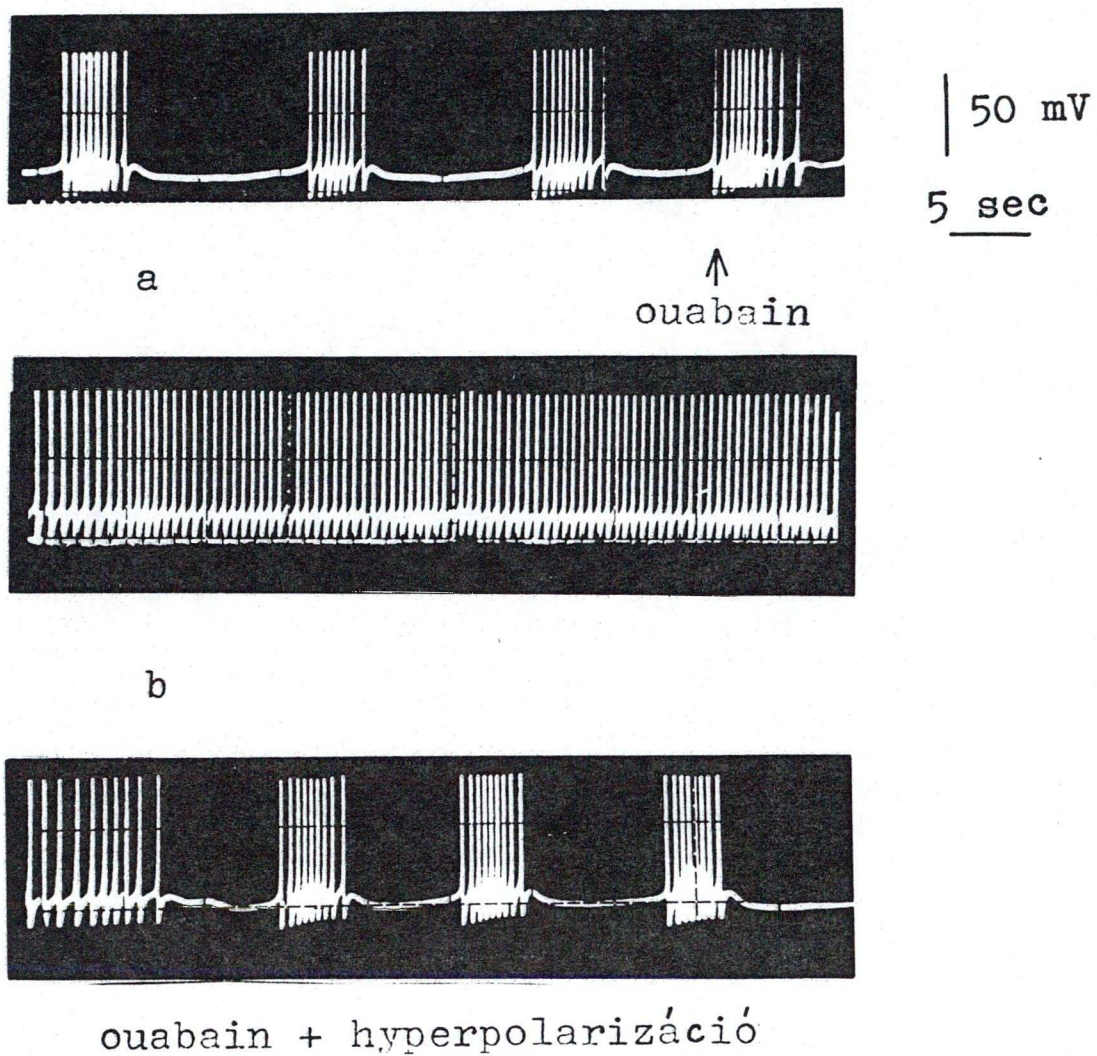
középen: a kontroll körülmények között mért áramválaszok (balra) és 10 mM CoCl_2 után (jobbra);

alul: feszültség-áram karakterisztikák (p.c., a kifelé irányuló áram maximális értéke; s.s.c., a kifelé irányuló áram állandósult érték).

4.5. Ouabain hatása az RPal neuron spontán aktivitására

Az ouabain 10^{-5} M koncentrációban történő alkalmazása egyértelmű hatást eredményezett a sejt spontán aktivitásában: az applikálást követően mintegy 5-15 sec múlva az addig szakaszosan működő sejt folyamatos akciós potenciál generálásra váltott át. Ennek frekvenciája állandónak bizonyult, értéke pedig az egy sorozat alatt előforduló, spontán parabolikusan változó értékek átlagával volt egyenlő (9. ábra b). Ugyanakkor az ouabain jelenlétében alkalmazott hiperpolarizáló áram hatására helyreállt az eredeti aktivitásmintázat, vagyis teljesen sikerült kivédeni az alkalmazott anyag hatását (9. ábra, alsó sor).

Mint az később, a megbeszélés fejezetben kitűnik, az ouabainnal végzett kísérleteknek igen fontos szerepe van az egész kérdéskomplexum megértése és magyarázása szempontjából. Az ouabain hatásának vizsgálatát mint extra-, mint pedig intracelluláris applikálás esetén el kell végezni, valószínű ugyanis, hogy ennek függvényében változik a hatásmechanizmusa. (Jelenleg folyó kísérleteink, melyek során - voltage clamp mérési körülmények között is - nyomással visszük be az anyagot a sejtbe, újfent bizonyítani látszanak az elektrogén Na^+ pumpa szerepét a lassu hullámzás kialakításában.)

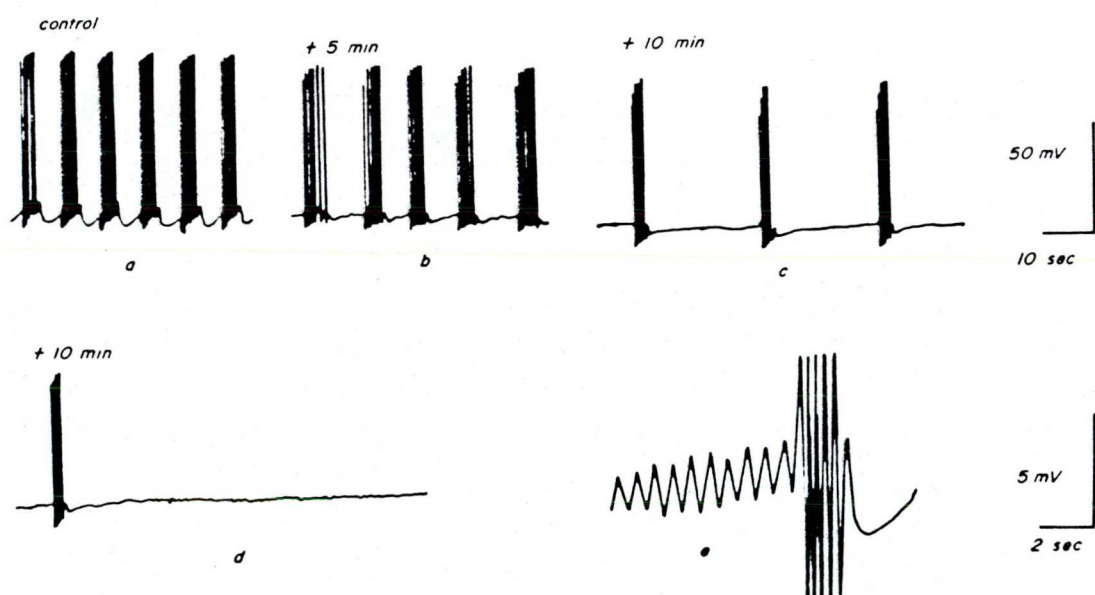


9. ábra

Ouabain hatása az RPa1 sejt spontán aktivitására
(felső sor: kontroll aktivitás; középső sor: 10^{-5} M koncentrá-
ciójú ouabain hatása; alsó sor: 10^{-5} M-os ouabain és 10 nA
erősségű hiperpolarizáló áram hatása az aktivitásra)

4.6. 2,4-DNP és CdCl_2 hatása az RPal idegsejt spontán aktivitására és ionáramaira

0,1-0,2 nl mennyiségű 100 mmol/l 2,4-DNP bevitelét követően néhány perc elmultával időben fokozódó változás volt megfigyelhető a neuron spontán aktivitásában. Az injekció után 5 perccel az akciós potenciálok száma a sorozaton belül nem változott, amplitudójuk azonban a potenciálsorozat elején 20 %-kal csökkent. A sorozat utolsó tagjának nagysága ugyanakkor legfeljebb 10 %-kal marad el a kontroll értéktől. Az interspike intervallumok hosszabbodtak, mintegy 25-30 %-kal, az interburst intervallumok időtartama pedig 50 %-kal megnőtt. A membránpotenciál lassu hullámszerűségének amplitudója a kontrollhoz képest jelentősen, 1/2-1/3-ra csökkent (10. ábra, a,b).



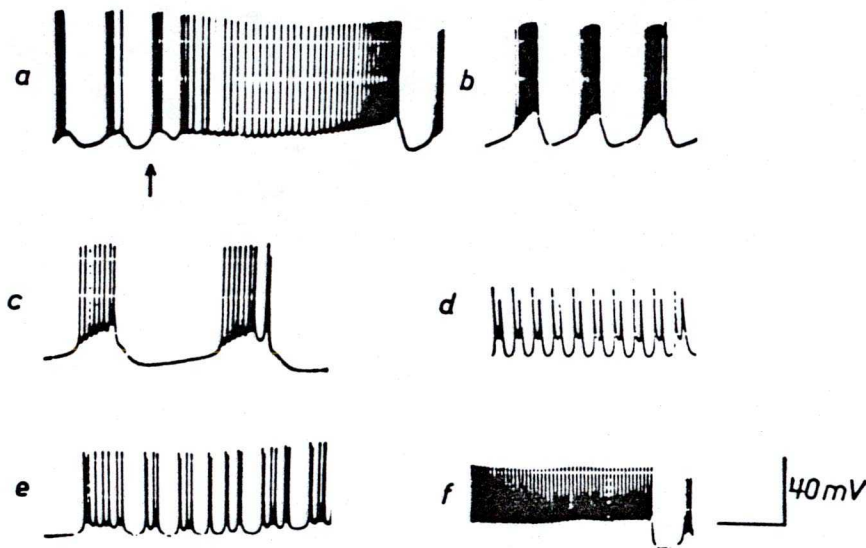
10. ábra

Intracellulárisan applikált 2,4-DNP hatása az RPal idegsejt spontán aktivitására

Az injekciót követően 15 perc elteltével az akciós potenciálok száma egy-egy sorozaton belül 40 %-kal csökkent. A sorozat első tagjának amplitudója tovább csökkent, az utolsó tagnál a korábbihoz képest nem változott. Az interspike intervallumok valamelyest rövidültek, ugyanakkor az interburst intervallumok értékei 4-szeresre nőttek (10. ábra, c), bár a hiperpolarizáció csak kisfokú volt. Az interburst szakasz egy rövid időtartamu, kisamplitudóju hiperpolarizációs fázisból és egy lassu, időben igen elnyújtott depolarizációs szakaszból állt. A depolarizációs szakasz második felében rendszerint igen gyors (1,5 cps), kisamplitudóju (2 mV) oszcilláció lépett fel. Az injekciót követően 25 perc múlva a sejt aktivitása jelentősen csökkent (10. ábra, d) és csak időnként jelent meg egy-egy potenciálsorozat. Ennek paraméterei a korábbihoz képest lényegében változatlanok voltak. Az igen hosszú, időnként 40-80 sec időtartamu interburst periódusokban megjelenő gyors membránoszcillációt nem mindig követték kisüléssorok, azonban a sorozatok megjelenését minden esetben ilyen oszcillációk előzték meg (10. ábra, d, e).

0,1-0,2 nl mennyiségű CdCl_2 intracelluláris bevitelét követően az RPal sejt aktivitásának igen szembetűnő megváltozása figyelhető meg: a sorozat-aktivitás felfüggesztődik, a membrán depolarizálódik és átmenetileg egyenletes (monomodális pacemaker) aktivitás figyelhető meg, melynek frekvenciája a de-

polarizáció fokozódásával növekszik. 25-30 sec múltán hiperpolarizációs hullám váltódik ki, amit a kontrollnál nagyobb amplitudójú lassu hullámmal kísért bimodális aktivitás követ. Az injekciót követően 8-10 perc múlva az akciós potenciálok amplitudója és száma fokozatosan csökken csak paroxizmális aktivitás figyelhető meg (11. ábra).



11. ábra

Intracellulárisan applikált CdCl_2 hatása a RPal idegsejt spontán aktivitására

b. és c.: folyamatos regisztráció más időalap esetén;

e.: aktivitás-mintázat 20 mV-os hiperpolarizáció esetén;

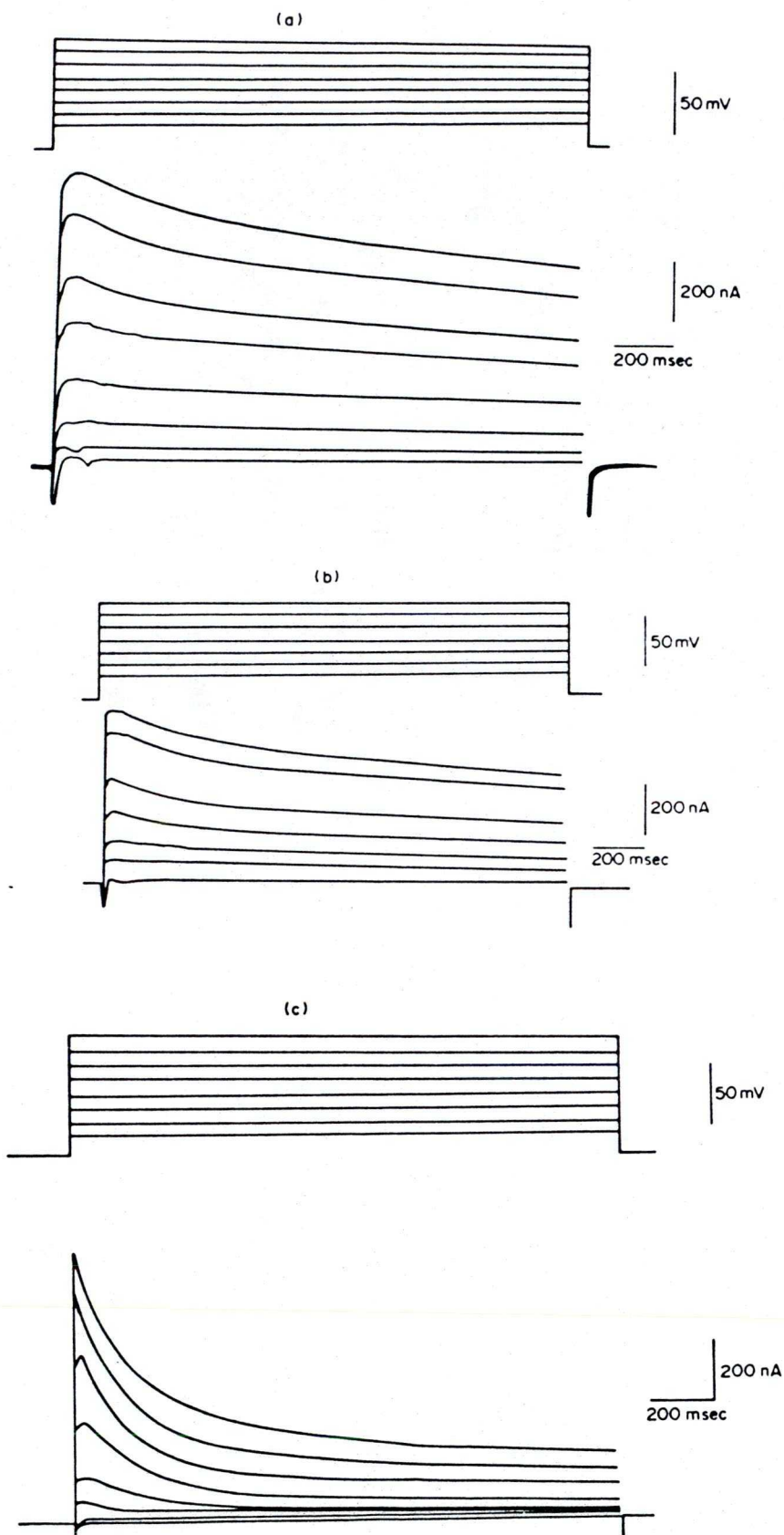
f.: aktivitásmintázat 20 mV-os depolarizáció esetén.

(e. és f. mintázat az applikálást követő 8-10 percben történt, időalap: a, b, e: 10 sec; c, d.: 4 sec.)

Az aktivitásra és aktivitási mintázatra gyakorolt hatás után azt vizsgáltuk, hogy a 2,4-DNP és CdCl_2 hogyan befolyásolják a neuron ionáramait. A kontroll, valamint 2,4-DNP és CdCl_2 bevitele után jellemző áramgörbék a 12. ábrán láthatók.

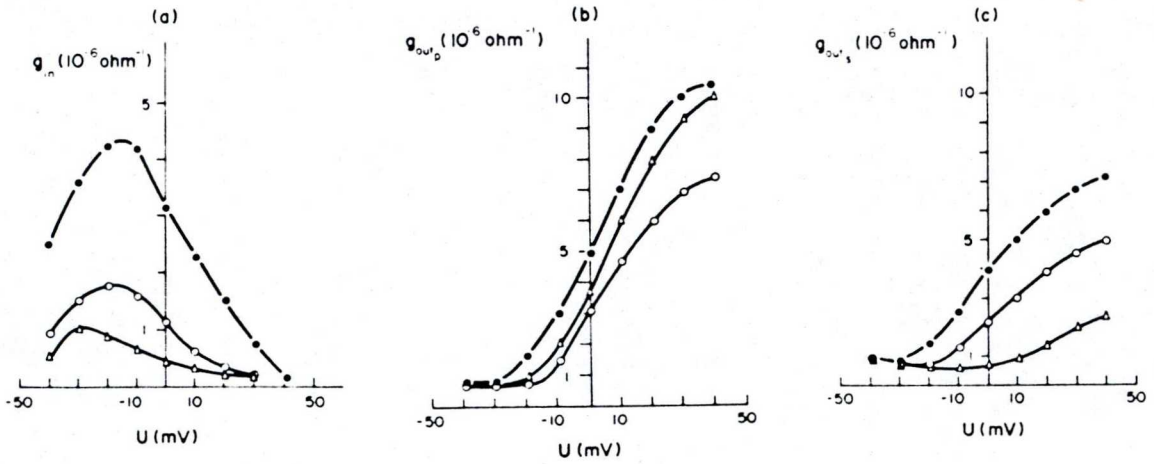
A kontroll esetében a maximális befelé irányuló áram felfutó meredeksége: $51,4 \cdot 10^{-6}$ A/sec, lefutási meredeksége $20,0 \cdot 10^{-6}$ A/sec. Ugyanezek a paraméterek 2,4-DNP injekciója után $36 \cdot 10^{-6}$ A/sec, illetve $6,25 \cdot 10^{-6}$ A/sec-nak, míg CdCl_2 injekciója után $49 \cdot 10^{-6}$ A/sec, illetve $18 \cdot 10^{-6}$ A/sec-nak adódtak. A befelé irányuló áramra vonatkozó vezetőképesség a feszültség függvényében a 13.a. ábrán látható. Csucsértéke: 2,4-DNP adása után $1,83 \cdot 10^{-6} \text{ Ohm}^{-1}$; CdCl_2 után pedig $1,05 \cdot 10^{-6} \text{ Ohm}^{-1}$; ezek a kontroll görbe $4,33 \cdot 10^{-6} \text{ Ohm}^{-1}$ értékéhez képest jelentősen kisebbek, a csucsértékek helyei pedig mintegy 5 ill. 15 mV-al a negatív feszültségtartomány felé tolódtak el.

A kifelé irányuló áram esetében kétféle vezetőképességet ábrázoltunk: a $g_{\text{out/p/}}$ függvény a csucsáramértékekre vonatkozó vezetőképesség (13.b.), a $g_{\text{out/s/}}$ függvény pedig az állandósult kifelé irányuló vezetőképességet mutatja, a feszültség függvényében.



12. ábra

Az RPa1 idegsejt ionáramai: a: kontroll; b: 2,4-DNP intracelluláris applikálása után; c: CdCl₂ intracelluláris applikálása után ($U_{\text{holding}} = -50 \text{ mV}$)



13. ábra

Az RPa1 idegsejt feszültségfüggő vezetőképességei

●—●: kontroll; ○—○: 2,4-DNP injekció után; △—△: CdCl₂ injekció után.

a: inward vezetőképesség; b: outward peak vezetőképesség;
c: outward steady state vezetőképesség.

$$g = \frac{I}{U} = \frac{I}{U_{\text{equ}} - U_{\text{test}}}; \quad U_{\text{equ inward}} = 30; \quad U_{\text{equ outward}} = -60 \text{ mV}.$$

Az ábrákból kitűnik, hogy a kifelé irányuló vezetőképesség mindkét anyag bevitele után csökken a kontrollhoz képest. A maximális "csucs" és az "állandósult" értékeket figyelembe véve a csökkenés aránya 2,4-DNP után hasonló:

$$\frac{g_{\text{out/p/ Kontroll}}}{g_{\text{out/s/ 2,4-DNP}}} = 1,4$$

$$\frac{g_{\text{out/s/ Kontroll}}}{g_{\text{out/s/ 2,4-DNP}}} = 1,6$$

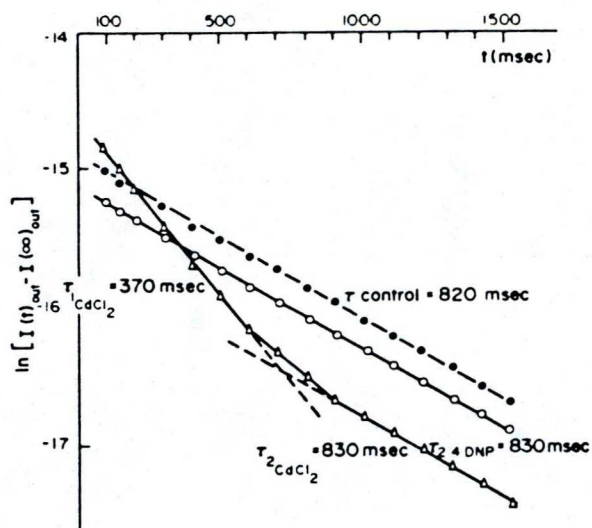
CdCl_2 után viszont a csucs érték csak kevéssé, az állandósult érték lényegesen csökkent:

$$\frac{g_{\text{out/p/ Kontroll}}}{g_{\text{out/s/ CdCl}_2}} = 1,1 \qquad \frac{g_{\text{out/p/ Kontroll}}}{g_{\text{out/s/ CdCl}_2}} = 3,6$$

A kifelé irányuló áram időfüggésének vizsgálata céljából fél-logaritmikusan ábrázoltuk a kifelé irányuló áramgörbéket (14. ábra). Az adott ábrázolási mód mellett az áramértékek több egyenesre illeszkednek. Meghatározva az egyenesek iránytangenseit, az áramgörbék különböző időállandóval rendelkező, exponenciálisan csökkenő komponensekre bonthatók.

A kontroll esetében az áramgörbe időállandója $\tau_{\text{kontroll}} = 820$ ms, míg 2,4-DNP injekciója után $\tau_{2,4\text{-DNP}} = 830$ ms, lényegében változatlan. CdCl_2 injekciója után az első, 600 ms-ig tartó inaktivációs szakasz alatt $\tau_{1\text{CdCl}_2} = 370$ ms időállandóérték adódik, míg 600 ms-tól az áramgörbe időállandója $\tau_{2\text{CdCl}_2} = 830$ ms.

Igy tehát a kontroll esetében és a 2,4-DNP után egy, CdCl_2 injekcióját követően pedig két, különböző időállandóju komponensre bontható az áramgörbe.



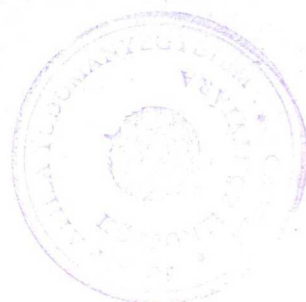
14. ábra

Az RPa1 idegsejt outward áramainak kinetikája

$U_{\text{holding}} = -50 \text{ mV}$, $U_{\text{test}} = 40 \text{ mV}$

●—●: control; o—o: 2,4-DNP injekció után;

△—△: CdCl_2 injekció után.

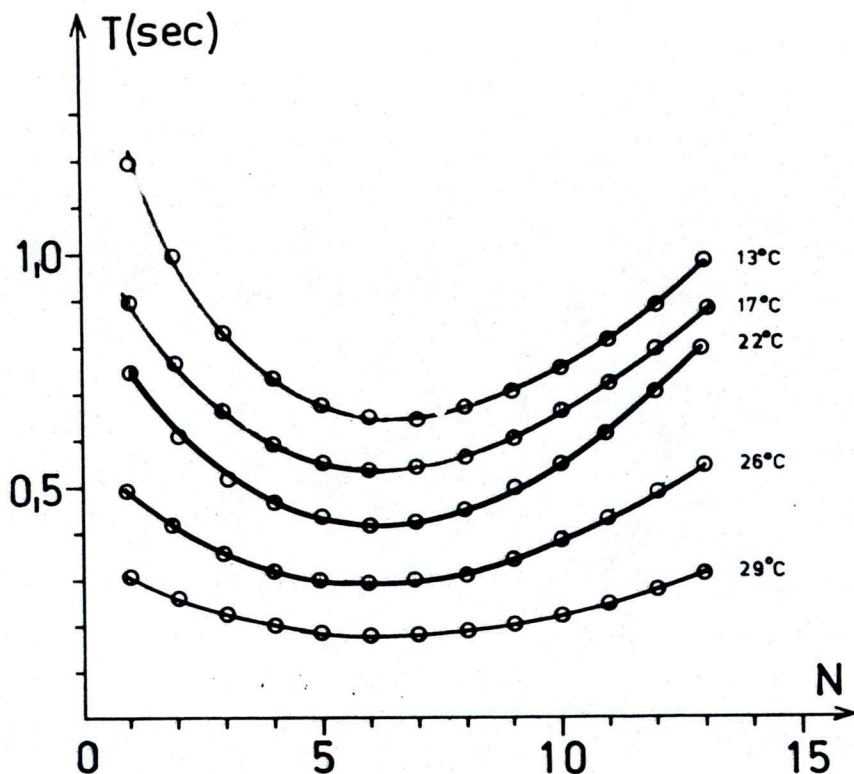


4.7. A hőmérsékletváltozás hatása az RPal neuron spontán aktivitására és ionáramaira

A külső hőmérséklet változtatása - mind a hűtés, mind a melegítés - megváltoztatta a sejt aktivitását. A változás 12°C és 30°C között mennyiségi volt, vagyis az aktivitásmintázat szakaszos jellege megmaradt és csak paraméterei változtak. A jellegzetes mintázat $10\text{-}12^{\circ}\text{C}$ alatt megszűnik; a lecsökkent kisülési frekvencia és akciós potenciál eloszlás szabálytalan-
ná válik. További hűtés - $4\text{-}5^{\circ}\text{C}$ alá - a sejt potenciál generálásának megszűnéséhez vezet.

Melegítéskor $30\text{-}32^{\circ}\text{C}$ -on szűnik meg az aktivitás szakaszos jellege. Ekkor a működési frekvencia megnő, megszűnnek az potenciálsorozatok közötti hiperpolarizációs szakaszok.

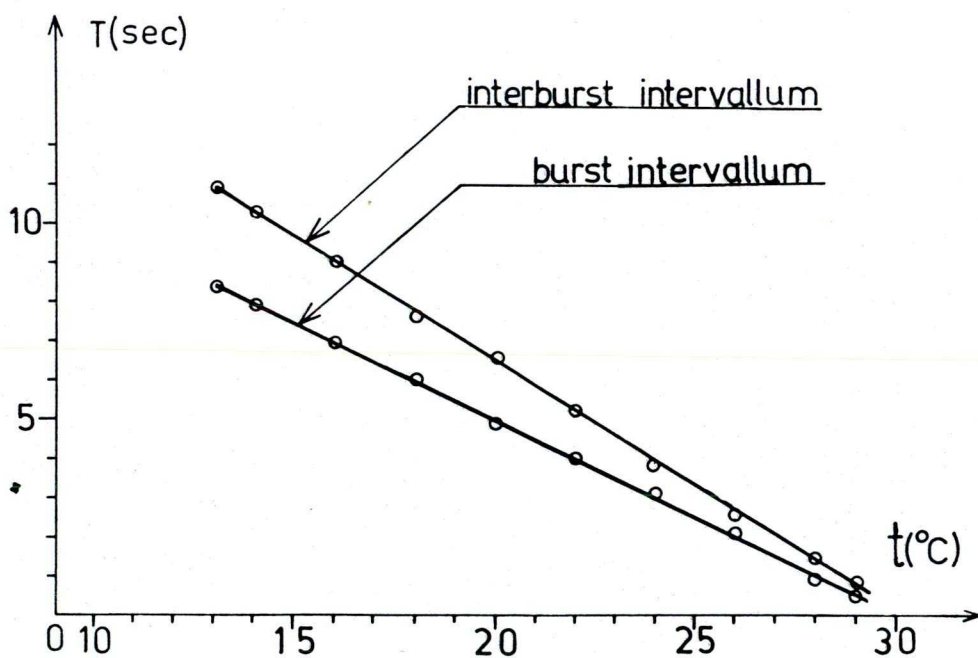
A szélső hőmérséklet értékeken kapott adatokat vetve össze a kontroll (22°C) esetében tapasztaltakkal, kitűnik, hogy a hőmérséklet csökkenésével az impulzusszélesség nő az azonos sorszámú, 22°C -on mérthez képest. Ugyanakkor a hőmérséklet emelésekor csökken az impulzusszélesség, és mindkét esetben a burst-ön belüli, spontán változás jóval kisebb intervallumban történik, mint a kontroll hőmérsékleten. Így az impulzusszélesség burst-ön belüli szélső értékeinek hányadosa 13°C -on:



15. ábra

A sorozaton belüli interspike-intervallum alakulása különböző hőmérsékleteken

(N, az interspike intervallum sorozaton belüli sorszáma; T, időtartama)



16. ábra

A kisüléssor időtartam (burst) és a sorozatok közötti (interburst) idő alakulása a hőmérséklet függvényében

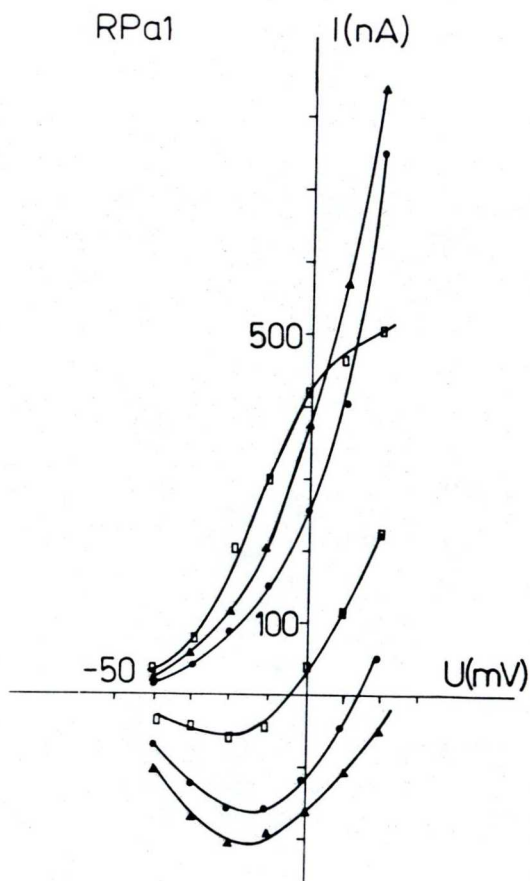
0.84, 22°C-on: 0.55, 29°C-on: 0.5. Kiderült az is, hogy a hőmérséklet okozta spike-időtartam változás - csökkenés vagy növekedés - a felszálló szár meredekségének változásával függ össze.

Vizsgálva az impulzussorozaton belül az egymást követő akciós potenciálok közötti időtartam változást a hőmérséklet függvényében, azt tapasztaljuk, hogy azok a sorozat első felében csökkennek, majd elérve minimális értéküket, a sorozat második felében növekednek. Ez a típusu, spontán változás minden hőmérsékleti értéken megfigyelhető, de alacsonyabb hőmérsékleten nagyobbak az időértékek, magasabb hőmérsékleten pedig kisebbek (15. ábra).

A vizsgálatok során nemcsak az impulzus időtartam és az interspike intervallum bizonyult hőmérsékletfüggőnek, hanem a kisüléssorok időtartama és az interburst időtartam is. Elemezve a sorozatok közötti szünet időtartamát, kitűnt, hogy az interburst időtartam minden hőmérsékleten nagyobb, mint a kisüléssor időtartama. A hőmérséklet emelkedésekor mind a sorozatok, mind a közti szünetek időtartama lineárisan csökken (16. ábra), a kettő hányadosa azonban változatlan, megközelítőleg 0.7.

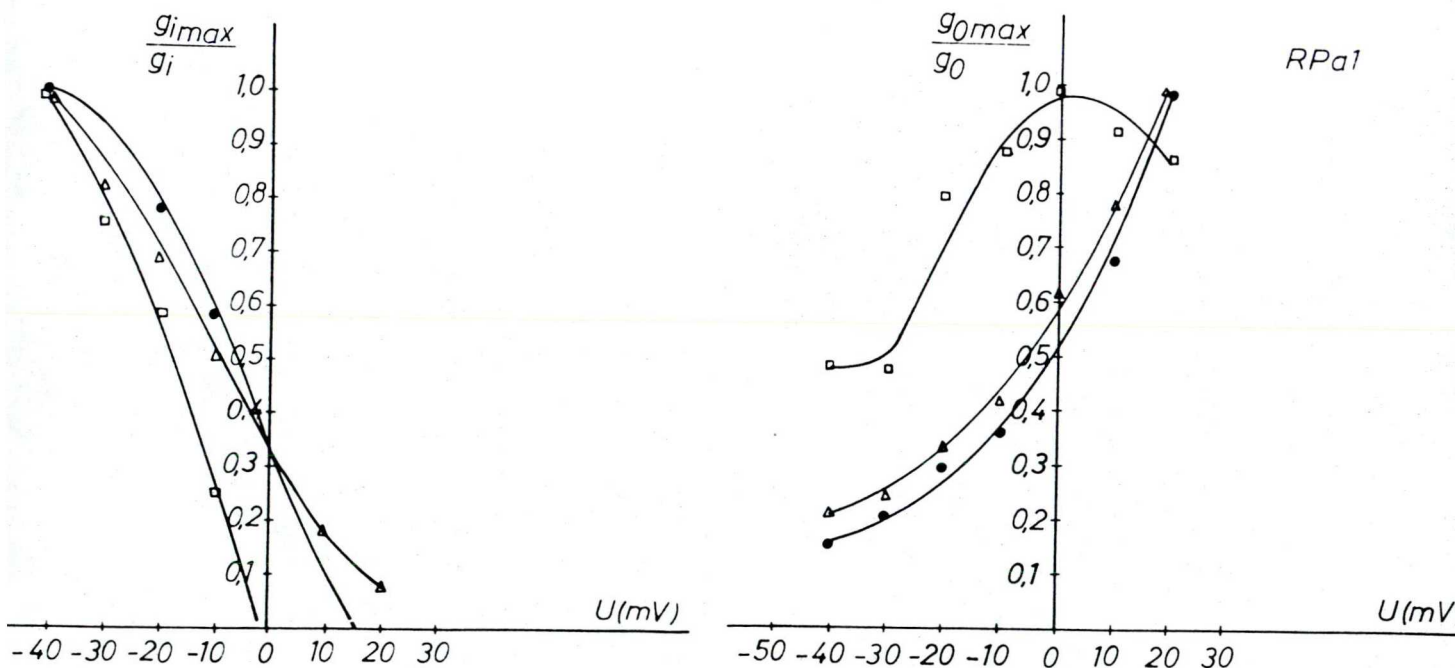
Az RPa1 sejt ionáramainak hőmérséklet függését vizsgálva voltage clamp módszerrel kitűnt, hogy e változás a különböző

ionáram komponensek esetében különböző. A befelé irányuló áramkomponens maximuma 22°C -on $160 \pm 10 \text{ nA}$, 7°C -on $50 \pm 11 \text{ nA}$, 33°C -on $200 \pm 20 \text{ nA}$ (17. ábra). A kifelé irányuló áram eleinte az alacsony hőmérsékleti értéknél nagyobb, de emelkedési sebessége a pozitívabb feszültség tartományokban csökken. Az RPal sejt vezetőképességének (relatív vezetőképesség) változása a hőmérséklet függvényében a 18. ábrán látható. Megfigyelhető 7°C -on a kifelé irányuló árammal szembeni magas kezdeti vezetőképesség, ugyanakkor ennek csökkenése a pozitív feszültség tartományban. A befelé irányuló árammal szembeni vezetőképesség hőmérséklet függése nem ilyen kifejezett. Az áramértékek nagyságában bekövetkező változások mellett igen szembetűnőek voltak az időviszonyokban bekövetkezett módosulások. Alacsony hőmérsékleten jelentősen megnőtt a befelé irányuló áram teljes időtartama, míg magas hőmérsékleten ugyanez csökkent a kontrollhoz képest. A 19. ábrán látható, hogy mintegy 50 msec-os különbség van a különböző vizsgált hőmérsékleten kapott értékek között a legkisebb, 10 mV-os négyszögimpulzus esetén, mely 50 %-os változásnak felel meg. Ugyanakkor az 50 mV-os impulzus és a maximális, mintegy 90 mV-os impulzus esetén, bár az időtartam különbség 2.5 - 3 msec volt, százalékosan kifejezve változatlanul megegyezik a minimális jel esetén kapott különbséggel, és e pozitív feszültségtartományban állandónak bizonyult.



17. ábra

Az RPa1 sejt feszültség-áram karakterisztikái
 ($\square$: 7°C ; $\bullet$: 22°C ; $\blacktriangle$: 33°C ; az abszcissa alatt a befelé irányuló, felette a kifelé irányuló áramértékek)



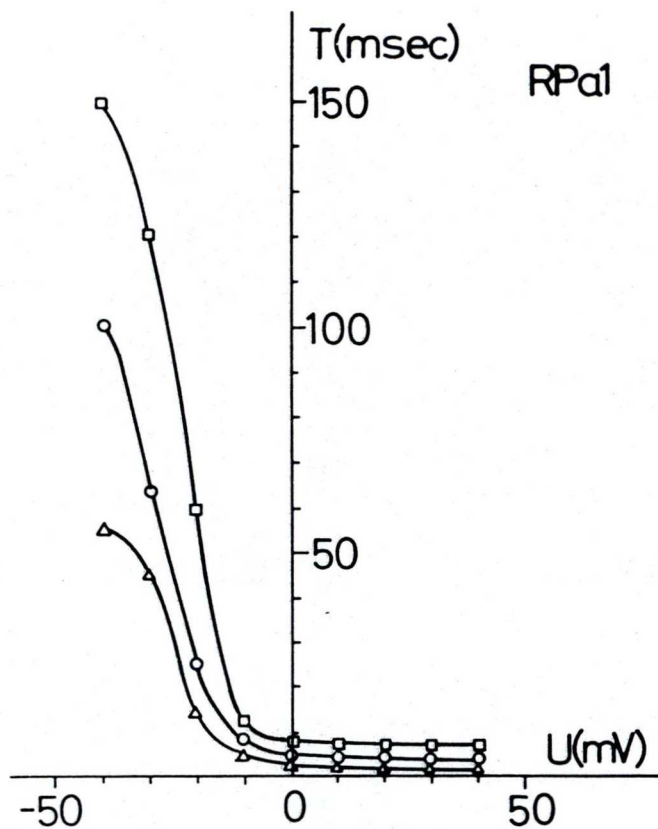
18. ábra

Az RPa1 sejt relatív vezetőképességének feszültség függése
 ($\square$: 7°C ; $\bullet$: 22°C ; $\triangle$: 33°C ; g_i : Na^+ -vezetőképesség; $g_{i\text{max}}$: maximális Na^+ -vezetőképesség; g_0 : K^+ -vezetőképesség; $g_{0\text{max}}$: maximális K^+ -vezetőképesség)

(A kondicionáló hiperpolarizáció hatásának vizsgálatakor kitűnt, hogy az RPal sejt nem rendelkezik az un. gyors tranziens kifelé irányuló komponenssel.)

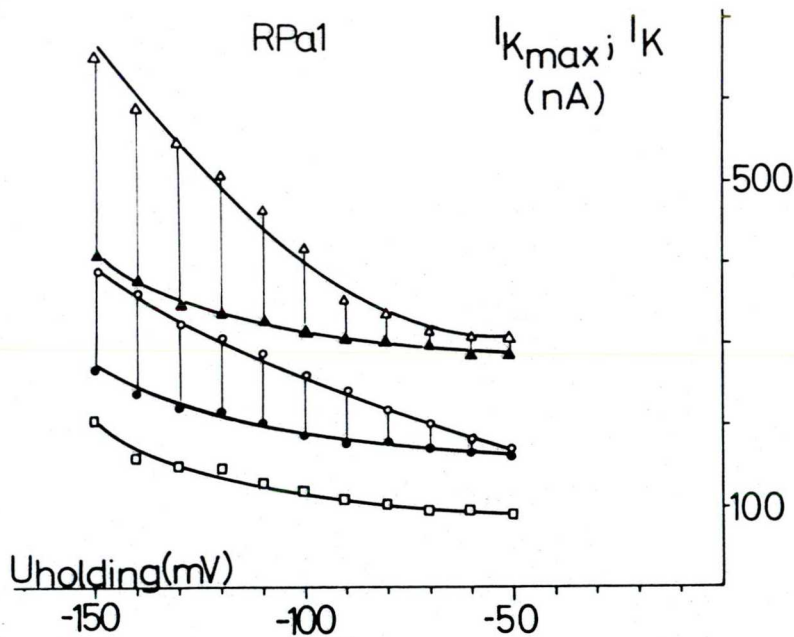
A lassu kifelé irányuló áram inaktivációjának vizsgálata során mindig azonos nagyságu feszültség szintet más és más kezdeti (holding) szintről értük el. A kiinduló szint megegyezett a nyugalmi membránpotenciál értékével (-50 mV), maximálisan -150 mV, időtartama pedig 250 msec volt. Alacsony hőmérsékleten (7°C) az áram végig emelkedő volt (csak aktivációs koefficienssel rendelkező) minden vizsgált feszültség tartományban. A kontroll hőmérsékleten már némi inaktiváció is megfigyelhető volt az áramok időbeni alakulásában. Ez az inaktivációs jelleg magas hőmérsékleten vált igen kifejezettebbé, s a -150 mV-os előhiperpolarizációnál volt maximális.

A kifelé irányuló áramok maximum értékei, valamint a hozzájuk tartozó, a feszültségugrás végén mért, megközelítőleg állandósultnak tekinthető értékei a kiinduló (holding) szint függvényében a 20. ábrán lettek feltüntetve. Kitűnik, hogy 7°C -on az állandósult és a csucs értékek megegyeznek. 22°C -on -150 mV-os feszültség szinten maximális a két áramérték közti különbség (67 %), majd -50 mV-os kondicionáló feszültségnél eltűnik. 33°C -on szintén -150 mV-nál maximális a különbség (63 %), míg -50 mV-nál 5 % körüli értéket vesz fel.



19. ábra

Az RPa1 sejt befelé irányuló áram időtartamának feszültségfüggése különböző hőmérsékleti értékek esetén
 ($\square$: 7°C ; $\circ$: 22°C ; $\triangle$: 33°C)



20. ábra

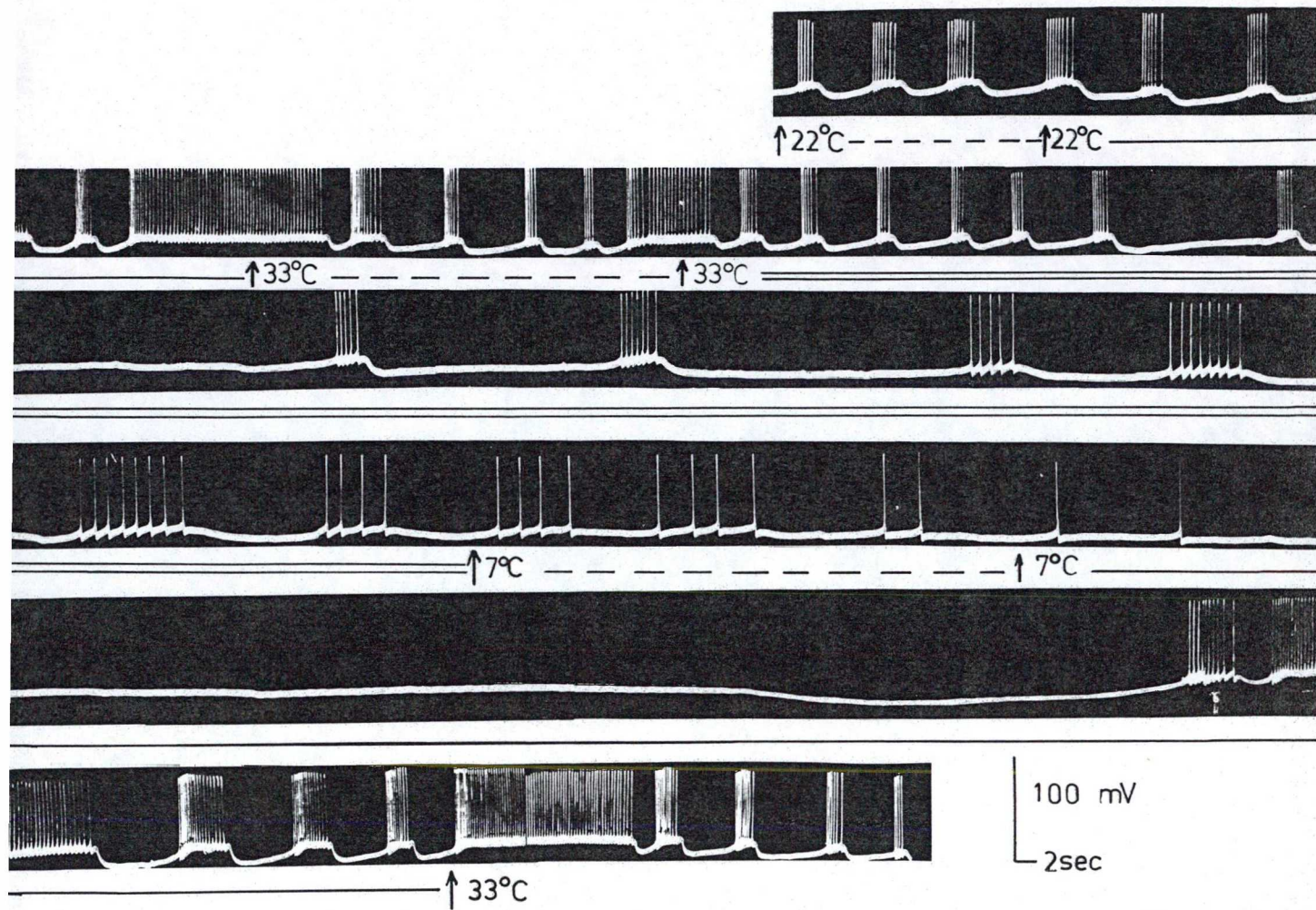
Az RPa1 sejt kifelé irányuló áramainak maximális és állandósult értékei a kondicionáló hiperpolarizáció feszültségének függvényében, különböző hőmérsékleteken.

($\square$: 7°C , $U_h = -50$ és -150 mV; $\bullet$: 22°C , $U_h = -50$ mV; $\circ$: 22°C , $U_h = -150$ mV; $\blacktriangle$: 33°C , $U_h = -50$ mV; $\triangle$: 33°C , $U_h = -150$ mV)

Az eddig végzett vizsgálatok esetében - ha különböző hőmérsékleti értékeken is, de mindig stacionárius körülmények között végeztük méréseinket. A folyamatok hőmérséklet függésének pontosabb tisztázása érdekében végeztünk olyan méréseket is, melyek során adott sebességgel nőtt vagy csökkent a hőmérséklet.

A kapott adatok kiértékelése során egyrészt a folyamatosan regisztrált aktivitást, másrészt pedig az időviszonyokat pontosan tükröző ún. "szukcessziv hisztogramokat" vettük figyelembe. Ez utóbbi módszernek a lényege az, hogy az egymást követő impulzussorozatok között eltelt időket, az egymást követő akciós potenciálok közötti időket, valamint az egymást követő akciós potenciálok impulzusszélességét a sorszámuk függvényében ábráztuk.

A 21. ábrán az RPal sejt aktivitásának alakulása látható hőmérséklet változás esetén. Kiindulási állapot a 22°C -on kapott minta ($22^{\circ}\text{C} - 22^{\circ}\text{C}$, szaggatott vonal). Ezután a hőmérsékletet emelve 33°C -ra (folyamatos vonal), majd kb. fél percig ezen értéket tartva (szaggatott vonal) regisztráltuk az aktivitást. Ezt követte a hűtés, amikor 33°C -ról 7°C -ra csökkentettük a hőmérsékletet (kettős vonal). A kísérletek befejező szakaszában 7°C -ról 33°C -ra emeltük a hőmérsékletet (folyamatos vonal).



21. ábra

Az RPa1 sejt aktivitási mintázatának alakulása folyamatosan változó hőmérséklet esetén

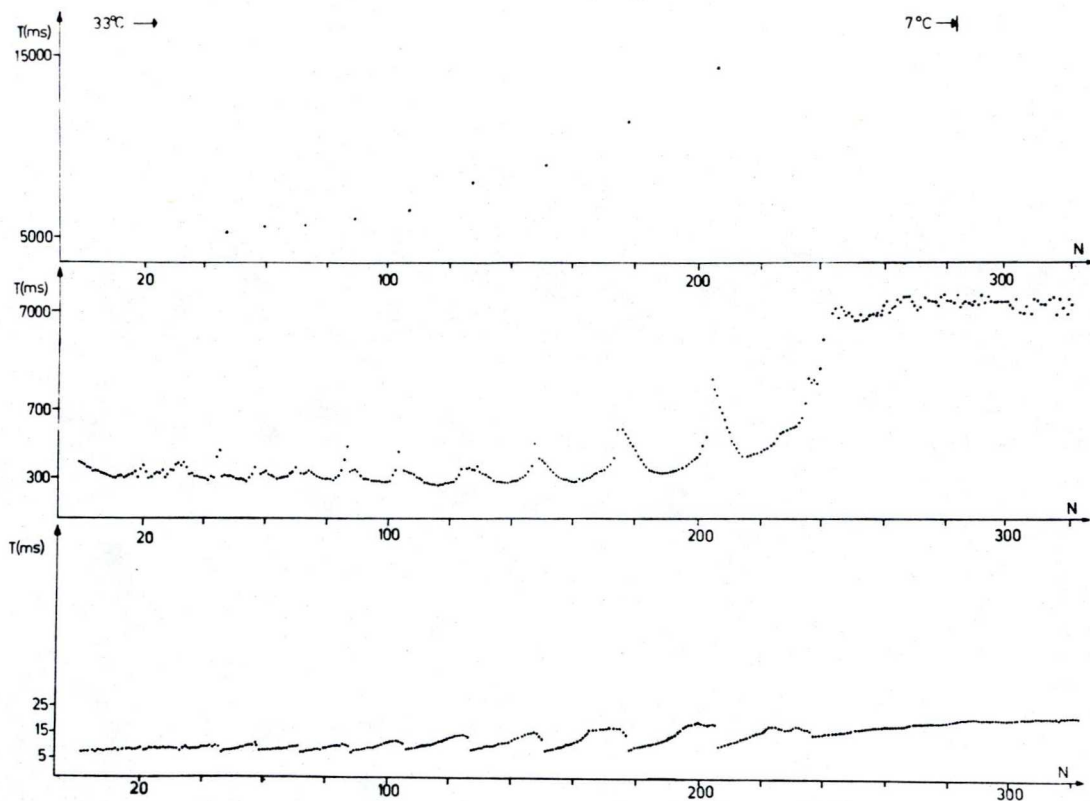
(a kettős vonal a hűtést, a szaggatott vonal a stabil hőmérsékleten tartást, az egyszeres folyamatos vonal a melegítést jelzi)

A 33°C -ról 7°C -ra történő hűtés alatt az aktivitásmintán megfigyelhető, hogy az impulzussorozatok időtartama nő, ugyanakkor növekedtek az interburst intervallumok értékei is. Valamivel a 7°C -os érték elérése előtt a burstképzés megszűnik, az aktivitás folyamatossá vált. A 22. ábrán a szukcessziv hisztogram látható - hűtés esetén. Az interburst intervallumok mintegy 15 sec-ra nőnek, majd a szakaszos működés megszűntekor eltűnnek. A hűtés folyamán egyre határozottabban kialakult az un. parabolikus interspike intervallum változás, majd a 7°C elérése előtt, kb. 11°C -on - a szakaszos működés megszűntekor - egy stabil, mintegy 7000 msec-os kisüléssorozattá vált. Az akciós potenciálok időtartama a hűtés hatására nőtt; abban az intervallumban, amikor a sejt működése szakaszos volt, a potenciálok impulzusszélességének változása - ha egyre növekvő időértékekkel is - megfelelt a kontroll körülmények között tapasztalható, lineárisan növekvő, majd csökkenő spontán változásnak.

A 7°C -ról 33°C -ra történő melegítés hatását szintén a 21. ábrán láthatjuk. Az alacsony hőmérsékleten lassan működő sejt a hőmérséklet emelésére leáll és hiperpolarizációval válaszol, majd hirtelen beindul a burst generálás. Az interburst intervallumok fokozatosan csökkennek, s valamivel a 33°C -os érték elérése előtt meg is szűnnek, a sejt működése folyamatossá válik. Ugyanakkor a 33°C -os, konstans szinten tartás esetén

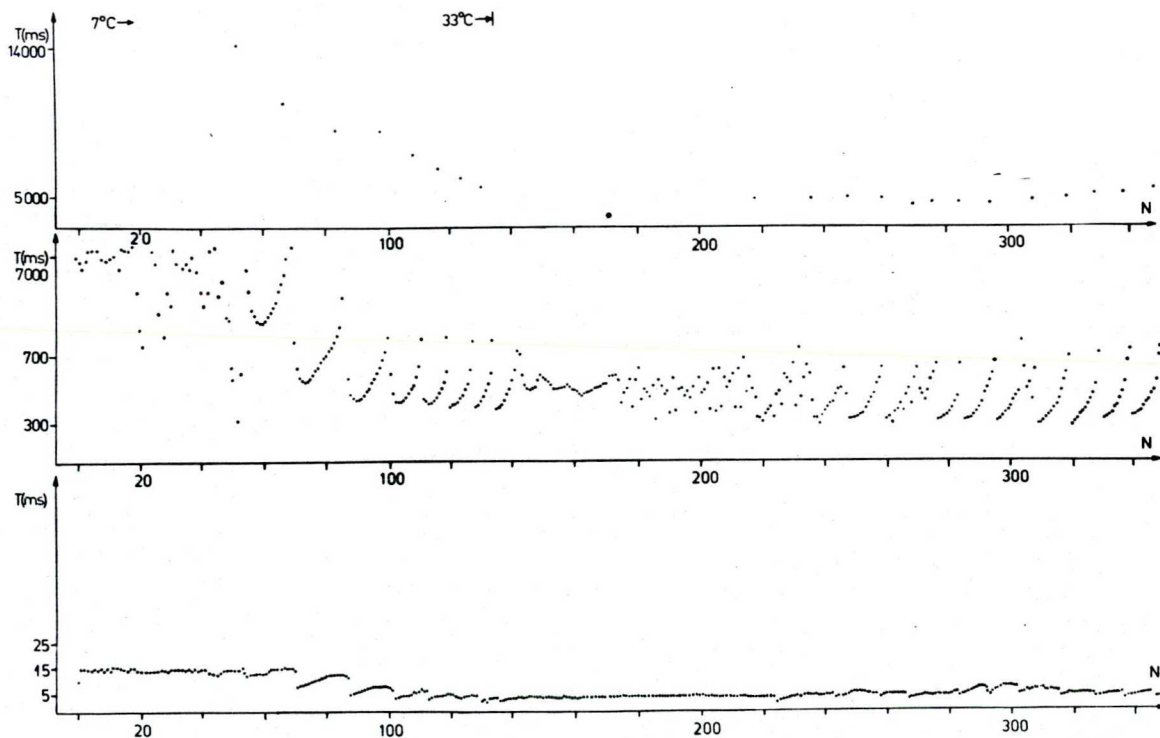
megjelennek az interburst intervallumok, vagyis visszatér az aktivitás szakaszos jellege.

Az aktivitás paraméterek változását a szukcessziv hisztogramok demonstrálják (23. ábra). 7°C -on még nem beszélhetünk interburst intervallumokról, de a szakaszos működés beindulásakor értékük folyamatosan csökken 14 sec-ról 5 sec-ra, majd megszűnnek, és a tartósan magas hőmérsékleti tartományban újra megjelennek. A szakaszos működés beindulásakor kialakul az interspike intervallumok jellege, de a magasabb hőmérsékleten ez aszimmetrikussá válik, oly módon, hogy a parabolák első fele eltűnik. Az akciós potenciálok alakulása az előző esethez hasonlóan alakult, átlagértékük 7°C -on 15 ± 3 msec, 33°C -on $7 \pm 1,8$ msec volt.



22. ábra

Az RPa1 sejt szukcessziv hisztogramjai 33⁰-ról 7⁰C-ra történő hűtéskor (KFKI NTA-512B analizátor felhasználásával)
 (fent: interburst intervallumok; középen: interspike intervallumok; lent: spike időtartamok)



23. ábra

Az RPa1 sejt szukcessziv hisztogramjai 7⁰C-ról 33⁰C-ra történő melegítéskor

MEGBESZÉLÉS

Az utóbbi évek vizsgálatai kimutatták, hogy a gerinctelen állatok óriás idegsejtjei az óriásaxon esetében definiált un. gyors befelé irányuló (Na) csatornán kívül rendelkeznek egy kevert un. lassu (Na-Ca) csatornával (Eckert és Lux, 1976). Mivel a TTX csak a Na-csatorna specifikus blokkolója s az RPal sejten az applikálást követően is sikerült jelentős befelé irányuló áramot regisztrálni, sőt, a membránpotenciál növelésével visszaállítódott az eredeti áramérték, következtethető, hogy bár az akciós potenciál generálásban a Na ionok szerepe döntő, a befelé irányuló áram hordozása a kevert csatornán történik, és jelentős szerep jut ebben a Ca ionoknak. Mivel spontán körülmények között a TTX hozzáadása a spike képzést lényegében megszünteti, a Na-mentes oldat pedig teljességgel lehetetlenné teszi, ugyanakkor befelé irányuló áram mérhető, azt sugallja, hogy normál körülmények között a Na ion beáramlása az elsődleges (gyors csatorna), melynek hiányában a Ca által hordozott áram, illetve a Ca-modulált Na áram léphet fel.

Ezek alapján feltételezhető, hogy a sejtmembrán két inward csatornával rendelkezik; az első a Na ionok áthaladására, a másik a Na és Ca ionok számára. Ugyanakkor nem tisztázott az, hogy e két csatorna topológiailag is különbözik-e. Elvileg nem kizárt

tulajdonképpen egy ioncsatorna - külső vagy belső hatásra történő - modifikációja sem, annál is inkább, hogy ezideig semmiféle módszerrel sem sikerült kimutatni, meggyőzően bizonyítani a kétféle csatorna típus fizikai létét.

Végzett vizsgálatainkból az is kitűnik, hogy a lassu hullámváz mechanizmusa és az akciós potenciál generálása két különböző folyamat eredménye, bár mindkettőben jelentős, illetve elsődleges szerepe van a Na ionoknak. Ugyanis a TTX blokkolta potenciálgenerálás alkalmával is kiváltható a lassu oszcilláció, míg a spike képzés erősen gátolt. Ez azt bizonyítja, hogy bár mindkét folyamathoz a Na ionok jelenléte (vagy a Na permeabilitás adott állapota) szükséges, mégsem azonos módon funkcionálnak az említett két mechanizmus esetében, s mint ahogyan ez később nyomatékosan felmerül, a lassu hullámváz generálásában döntő szerepe van az erősen anyagcserefüggő elektrogén Na-pumpának (Strumwasser és Kim, 1969).

A TEA-Cl hozzáadásakor kapott eredmények megvitatásakor szinte teljességgel megismételhető a fenti gondolatmenet, azzal a különbséggel, hogy adott esetben a "tiszt" kálium, illetve a kalcium által modulált kálium csatornáról (vagy áramokról) beszéltünk. A TEA-Cl szintén blokkolta a potenciálképzést, ugyanakkor a lassu hullámváz megmaradt. Természetesen e blokkolás a K^+ csatorna (permeabilitás) gátlása révén realizálódik, s bár a voltage clamp kísérletek során a kifelé irányuló

áram teljes gátlása volt megfigyelhető, a spontán lassu hullám generálás megmaradt. Az azóta végzett, eddig még nem publikált eredményeink azonban azt mutatták, hogy a kifelé irányuló (K^+) áram maga is két komponensből áll, s TEA-Cl-dal specifikusan csak a lassu komponens blokkolható, míg a másik, erősen Ca-függő komponens pedig $CoCl_2$ hozzáadására tűnik el, de ekkor a lassu hullámzás nemcsak hogy megmarad eredeti nagyságában és intenzitásában, de fokozódik is a spike-generálás depolarizációs gátlása mellett.

Bár a fenti megfontolások és eredmények nem képesek maradéktalanul tisztázni a Na és K ionok, illetve membránpermeabilitásuk szerepét az adott aktivitási mintázat kialakításában, felhívják a figyelmet a Ca ionok igen jelentős - bár sokszor közvetett - szerepére mind a más ionok szerepének modulálásában, mind pedig az önálló áramhordozásában.

Mint ismeretes, a 2,4-DNP elsősorban az oxidatív foszforiláció folyamatának szétkapcsolása révén gátolja a ATP szintézist, mely utóbbi a sejt metabolikus folyamatainak, valamint funkcionális működésének energetikai alapjait biztosítja. Azon szövetek és sejtek esetében, melyek rendelkeznek Na-pumpa aktivitással, a 2,4-DNP hatása e pumpa működéséhez szükséges energiaforrás (ATP) szintézisének gátlása révén a nyugalmi potenciál csökkenéséhez vezet (Ayrapetyan, 1969c; Nakajima és Takahashi, 1966; Godfraind et al., 1971). Aplysia R15 jelzésű

bimodális pacemaker sejtjén a perfúzióban adott 2,4-DNP először depolarizációt, majd a burst-aktivitás teljes gátlása előtt jelentős membránpotenciál növekedést okoz, a hiperpolarizációs mechanizmus gátlása nélkül (Junge és Stephens, 1973).

Helix pomatia RPal sejtjén az intracellulárisan adott 2,4-DNP a spontán aktivitási mintázatot úgy módosította, hogy a lassu hullámzást gátolta és csak az aktuális kisüléssorozatot megelőzően volt megfigyelhető egy viszonylag gyors, kisamplitudójú membránoszcilláció. (A burst-frekvencia csökkenése mellett figyelemreméltó, hogy a már beindult kisüléssorozat akciós-potenciáljainak frekvenciája változatlan, illetve esetenként kissé növekedett is a kontrollhoz képest.)

Ebből arra lehet következtetni, hogy a 2,4-DNP gátolja azokat a sejten belüli folyamatokat, melyek az aktivitás periodikus megjelenéséért felelősek. Hasonló jelenség volt észlelhető a sejt mintázatában a hőmérséklet csökkentésekor (Wachtel és Wilson, 1973; Carpenter, 1973; Salánki et al., 1973; Vadász és Véró, 1974). Az akciós potenciálok generálását a 2,4-DNP és a hűtés azonos módon, de kevésbé befolyásolta, továbbá a belépő áram kialakulási sebessége, valamint a be- és kifelé irányuló áramok amplitudója is azonos módon változott (Vadász és Veró, 1975). A membrán vezetőképességének megváltozása részben az intracelluláris anyagcserefolyamatok gátlásának,

részben a 2,4-DNP közvetlen membránhatásának következménye lehet. A CdCl_2 intracelluláris injekciója esetén a spontán aktivitási mintázat megváltozása hasonló volt ahhoz, amit a CdCl_2 és a CoCl_2 extracelluláris alkalmazása váltott ki (Salánki et al., 1979; Vadász és Salánki, 1976).

Ez a hatás intracelluláris folyamatokkal is összefüggésben lehet, amit a jellegzetes mintázat eltűnése jelez, azonban az áramgörbék arra mutatnak, hogy a CdCl_2 -nak jelentős a közvetlen membránhatása. A feszültség-rögzítéssel kísért kísérletek azt is bizonyították, hogy a CdCl_2 intracelluláris injekciója a CoCl_2 hatásához hasonlóan (Eckert és Lux, 1976) csökkentette a befelé irányuló lassu (Ca^{++}) áramot és a késői K^+ áramot (Vadász és Salánki, 1976), ugyanakkor a kifelé irányuló áram kezdeti csúcserőértékét alig befolyásolta.

Ugy tűnik, hogy a sorozataktívitású idegsejt sajátos működése intracelluláris injekcióval két támadásponton is befolyásolható: a sejten belüli folyamatok, illetve a membrán ionpermeabilitása útján. A sejten belüli ionkoncentráció változásának a membránoszcillációban játszott szerepét Ca^{2+} -ra vonatkozóan többen kimutatták (Meech, 1974; Lux, 1976), aminokra vonatkozóan pedig újabban (Morita és Koketsu, 1980) is igazolták. Az ionkoncentráció változása közvetlen összefüggésben lehet intracelluláris anyagcsereciklusokkal, és annak hatása tükröződhet

a membrán vezetőképességének periodikus változásában. Lehetőséges, hogy ebben a folyamatban a Ca^{++} -nak vezető szerepe van, (Meech, 1972) ennek bizonyítása azonban további vizsgálatok feladata.

A kifelé irányuló áram kinetikája kontroll és 2,4-DNP esetében lényegében azonos időállandó értékekkel jellemezhető.

CdCl_2 injekció után kapott időállandók viszont arra mutatnak, hogy a CdCl_2 jelentősebben változtatja meg a membrán sajátosságait, mint a 2,4-DNP. A CdCl_2 bevitele utáni áramgörbék két exponenciálisan csökkenő komponenst tartalmaztak, melyek közül az első (τ_1), mely a kilépő áram gyors inaktiválódását jelzi, különösen eltér a kontrolltól, a τ_2 a gyors inaktivációt követő állandósult szakaszt jellemzi. E komponensek a K-csatornák különböző állapotára utalnak, de az is lehetséges, hogy eltérő természetű K-csatornák jelenlétével magyarázhatók. Mindenesetre ezek az adatok is azt mutatják, hogy a CdCl_2 a 2,4-DNP-nél lényegesen kifejezettebb közvetlen membránhatással bír.

A hőmérséklet hatásának vizsgálata bizonyította, hogy bár az akciós potenciál generálás és a lassu hullámváz is hőmérsékletfüggő, e függés mértéke és minősége közel azonos. A potenciál ionelmélete hőmérsékletemelés esetén a nyugalmi potenciál növekedését feltételezi, ugyanakkor mások is kimutatták, hogy a sejtaktivitás fokozódhat ekkor (Barker és Carpenter, 1970), ami a nyugalmi és akciós potenciál viszonyának szokásos értel-

mezése szempontjából nehézséget okoz. Magyarázatként az szolgálhat, hogy a hőmérséklet növelése, nemcsak a nyugalmi potenciált növeli, de a metabolitikus folyamatokat és a pacemaker mechanizmust is serkenti (Carpenter, 1970). A magasabb hőmérséklet még a Nernst egyenlet által előírtnál is fokozottabb mértékben emeli a nyugalmi potenciál értékét, mely tényt éppen fokozottabb elektrogén Na-pumpa hiperpolarizáló hatása magyaráz, mely végsősorban a fokozott metabolikus aktivitás, illetve a megnövekedett nyugalmi potenciál eredménye. (A Na-pumpa aktivitás, az aktuális nyugalmi potenciál, valamint a hőmérséklet összetett viszonyát vizsgálva szép példáját kapjuk az élő szövetben megtalálható pozitív visszacsatolásoknak.) Ha azonban a Na-pumpát ouabainnal blokkoljuk, akkor a hőmérsékletemelés depolarizációt eredményez (Gorman és Marmor, 1970), ami valószínűleg a nyugalmi Na^+ permeabilitás növekedésével van kapcsolatban, mely utóbbi alapvető fontossággal bír a spike generálás hőmérséklet emelésekor bekövetkező fokozódása szempontjából.

E vizsgálatok azt a feltételezést látszanak bizonyítani, hogy az adott típusu pacemaker működés alapjául szolgáló lassu oscilláció az elektrogén Na-pumpa aktivitásával kapcsolatos, míg az akciós potenciál generálás a Na^+ permeabilitás (elsősorban nyugalmi) függvénye.

A hőmérsékletnek a membránpermeabilitásra és ionmozgásokra gyakorolt hatása adhat magyarázatot a spike-időtartam és az

interspike időtartam hőmérséklet növekedésekor észlelt meg-
rövidülésére is. Minthogy a leszállószár sebességváltozása
jelentősebb, az tételezhető fel, hogy a hőmérséklet nagyobb
mértékben hat a repolarizációért felelős K-áramra, mint a kez-
deti Na-permeabilitásra, és így a hőmérséklet csökkenésével
lassuló repolarizáció lehet az elsődleges oka az impulzusszé-
lesség növekedésének.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az aktivitás para-
métereinek változása hiszterézis jellegű, vagyis egy adott hő-
mérsékleti értékhez két aktivitási paraméter rendelhető, attól
függően, hogy milyen irányu a hőmérséklet változás. A konstans
33°C elérése után a már beállt folyamatos aktivitás újra sza-
kaszossá válása azzal magyarázható, hogy a sejtaktivitást meg-
határozó alapmechanizmusok - nagy valószínűséggel a metabolikus
aktivitás is - nemcsak a hőmérséklet abszolút értékének, de
változási irányának, s sebességének is függvénye.

Mivel a membrán különböző ionokkal szembeni vezetőképessége
arányos a permeabilitással, belátható, hogy az áramok hőmér-
séglet függése a vezetőképesség változásokban tükröződik. Így
az RPa1 sejt esetében is a hőmérséklet csökkenésekor tapaszt-
alható áramérték csökkenések - bár a csökkenés mértéke a ki-
felé, illetve befelé irányuló áramok esetében nem volt azonos
mértékű, mely a ki- és befelé vezető csatornák eltérő hőmér-

séklet függését is bizonyítja - végsősoron a Na, Ca és K vezetőképességek csökkenéséből adódtak. A hőmérséklet változás az áramgörbék időparamétereire egyértelmű hatást gyakorolt; alacsonyabb hőmérsékleten az inward áram aktivációs és inaktivációs állandói csökkentek. Míg a vezetőképesség állandó összetevőjének nagyságát elsősorban az un. maximális, időfüggetlen permeabilitási állandó (Hodgkin és Huxley, 1952) határozza meg, az áramok időbeni lefutása a membrán különböző típusu időállandóinak függvénye. Ezt bizonyítja az is, hogy a különböző nagyságu kondicionáló hiperpolarizáció alkalmával a membrán aktivációs és inaktivációs képessége hőmérsékletfüggő. Alacsony hőmérsékleten mind a befelé, mind pedig a kifelé irányuló áram lényegében arányosan csökkent aktivációval és inaktivációval bir, míg a magasabb hőmérsékleti tartományokban a befelé irányuló áram jóval nagyobb mértékben növekszik. Ez azt eredményezte, hogy a kifelé irányuló áram igen erős inaktivációt mutatott.

Chen és Baumgarten (1971) vizsgálatai kimutatták, hogy a ritmikus pacemaker aktivitás elsődlegesen két metabolikus folyamat függvénye; ATP hidrolízis és a glikolízis. E két folyamat közül ha az egyik blokkolt, az a pacemaker aktivitás teljes megszűnéséhez vezet. A vizsgálatokban szereplő metabolikus gátlók egyrészt direkt módon gátolták, mások indirekt módon befolyásolták a glikolízist. Jódacetát közvetlenül blokkolta azt, s mint ezt később kimutatták, ezen anyag a sejtmembránon át

történő glukóz transzportot is bénította (Chen et al., 1973). Az ouabain és a dinitrofenol hatása közvetettnek bizonyult, ez előbbi, mint a Na-K membrán ATP-áz specifikus blokkolója, gátolta a ritmicitást.

Ugyanakkor figyelembe kell venni azt is, hogy e két folyamat - ATP hidrolízis és glikolízis - önmagukban is összefüggő jelenségek. Ugyanis, ha például az ATP hidrolízis csökkentett (ouabain ATP-áz gátlása révén), a glikolízis is lehetetlenné válik. Így tehát az ouabain hatása indirekt módon érvényesül a glikolízisre.

A 2,4-dinitrofenol, mely elsődlegesen és specifikusan az oxidatív foszforiláció folyamatainak szétkapcsolása révén hat, a sejtek ADP tartalmának felszaporodásához vezet az ATP reszintetizálásának hiányában. A glikolízis ekkor meg fogja emelni - más lehetőség hiányában - az ATP anaerob reszintézisének mértékét. Így tehát - attól függően, hogy melyik metabolikus folyamat függesztődik fel - ouabain, illetve DNP alkalmazásakor - az ATP reszintézis más és más úton történik a sejten belül.

Az anyagcsere gátló anyagok hatását elsősorban olyan pacemaker sejteken, illetve szöveteken vizsgálták, melyek állandó frekvenciával generálnak akciós potenciálokat (monomodális pacemaker). Az ilyen vizsgálatok eredményei, valamint azok az eredmények, melyeket a burst-szerű aktivitást mutató (bimodális pacemaker)

RPal sejten végeztünk, azt mutatták, hogy a jelenség alapvető mechanizmusa a sejt belső anyagcseréjével igen szoros kapcsolatban van, annak függvénye.

Az elvégzendő vizsgálatok talán megerősítik azt a sejtésünket, hogy a bimodális aktivitási mintázat alapját szolgáló lassu hullámzás lényegében több oszcilláló metabolikus folyamat eredménye, melyek közül az elektrogén Na-pumpa oszcilláló üzemmódban történő működése már most is bizonyítottnak tűnik.

Eddigi vizsgálataink, valamint az irodalmi adatok felhasználásával már most is vázolható egyfajta "funkcionális" modell, mely alkalmas lehet egyrészt eddigi ismereteink szintetizált összefoglalására, másrészt munkahipotézist adhat további vizsgálatainkhoz. Az akciós potenciál generálás mechanizmusát nem diszkutálva - mely lényegét tekintve nem tér el a más pacemaker szövetek esetében tapasztalt sajátosságoktól a bimodális pacemaker RPal sejtnél sem - azt mondhatjuk, hogy a mintázatot alapvetően meghatározó, endogén jellegű lassu membránpotenciál oszcilláció (lassu hullámzás) két, alapjaiban független folyamat összegződése révén jön létre. Az első komponens az erősen anyagcsere (és hőmérséklet függő), szimmetrikus (szinuszoid) oszcilláció, mely minden valószínűség szerint az elektrogén Na^+ -pumpával vagy annak speciális típusával azonosítható. A második komponens, mely az akciós potenciál sorozatok utáni

gyors hiperpolarizáció létrejöttéért felelős, a membrán K^+ -vezetőképességének gyors megváltozásában jut kifejezésre. Ez utóbbi komponens erősen Ca -függő, ellentétben az un. nyugalmi K -permeabilitással, mely a spike generálás során, illetve a burst-ök alatt akkumulálódó K ion koncentráció meghatározásában játszik szerepet. A belső K ionkoncentráció bizonyos meghatározott értékénél a membrán "átvált" arra a K -permeabilitás értékre, amely a gyors hiperpolarizáció kiváltoódását eredményezi. Ugyanakkor nem szabad figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy éppen a Na illetve a K ionok intracelluláris koncentrációja révén az oszcilláció mechanizmus szoros kapcsolatban van a kétfajta K -vezetőképességgel, illetve azok váltakozását szabályozhatja.

ÖSSZEFOGLALÁS

A spontán működő (autoaktív, pacemaker) idegsejtek egy csoportját jellegzetes, ún. burst-szerű akciós potenciálgenerálás jellemzi; a (nyugalmi) membránpotenciál lassu oszcillációjának pozitív fázisában parabolikus ütemsűrűségű akciós potenciál sorozat jelenik meg. Ezen aktivitásmintázat különböző, de elsősorban gerinctelen állatok központi idegrendszerében található, jól identifikálható óriás neuronok mikroelektrofiziológiai módszerrel történő vizsgálatakor jeleníthető meg és befolyásolható különböző módon.

A burst-szerű (vagy bimodális) aktivitásmintázat generálás mechanizmusának tanulmányozását jól segítette az ún. voltage clamp (feszültség-rögzítés) módszer, valamint a mikroiontoforézis és mikroinjekció alkalmazása. E módszerekkel az idegsejt szómájába is juttatott vegyületek által a sejtek aktivitásgenerálására - mind a lassu oszcillációra, mind pedig az akciós potenciál generálásra - kiváltott hatásokat sikerült tanulmányozni.

Vizsgáltuk a hőmérsékletváltozás, valamint különböző gátló anyagok (tetrodotoxin (TTX), tetraetilammónium-klorid (TEA-Cl), kobaltklorid (CoCl_2), ouabain, kadmiumklorid (CdCl_2) és dinitrofenol (2,4-DNP)) hatását az aktivitásgenerálásra és az azt befolyásoló membránfolyamatokra.

Kísérleti objektumként *Helix pomatia* L. központi idegrendszerének burst-szerű (bimodális) aktivitású óriás idegsejtje szolgált.

A vizsgálatok eredményeképpen született legfontosabb megállapítások:

1. Az akciós potenciálok (és a befelé irányuló ionáram) létrejöttében meghatározóak a Na^+ ionok; jelentős, moduláló, illetve ionhordozó szerepe van a Ca^{2+} ionoknak is.
Az idegsejtmembrán 2 inward (befelé irányuló) csatornával rendelkezik: az első a gyors Na^+ áthaladását biztosítja, míg a másik, kevert, lassabb ioncsatorna a Na^+ és a Ca^{2+} ionok mozgását szolgálja.
2. A lassu oszcilláció mechanizmusa és az akciós potenciálgenerálás két, egymástól függetleníthető membránfolyamat; az oszcilláció kialakulásában döntő szerepe van az erősen anyagcserefüggő elektrogén Na^+ -pumpának. (E tényt erősítik meg az outward (kifelé irányuló) K^+ csatorna blokkolásakor kapott eredmények is.)
3. A sejtmembrán anyagcserefolyamatait befolyásoló hőmérséklet változtatása az elektrogén Na^+ -pumpa és a nyugalmi potenciál közötti összefüggést, illetve kölcsönhatást segítette megvizsgálni.

4. A hőmérséklet változtatásra kapott membránválaszok hisztérisis jellege azt bizonyította, hogy az anyagcsere aktivitás nemcsak a hőmérséklet abszolút értékétől függ, de a változás irányának és sebességének is függvénye.
5. A ritmikus aktivitás elsősorban az ATP hidrolízis és glikolízis folyamatok függvénye; bármelyik blokkolása az aktivitás megszűnéséhez vezet.

A különböző hőmérséklettartományokban alkalmazott mikrotechnikák (anyagbevitel az idegsejtekben iontoforézissel és nyomással; egyidőben több mikroelektroda sejtbe vitelét megkövetelő voltage clamp technika) igen nehezen megvalósítható kísérleti szituációkat igényeltek. Ugyanakkor hozzájárultak a jellegzetes aktivitási mintázatgenerálás alapjául szolgáló membránfolyamatok (ionvándorlás és ezzel összefüggő anyagcserefolyamatok) néhány sajátosságának további tisztázásához.

A disszertáció anyaga az irodalomjegyzékben felsorolt saját, illetve társszerzőkkel készített közleményeim meghatározott részeinek felhasználásával készült. Ezuttal mondok köszönetet mindazon kollegáknak, akik segítő munkája hozzájárult e disszertáció elkészítéséhez.

Köszönetemet fejezem ki a JATE illetékeseinek és munkatársainak, hogy lehetőséget adtak a disszertáció benyújtására és tanácsaikkal munkámat segítették.

IRODALOMJEGYZÉK

Adrian, R., Slayman, C. (1966) Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle. - J. Physiol., 184, 970-1014.

Айрапетян, С.Н. (1969а) Влияние температуры на мембранный потенциал гигантских нейронов улитки. Биофизика, 14, 663-667

Айрапетян, С.Н. (1969б) Метаболически зависимая часть мембранного потенциала и электродные свойства мембраны гигантских нейронов моллюсков. Биофизика, 14, 1027-1031.

Ayrapetyan, S.N. (1969 c) Mechanism of regulation of the spontaneous activity of the giant neurones of the snail.- Biofizika 14, 866-872.

Arvanitaki, A., Chalazonitis, S.N. (1968) Electrical properties and temporal organization in oscillatory neurones. - In: Neurobiology of Invertebrates (Ed.: J. Salánki), Akadémiai Kiadó Budapest, 169-199.

Baker, P. (1965) Phosphorus metabolism of intact crab nerve and its relation to the active transport of ions. - J. Physiol., 180, 383-423.

Baker, P. (1966) The sodium pump. - Endeavour, 25, 166-172.

Barker, J.L., Carpenter, D.O. (1970) Thermosensitivity of neurons in the sensorimotor cortex of the cat. - Science, 169, 597-598.

- Carpenter, D.O. (1970) Membrane potential produced directly by the Na^+ pump in *Aplysia* neurons. - *Comp.Biochem.Physiol.*, 35, 371-385.
- Casteels, R. (1969) The distribution of chloride ions in the smooth muscle cells of guinea-pig's *Faenia coli*. - *J.Physiol.*, 214, 225-243.
- Chen, C.F. et al. (1970) Pacemaker properties of completely isolated neurons in *Aplysia calif.* - *Nature New Biol.* 233 (35), 27-29.
- Chen, C.F. et al. (1973) Metabolic aspects of the rhythogenesis in *Aplysia* pacemaker neurons. - *Pflügers Arch.*, 345, 179-193.
- Coldwell, P. et al (1960) The effects of injecting "energy rich" phosphate compounds on the active transport ions in the giant axon of *Loligo*. - *J.Physiol.*, 152, 561-590.
- Connor, J.H., Stevens, C.F. (1971) Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. - *J.Phys.*, 213, 1-19.
- Connor, J.H., Stevens, C.F. (1971) Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in Gastropod neural somata. - *J. Phys.*, 213, 21-30.
- Connor, J.H., Stevens, C.F. (1971) Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. - *J.Physiol.*, 213, 31-53.
- Dodge, F.A., Frankenhauser, (1958) Membrane currents in isolated frog nerve fibre under voltage clamp conditions. - *J.Physiol.*, 143, 76-90.

- Eckert, R., Lux, H.D. (1976) A voltage-sensitive persistent calcium conductance in neural somata of *Helix*. - J. Physiol., 254, 129-151.
- Elul, R. (1967) Fixed charge in cell membrane. - J. Physiol., 189, 351-365.
- Geduldin, D., Grüner, R. (1970) Voltage clamp of the *Aplysia* giant neurone: early sodium and calcium currents. - J. Physiol., 211, 217-244.
- Geduldin, D., Junge, D. (1968) Sodium and calcium components of action potentials in *Aplysia* giant neurone. - J. Physiol., 199, 347-365.
- Godraide, J.M., Kawamura, H., et al. (1971) Actions of dinitrophenol and some other metabolic inhibitors on cortical neurons. - J. Physiol., 210, 897-917.
- Goldman, D.E. (1943) Potential impedance and rectification in membranes. - J. gen. Physiol., 27:37.
- Gorman, A.L.F., Marmor, M.F. (1970) Temperature dependence of the sodium potassium permeability ratio of a molluscan neurone. - J. Physiol., 210, 919-931.
- Heyer, C.B., Lux, H.D. (1976 a) Control of the delayed outward potassium currents in bursting pacemaker neurones of the snail, *Helix pomatia*. - J. Physiol., 262, 349-382.
- Heyer, C.B., Lux, H.D. (1979 b) Properties of a facilitating calcium current in pacemaker neurones of the snail, *Helix pomatia*. - J. Physiol., 262, 319-348.

- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to the conduction and excitation in nerve. - J. Physiol., 117, 500-549.
- Hodgkin, A.L. (1958) Ionic movements and electric activity in giant nerve fibers.- Proc.Poy.Soc., 148, 1-37.
- Isenberg, G., Trautwein, W. (1974) The effect of dihydro-Ouabain and lithium ions on the outward current in cardiac Purkinje fibers. - Pflügers Arch., 350, 41-54.
- Junge, D., Stephens, C.L. (1973) Cyclic variation of potassium conductance in a burst-generating neurone in Aplysia. - J. Physiol., 235, 155-181.
- Kerkut, G.A., Thomas, R.C. (1965) An electrogenic sodium pump in snail nerve cell. - Comp.Biochem.Physiol., 14, 167-183.
- Kernan, R.P. (1962) Membrane potential changes during sodium transport in frog sartorius muscle. - Nature, 193, 986-987.
- Lux, H.D., Eckert, R., et al. (1976) Intracellular Ca^{2+} depresses net late outward current in snail neurones. - Biophys.J., 16, 23a.
- Mathieu, P.A. et al. (1971) Characteristics of pacemaker oscillations in Aplysia neurons. - Can.J.Physiol.Pharmacol., 49, 787-795.
- Meech, R.W. (1974) The sensitivity of Helix aspersa neurones to injected calcium ions. - J. Physiol., 237, 259-277.
- Morita, K., Koketsu, K. and Kuba K. (1980) Oscillation of Ca^{2+}_i -linked K^+ conductance in bullfrog sympathetic ganglion cell is sensitive to intracellular anions. - Nature, 283, 204-205.

- Mullins, L., Awad, M. (1965) The control of the membrane potential of muscle fibers by the sodium pump. - J. Gen. Phys., 48. No.5, 761-775.
- Nakajima, S., Takahashi, K. (1966) Post-tetanic hyperpolarization and electrogenic Na^+ -pump in stretch receptor neurone of crayfish. - J. Physiol., 197, 105-127.
- Neher, E. (1971) Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurones. - J.gen.Physiol., 58, 36-53.
- Noble, D., Tsien, R.W. (1969a) Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibers. - J. Physiol., 200, 205-231.
- Noble, D., Tsien, R.W. (1969b) Reconstruction of the repolarization process in cardiac Purkinje fibers based on voltage clamp measurement of membrane current. - J.Physiol., 200, 233-254.
- Sakharov, D.A., Salánki, J. (1969) Physiological and pharmacological identification of neurons in the CNS of *Helix pomatia* L. - Acta Physiol.Acad.Sci.Hung., 35, 19-30.
- Strumwasser, F., Kim, M., (1969) Experimental studies of a neuron with an endogenous oscillator and a quantitative model of its mechanism. - The Physiologist, 12, 367.
- Thomas, R.C. (1968) Measurement of current produced by the sodium pump in a snail neurone. - J.Physiol., 195, 238.
- Thomas, R.C. (1969) Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. - J.Physiol., 201, 496-514.

- Thomas, R. (1972) Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. - *Physiol. Rev.*, 52, 563-594.
- Véró, M. (1971) Negative capacitance amplifier for microelectrode investigations. - *Annal.Biol. Tihany*, 38, 107-115.
- Véró, M. (1974a) Temperature control network for the investigation of nerve cells. - *Annls.Inst.biol.Tihany*, 41, 119-126.
- Véró, M. (1974b) Voltage clamp measurement set-up for investigation of membrane parameters. - *Annal.Biol.Tihany*, 41, 111-117.
- Wachtel, H., Wilson, W.H. (1973) Voltage clamp analysis of rhythmic slow wave generation in bursting neurons. In *Neurobiology of Invertebrates. Mechanisms of rhythm regulation* (Edited by Salánki J.) Akadémiai Kiadó, Budapest, pp.59-80.

A disszertáció alapjául szolgáló saját, illetve társszerzők publikációk jegyzéke

- Salánki J., I. Vadász and K. Elekes: Physiological and morphological characteristics of Br-type neuron in the central nervous system of the snail *Helix pomatia* L. - *Acta physiol. Acad.Sci.Hung.* 42: 243-254 (1972)
- Salánki J. and I. Vadász: Chemical sensitivity at different temperatures of the Br-type bimodal pacemaker neurone in the CNS of the snail *Helix pomatia* L. - *Acta physiol. Acad.*

Sci.Hung. 44: 51-59 (1973)

Kiss I. and I. Vadász: The effect of local anaesthetics on the activity generation and chemical sensitivity of giant neurones. - Annal.Biol.Tihany, 40: 73-84 (1973)

Salánki J., I. Vadász and M. Véró: Temperature dependence of the activity pattern in the Br-type cell of the snail *Helix pomatia* L. - Acta physiol. Acad.Sci.Hung. 43: 115-124 (1973)

Vadász I. and M. Véró: Effect of temperature transition on the activity parameters of Br-type neurone of *Helix pomatia* L.- Annal.Biol.Tihany, 41: 81-89 (1974)

Vadász I. and M. Véró: Ion current temperature dependence of Br-type neuron of *Helix pomatia* L. - Annal.Biol.Tihany, 42: 129-137 (1975)

Salánki J., Vadász I. és Véró M.: *Helix pomatia* L. Br-típusu sejtje aktivitásmintázatának hőmérsékletfüggése. -Biológia 22, 145-159 (1975)

Magura I.S., E.V. Dolgaya, I. Vadász: Effect of calcium ions on the outward currents in the soma of molluscan neurons. - Heirofiziológia, Vol.8. No.4., 400-409 (1976)

Vadász I. and J. Salánki: Mechanisms of spike and burst generation in the bimodal pacemaker RPal neuron of *Helix pomatia* L. In: Neurobiology of Invertebrates. Gastropoda brain. 371-380 (1976)

Kiss I. and I. Vadász: A comparative study of the ion currents of giant neurones identified in the central nervous system

- of *Lymnaea stagnalis*. - *Comp.Biochem.Physiol.* Vol.56.A.
433-437 (1977)
- Vadász I., Dy. Konjevic and Ly.Rakic: Some characteristics of
the slow wave oscillatory mechanism in neurone RI5 (*Aplysia
depilans*). - *Jugoslav.Physiol. Pharmacol. acta.* Vol. 13. No.
3. 301-307 (1977)
- Salánki J., Katalin S.-Rózsa and I. Vadász: Synaptic and metabolic
modulation of the bimodal pacemaker activity in the RPa1
neuron of *Helix pomatia* L. - *Comp.Biochem.Physiol.* Vol. 64A.
265-271 (1979)
- Elekes K. and I. Vadász: Ultrastructure of the bimodal pacemaker
neuron in the central nervous system of *Helix pomatia* L. -
Acta biol.Acad.Sci.Hung. 30(4), 317-334 (1979)
- Stefano G.B., I. Vadász and L. Hiripi: NaPoxane selectively
blocks dopamine response of Br-type neurone in *Helix pomatia*
L. - *Experientia* 35. Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz (1979)
- Kiss I. and I. Vadász: Effect of transmitter substances on
identified snail neurones. - *Neurotransmitters.* 265-296.
Akadémiai Kiadó, Budapest (1980)
- Vadász I. and J. Salánki: Modification of activity and ionic
current by intracellular injection of 2,4-DNP and CdCl_2 in
the bursting neuron of *Helix pomatia* L. - *Comp. Biochem. and
Physiol.* Vol. 71A, 47-52 (1982)