

Doktori értekezés

A CIKLUSOS NUKLEOTIDA- Ca^{++} RENDSZER SZEREPE
EUKARIOTÁK KATIONTRANSPORTJÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Irta:

Rimanóczy Ágnes

Szegedi Orvostudományi Egyetem
Ideg- és Elmeegógyászati Klinika

Szeged, 1981.



Köszönetet mondok DR. SZILÁRD JÁNOS egyetemi tanárnak, a Szegedi Orvostudományi Egyetem Ideg- és Elmeegógyászati Klinika intézetvezető professzorának, hogy a munka elvégzését lehetővé tette.

A kísérleteket az Egészségügyi Minisztérium által tárcaszinten támogatott 4-12-0306-01-O/L számú téma keretében végeztem.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
A. BEVEZETÉS.....	1
A.1. Kation gradiensek az intakt sejt és környezete között.....	1
A.2. A kationtranszport szabályozása. "Pumpa" mechanizmusok.....	5
A.3. Koncentráció gradiens irányában le- játszódó kation transzport. A Ca^{++} szerepe.....	9
A.4. A Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer....	13
A.5. A glia kation transzport sajátosságai..	18
B. AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITÜZÉSE.....	21
C. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK.....	23
a.MÓDSZEREK.....	23
C.1. Glia sejtttenyészetek készítése.....	23
C.2. A glia transzport vizsgálata.....	24
C.3. A cAMP anyagcsere vizsgálata.....	27
C.4. ATPáz aktivitás vizsgálatok.....	28
b.ANYAGOK.....	32
D. EREDMÉNYEK.....	32
D.1. A Na^{+}, K^{+} -ATPáz aktivitása és a K^{+} transzport sebessége közötti össze- függés glia sejtttenyészetekben.....	32
D.2. Az extracelluláris Ca^{++} szerepe a K^{+} transzport sebességének kontrol- lálásában.....	40
D.3. Az extracelluláris Ca^{++} változás ha- tása az intracelluláris Ca^{++} -ciklu- sos nukleotida rendszerre.....	49
E. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	56
IRODALOMJEGYZÉK.....	62

A. BEVEZETÉS

A.1. Kation gradiensek az intakt sejt és környezete között

Minden élő, intakt sejt jellemzője - az egyszerű, sejt-maggal és subcelluláris szerkezettel nem rendelkező emlős vörösvértest és a nagymértékben bonyolult szerkezetű neuron esetében egyaránt-, hogy környezetével szemben egyenlőtlen ion-eloszlást tart fenn. Ennek kialakításában elsődleges szerepet kell tulajdonítanunk az anorganikus kationoknak; az egyenlőtlen anion eloszlás a kation gradiensek függvénye, ill. a Donnan egyensúly által meghatározott. Organikus, ionos és nem ionos molekulák megoszlásában a sejt és környezete között, azok transzportjában a sejtmembránon keresztül ugyancsak meghatározó szerepet játszik az anorganikus kationok gradiense /Glynn és Karlisch 1975; Sarkadi és Tosteson 1979; Lew és Beaugé 1979; Mullins 1979/.

Erre utal, hogy a sejtmembrán az anorganikus anionok számára a legtöbb sejt esetén "permeábilis": az anion koncentráció változása a membrán egyik oldalán többnyire maga után vonja a koncentráció változását az ellentétes oldalon is mindaddig, amíg a Donnan egyensulynak megfelelő koncentrációk kialakulnak. Az anion mozgása a membránon át a koncentráció gradiens irányában történik /Gunn, 1979/.

Ezzel szemben az anorganikus kationok /a továbbiakban egyszerűen kationok/ esetén az extracelluláris koncentráció változása nem vezet feltétlenül az intracelluláris koncentráció vál-

tozásához. /Ezért az izotóp technika elterjedése előtt általános volt az a felfogás, hogy a sejtmembrán kationokra "nem permeábilis". /Másként fogalmazva azt mondhatjuk, hogy a kation koncentrációk az élő sejtben széles határok között függetlenek azok koncentráció gradienseitől. Ugyanakkor, az izotóp technika alkalmazása bizonyította, hogy a kationok is mozognak a sejtmembránon át a koncentráció gradiensek irányában. Ez a két tény vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy az élő sejtben működik olyan "ion-pumpa" mechanizmus, mely energia felhasználásával kompenzálja a koncentráció gradiens irányában történő kationmozgást és ilyen módon a kationokat a gradienssel szemben mozgatva gondoskodik az egyenlőtlen kation koncentrációk, tehát a gradiens fenntartásáról /Rosenberg, 1948; Ussing 1949; Koefoed-Johnsen és Ussing 1960/.

Az egyenlőtlen kation megoszlás jellemző a magvatlan, szerkezet nélküli emlős vörösvértestekre is, noha nagy faji eltérések észlelhetők /Wiley 1977/. A kutya, macska és egyes kérődzők vörösvérsejtjeiben például a K^+/Na^+ koncentrációk hányadosa egynél kisebb, míg a legtöbb emlős vörösvértestben /ilyen az emberi vörösvértest is/ a K^+ koncentráció sokszorosan magasabb a Na^+ koncentrációnál /Ellory 1977; Parker 1977/. A sejten belül a két kation arányának megfelelő a környezettel szemben kialakuló kation gradiens: alacsony K^+/Na^+ arány esetén nem nagy az eltérés a külső és belső K^+ ill. Na^+ koncentrációk között.

Mai ismereteink szerint minden eukariotára - a sejt típusától, funkciójától és a faji jellegzetességektől füg-

getlenül - jellemző a sejten belüli magas K^+/Na^+ arány /Koe-foed-Johnsen és Ussing 1960/. Eukarioták esetén azonban a sejt belső szerkezete eredményeként a kation pool eloszlása a sejten belül nem feltétlenül homogén /Ling 1977; Oschman 1978; Ussing és Leaf 1978/. Számos adat utal arra, hogy a K^+ -ra vonatkozóan mindenképpen számolni kell ilyen intracelluláris kompartmentációval, mely fontos szerepet játszhat a kation gradiensek szabályozásában oly módon, hogy befolyásolja a sejtmembrán belső környezetében a K^+ koncentrációját /Latzkovits és mtsi 1974; Kukes és mtsi 1976/.

A K^+ és Na^+ megoszlásához hasonló koncentráció gradiensek jellemzők a Mg^{++} és Ca^{++} eloszlására a sejt és környezete között /Sulakhe és St.Louis 1980/. A különböző sejtek Mg^{++} tartalma és a sejt-viztér ismeretében számított Mg^{++} koncentrációk sokszorosán meghaladják a fiziológiás extracelluláris terekben mérhető Mg^{++} koncentrációt. A Mg^{++} nagy része azonban nem ionos állapotban, hanem különféle, rosszul disszociáló komplexek formájában található a sejtben /az emlős vörösvértestben pl. nagyrészt Mg^{++} -hemoglobin komplexként/ /Sarkadi és Tosteson 1979/. Ezért a Mg^{++} gradiensekről ismereteink mai szintjén keveset mondhatunk, azonban feltételezhető modell kísérletek alapján, hogy a Mg^{++} szerepet játszik a Ca^{++} gradiensek szabályozásában /Mullins 1979; Sulakhe és St.Louis 1980/.

Lényegesen többet tudunk a Ca^{++} megoszlásáról a sejt és környezete között /Scarpa és Carafoli 1978; Sulakhe és St.Louis 1980/. Ennek mindenek előtt metodikai magyarázata van: egy-

részt a Ca^{++} -nak van biológiai kísérletben egyszerűen használható, jól mérhető radioaktív izotópja, másrészt adott annak a lehetősége, hogy az intracelluláris szabad Ca^{++} szintet intakt sejtben közvetlenül mérjük / Ca^{++} szelektív mikro-elektrodok, equorin lumineszcencia mérése/. A Ca^{++} tartalom tekintetében az egyes sejtek nagy eltéréseket mutatnak. Az emlős vörösvértestek Ca^{++} -ot igen kis mennyiségben tartalmazznak, azt is kötött formában, a membránban. A sejtplazma szabad Ca^{++} koncentrációja kisebb, mint 10^{-7} M /Scarpa és Carafoli 1978; Sarkadi és Tosteson 1979; Lew és Beaugé 1979; Sulakhe és St.Louis 1980/. Eukarioták Ca^{++} tartalma /összfehérjére vagy öszszviztartalomra vonatkoztatva/ magas. A koncentráció gradiens megítélése szempontjából azonban a Ca^{++} esetében is figyelembe kell venni a Ca^{++} kompartmentációját: a Ca^{++} nagy része a mitochondriumokban, endoplazmatikus retikulumban /izom esetén szarkoplazmatikus retikulum/ kötött formában raktározódik. A citoplazma szabad Ca^{++} koncentrációja alacsony, a ma rendelkezésre álló, közvetlenül mért adatok alapján ez az érték eukariotákban is kisebb mint 10^{-7} M. Ez az érték az extracelluláris tér 10^{-3} M nagyságrendű koncentrációjával szemben jelentős iongradienst képvisel /Scarpa és Carafoli 1978; Sulakhe és St.Louis 1980/.

Az iongradiensek változása a magvatlan emlős vörösvértestek esetén is alapvetően fontos az élettani funkciók szempontjából /Sarkadi és Tosteson 1979; Lew és Beaugé 1979/. Ez a megállapítás különösképpen érvényes eukariotákra vonatkozóan. A sejt élettani működését, pl. az izom és idegsejt esetén,

a kation gradiensek igen rövid idő alatt /milliszekundumos dimenzióban/ lejátszódó változása kíséri. Abban az esetben is, ha a kation koncentráció nem változik a sejtfunkcióval párhuzamosan, feltehető a kation turnover, a környezet és a sejt közötti kation csere sebességének változása /Mullins 1979; Inesi 1979/. A vesehámsejtek szekretoros funkciójának változása pl. nem jár az intracelluláris Na^+ és K^+ koncentráció változásával, azonban kimutatható a sejten keresztül lejátszódó anion fluxus sebességének növekedése vagy csökkenése /Strewler és Orloff 1977/.

Mai ismereteink szerint a kationgradiensek fenntartásáért felelős, ill. a változásokat meghatározó szabályozó mechanizmusok alapvető fontosságuk a sejt fiziológias működése szempontjából.

A.2. A kationtranszport szabályozása. "Pumpa" mechanizmusok

A kationgradiensek által képviselt elektrokémiai potenciál az ionkoncentrációk kiegyenlítése irányában ható ionmozgásokat hoz létre. Az élő sejt által fenntartott energiaigényes transzport mechanizmusok gondoskodnak a kation gradiensek fenntartásáról és a változások szabályozásáról. Ezeket a transzport mechanizmusokat az élettani, biokémiai irodalom "pumpa" mechanizmusoknak nevezi. Működésük a sejtmembránban elhelyezkedő enzimek működésén alapszik. Mai ismereteink szerint két enzim működése játszik közvetlen szerepet a kation transzport fenntartásában: a Na^+, K^+ -ATPáz /E.C. 3.6.1.3./ és a $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ -ATPáz /Scarpa és Carafoli 1978; Sarkadi és



Tosteson 1979; Lew és Beaugé 1979; Sulakhe és St.Louis 1980/.

Igen részletes ismeretekkel rendelkezünk a Na^+, K^+ -ATP-
-áz működésére vonatkozóan. Az enzim jellegzetessége funkci-
ójának vektoriális jellege /Glynn és Karlsh 1975; Sarkadi
és Tosteson 1979/. Kötőhelyének kell tekintenünk a sejtmemb-
rán külső ill. belső oldalán elhelyezkedő K^+ ill. Na^+ re-
ceptorokat /Wallick és mtsi 1979/. Az enzimfunkció vektoriá-
lis jellegét az adja, hogy mind a Na^+ mind a K^+ aktivátora
vagy inhibitora az enzimnek, attól függően, hogy a kation a
membrán külső vagy belső oldalán helyezkedik-e el. Az intra-
celluláris oldalon a Na^+ koncentráció növekedése az enzim
működését aktiválja, a K^+ koncentráció növekedése gátolja.
Az extracelluláris térben azonos kation koncentráció válto-
zások fordított hatást eredményeznek /Glynn és Karlsh 1975;
Sarkadi és Tosteson 1979; Wallick és mtsi 1979/. Az enzim
transzportfunkciója: koncentráció gradienssel szemben Na^+ -ot
"pumpál" ki a sejtbe, ill. K^+ -ot "pumpál" be a sejtbe, köz-
vetlenül használja az ATP kémiai energiáját; az enzim, mű-
ködése során, ATP-t hasít ADP-re, ill. anorganikus foszfátra.
Részletesen tanulmányozott az iontranszport funkció és az
ATP bontás egyes részleteinek kapcsolata /Fahn 1966; Post
1969; Skou 1971; Jørgensen 1971/. Jelenlegi ismereteink le-
hetővé teszik az enzimfunkció és ionmozgások közti kapcsolat
molekuláris szintű értelmezését.

Értekezésem tárgya szempontjából a Na^+, K^+ -ATPáz mű-
ködésének vektoriális jellegét szeretném kiemelni /Glynn
és Karlsh 1975; Wallick és mtsi 1979/. Ez teszi ugyanis

lehetővé, hogy az enzimműködés szabályozása kapcsolódjon egyéb transzport szabályozási mechanizmusokhoz. Amennyiben ugyanis az ionkoncentrációk a sejtben megváltoznak, vagy változik az extracelluláris tér ionkoncentrációja, az a vektoriális jellegnek megfelelően közvetlenül hat a pumpa mechanizmusra. Például, olyan esetben, amikor a sejt "permeabilitása" átmenetileg megváltozik és következésképpen a sejt K^+ -ot veszít és Na^+ -ot vesz fel, a Na^+, K^+ -ATPáz aktiválódik. Ez a folyamat játszódik le a neuron ingerületi folyamata során /Mullins 1979/.

Felmerül az a kérdés, hogy a K^+ , Na^+ transzport szabályozásában a Na^+, K^+ -ATPáz által fenntartott pumpa mechanizmus játszik-e kizárólagos szerepet, vagy jelentőséget kell tulajdonítanunk a koncentráció gradiens irányában történő ionmozgásokat meghatározó folyamatoknak. Hosszu időn keresztül úgy tűnt, hogy a Na^+, K^+ -ATPáz szerepe meghatározó. Alig több mint egy évtizede terelődött a figyelem azokra a mechanizmusokra, melyek a sejtmembrán "permeabilitását", tehát a koncentráció gradiens irányába történő ionmozgásokat szabályozzák. Ezek, a korábban passzív transzportnak nevezett ionmozgások, éppen a Na^+, K^+ -ATPáz vektoriális működése következtében lehetnek meghatározó jelentőségűek /Lew és Beaugé 1979/.

A Ca^{++} -ATPáz működésére vonatkozó ismereteink alapján a két enzim között a molekuláris mechanizmust illetően sok az analógia /Scarpa és Carafoli 1978/. Az enzim működésének ugyancsak van vektoriális jellege. A sejtmembrán belső olda-

lán, a citoplazmában a Ca^{++} aktiválja az enzimet. Az extracelluláris Ca^{++} , úgy látszik, az enzim működését lényegesen kevésbé befolyásolja. Nem pontosan tisztázott az enzim működéséhez szükséges intracelluláris Mg^{++} szerepe. Ugy látszik, a Ca^{++} pumpa szerepe a citoplazmában esetlegesen megnövekvő Ca^{++} koncentráció gyors csökkentése.

Eltérően a Na^+, K^+ -ATPáztól, amely két kation, a Na^+ és K^+ szimultán mozgását összehangolja, a Ca^{++} -ATPáz egyetlen feladatának a sejtbe bejutó Ca^{++} gyors eliminációját kell tekintenünk. Hangsúlyozni kell azt is, hogy amíg az intracelluláris K^+ és Na^+ koncentráció kialakításában a Na^+, K^+ -ATPáznak meghatározó szerepe van, addig a citoplazmatikus Ca^{++} koncentráció kialakításáért nemcsak a membrán Ca^{++} -pumpa mechanizmusa felelős, hanem abban szerepet játszik a szubcelluláris partikulák /mitochondrium, endoplazmatikus retikulum/ membránjához lokalizált Ca^{++} -pumpa is /Sulakhe és St.Louis 1980/. Vannak ugyan adatok az intracelluláris Na^+ és K^+ pool kompartmentalizációjára is, ezideig kevés ismerettel rendelkezünk az intracelluláris partikulumok membránján keresztül lejátszódó Na^+, K^+ transzportról /Latzkovits és mtsi 1974; Kukes és mtsi 1976; Ling 1977/.

Azt kell tehát mondanunk, hogy a citoplazma és a környezete között fennálló kation gradiens fenntartásáért a Na^+ és K^+ esetén elsősorban a sejtmembrán Na^+, K^+ -ATPáza tehető felelőssé, míg a Ca^{++} gradiens fenntartásában fontos szerepet játszik a sejtmembrán ATPáza mellett a szubcelluláris Ca^{++} -transzportáló, ill. Ca^{++} -raktározó apparátus.

A.3. Koncentráció gradiens irányában lejátszódó kation transzport. A Ca^{++} szerepe.

Hosszu időn keresztül úgy tűnt, hogy az elektrokémiai potenciál gradiens által meghatározott kation mozgások elsősorban az extracelluláris tér fizikai, kémiai paraméterei által meghatározottak és a sejtmembrán szerkezetének, a sejthez kötött szabályozási folyamatoknak nincs meghatározó szerepe. Az elmúlt évtizedben végzett kiterjedt kutatómunka eredményeként ezek az ún. passzív kation mozgások az érdeklődés előterébe kerültek /Lew és Beaugé 1979/. Kétségtelen, hogy az elektrokémiai potenciálgradiens irányában lejátszódik egy "leak" kation transzport is, mely csak fizikai-kémiai paraméterek függvénye /koncentráció különbség a külső és belső tér között, pH/. Ez a leak transzport azonban a koncentráció gradiens irányában lejátszódó kationmozgások kis százalékát jelenti. Kiderült ugyanakkor, hogy az ilyen transzport folyamatoknak is van specifikus inhibitora. A folyamat kinetikája is merőben eltér az egyszerű passzív diffúzió kinetikájától. Azt kell tehát mondanunk, hogy a gradiens irányában történő kation mozgás membránhoz kötött összetett szabályozás hatása alatt áll /Lew és Beaugé 1979/.

Ismereteseek olyan potenciál gradiens irányában lejátszódó kation mozgások, melyek összekapcsoltak gradienssel szembeni kation transzporttal, anélkül, hogy abban pumpa mechanizmus közvetlen szerepet játszana. Ezek a "counter" transzport folyamatok lehetővé teszik, hogy a kation gradiens által fenntartott elektromos potenciál gradiens energiája közvetlenül, a pumpa mechanizmus részvétele nélkül felhasználható le-

gyen egy ionpartner kation gradienssel szemben történő mozgásához /Schultz és Curran 1970; Crane 1977; Lew és Beaugé 1979; Gunn 1980/. Ebben a tekintetben különös jelentőséget kell tulajdonítanunk a sejtbe irányuló Na^+ transzportnak. Például a $\text{Na}^+ \text{--} \text{Ca}^{++}$ counter transzportja szerepet játszik a Ca^{++} kifolyás fenntartásában /Reuter és Seitz 1968; Baker 1970/. Ilyen módon a sejtbe belépő Na^+ helyett Ca^{++} távozik a sejtből. Ezen folyamatok energiáját végülis az ATP szolgáltatja, hiszen a Na^+ -gradiens fenntartása érdekében a sejtbe belépő Na ion eltávolítását már a pumpa mechanizmus végzi, az ATP energiájának rovására. Szabályozásában azonban a pumpa mechanizmus csak másodlagos szerepet játszik. A gradiens irányában a sejtbe belépő Na^+ kationnal együtt beléphetnek egyéb ionok is /kotranszport/. Ilyen esetben is az elektromos potenciál szolgáltatja a közvetlen hajtóerőt. Számos aminosav felvétele történik ilyen módon /Scarpa és Carafoli 1978; Sulakhe és St.Louis 1980/.

A 70-es évek közepétől nagyszámu adat látott napvilágot, melyek szerint a gradiens irányu kation transzport szabályozásában jelentős szerepet kell tulajdonítanunk a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszernek /Berridge 1975; Rasmussen és Goodman 1977; Strewler és Orloff 1977/. Az első jelenséget, amely a Ca^{++} szerepét bizonyítja a K^+ transzport szabályozásában, Gárdos írta le 1954-ben /Gárdos 1954, 1958/. Megfigyelte, hogy emberi vörösvértesteken a citoplazmatikus szabad Ca^{++} koncentráció növekedése szelektív K^+ kiáramlást eredményez. A koncentráció gradiens irányában történő K^+

mozgás nem jár együtt Na^+ beáramlással. Eredeti kísérleteiben a Ca^{++} koncentráció növekedését úgy érte el, hogy különböző behatásokkal csökkentette a vörösvértestek ATP koncentrációját. Miután a K^+ kiáramlást a médiumhoz adott Ca^{++} kelátorok felfüggesztették, bizonyítható volt, hogy a belső Ca^{++} koncentráció növekedését a Ca^{++} pumpa ATP hiányában bekövetkező csökkent működése hozza létre. A jelenség a 70-es években került az érdeklődés középpontjába, és azóta, a Gárdos munkacsoport mellett, számos kutató tanulmányozta /Ferreira és Lew 1977/. Bizonyítható volt, hogy a Na^+, K^+ -pumpa gátlása önmagában csupán kismértékű K^+ kiáramlást eredményez vörösvértest esetén, tehát a K^+ leak transzportja, amely mindig Na^+ beáramlással jár együtt, elhanyagolható ahhoz a K^+ kiáramláshoz képest, mely az intracelluláris Ca^{++} koncentráció növekedés hatására szelektív módon lejátszódik. A jelenség, amelyet néhány év óta a nemzetközi szakirodalom Gárdos effektus néven említ, újabban felkeltette a neurofiziológusok érdeklődését /Meech 1976/, miután kiderült, hogy a Gárdos effektus neuronokon is létrejön. Újabb indirekt adatok szerint feltételezhető limfociták esetében is /Kaplan 1978; Freedman 1979/. Ugy látszik tehát, hogy a Ca^{++} pumpa oly módon, hogy szabályozza membrán belső oldalán a Ca^{++} koncentrációját, komoly szerepet játszik a K^+ transzport szabályozásában a Na^+, K^+ -ATPáz pumpa mechanizmustól többé-kevésbé függetlenül. Fontos megfigyelés volt, hogy eukarióták esetén /neuron, limfocita/ a Gárdos effektus nemcsak szelektíven K^+ kiáramlást eredményez, hanem ugyanakkor meg-

növekedett Na^+ felvételt is /Kaplan 1978/. Ez lehetőséget ad arra, - bár erre vonatkozóan ezideig nincs adat -, hogy eukariotákban feltételezzük a Gárdos effektus és a Na^+ , K^+ -pumpa kooperációját, noha ez vörösvértesteken nem volt igazolható. Egyes szerzők nem tartják kizártnak, hogy a Gárdos effektus szerepet játszhat a neuron kisülését követő ionkoncentráció változásokban /Meech 1976/.

Az intracelluláris Ca^{++} koncentráció szabályozásában számos tényező játszik szerepet. A sejteket érő aktivációs hatások /hormonális aktiválás, immunológiai aktiválás, ingerületi folyamatok/ következményeként valamilyen módon megnő a citoplazmatikus Ca^{++} koncentráció. A citoplazmában megjelenő Ca^{++} lehetséges forrásai vagy az extracelluláris Ca^{++} /mint Gárdos eredeti kísérleteiben vörösvértest esetén/, vagy valamilyen intracelluláris rezervoár /eukarióták esetén/, vagy együttesen mindkettő /Rasmussen 1970; Berridge 1975; Rapp és Berridge 1977; Strewler és Orloff 1977; Whitfield és mtsi 1979; Freedman 1979/.

Az intracelluláris Ca^{++} szint szabályozásában szerepet játszik a ciklusos nukleotida rendszer. Számos adat van azonban arra vonatkozóan is, hogy a sejtben az adenozin 3':5' ciklusos monofoszfát /cAMP/ szint változásokat a Na^+ és K^+ gradiens irányu transzportjának jelentős mértékű változása kíséri. A cAMP szint változások ilyen hatását részletesen tanulmányozták magvas /pulyka, béka/ vörösvértesteken. Ugy látszik, hogy ezek a hatások függetlenek a Na^+ , K^+ -ATPázhoz kötött pumpa mechanizmustól /Kregenow 1977/.

A.4. A Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer

Az utóbbi évtizedben világossá vált, hogy a sejtmembrán specifikus receptorait aktiváló "elsődleges hirvivők" /pl. hormonok, neurotranszmitterek/ nem közvetlenül, hanem a "másodlagos hirvivő" rendszer összehangolt működése útján módosítják a sejt funkcióit /Jenkinson és mtsi 1978; Whitfield és mtsi 1979; Freedman 1979/. Már a 60-as évek végén nagyszámu adat utalt arra, hogy a Ca^{++} , a ciklusos nukleotidokhoz hasonlóan, másodlagos hirvivő funkcióval rendelkezik /Rasmussen 1970/. Mégis, összefoglaló néven " Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszerről" az irodalom csak néhány éve ír, mióta bizonyítást nyert, hogy a Ca^{++} és a ciklusos nukleotidok szerepe külön-külön nem értelmezhető /Rasmussen 1970; Berridge 1975; Rapp és Berridge 1977; Strewler és Orloff 1977; Whitfield és mtsi 1979; Freedman 1979/.

A Ca^{++} és a ciklusos nukleotidok kölcsönhatásainak ki-merítő taglalása meghaladja értekezésem kereteit. Értekezésem szempontjából a másodlagos hirvivő rendszer néhány alapvető tulajdonságára szeretnék utalni, melyek figyelembe vétele szükséges eredményeim értelmezéséhez.

Noha a ciklusos nukleotidok és a Ca^{++} másodlagos hirvivő szerepe nagymértékben hasonló a különböző sejtekben, mégis a kontroll mechanizmusok jelentős különbségeket mutatnak. Ilyen szempontból a különféle sejttípusokat, mint "biológiai rendszereket" két nagy csoportra oszthatjuk /Berridge 1975/.

1./ Egyirányu rendszerek /pl. idegszövet, mellékvese velő-, ill. kéregállomány, hasnyálmirigy endokrin funkciót ellátó sejtjei...stb./

2./ Kétirányu rendszerek /pl. simaizom, szívizom, vérlemezkék, hízósejtek...stb./

Az első csoportba tartozó szövetek esetén a sejtek alapvető funkcióit meghatározó ingerek /az elsődleges hirtívő által létrehozott aktiváció/ egy adott időpontban egyirányu, egyértelmű hatást eredményeznek. Jellegzetes a másodlagos hirtívő rendszer "információ közvetítő funkciója"; első lépésben a sejt Ca^{++} -ot vesz fel a környezetből - ez a Ca^{++} iniciálja a további regulációs fokozatokat. Az elsődleges hirtívő közvetlen, meghatározó szerepet játszó partnere tehát a Ca kation. További jellegzetessége az "egyirányu rendszereknek", hogy a cAMP és a guanozin 3':5' ciklusos monofoszfát /cGMP/ együttműködik: az azonos hatást eredményező koncentráció változások előjele megegyezik. Ugyancsak azonos irányu, jellegű sejtfunkció változást eredményez a cAMP és Ca^{++} szintek azonos irányu változása. Ugy is fogalmazhatunk, hogy a cAMP szerepe az ilyen rendszerekben a " Ca^{++} jel erősítése", míg a cGMP a "cAMP jelet erősíti".

A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján valószínű, hogy az élő szervezetek sajátos, speciális funkciót ellátó sejtjei működnek ilyen "egyirányu rendszerként". Ezzel kapcsolatosan fontos hangsúlyozni, hogy az irodalom az "idegszövetet" általában "egyirányu rendszerként" említi. Ez a

megállapítás a neuron funkcióra vonatkozóan nagy valószínűséggel elfogadható. Valóban úgy látszik, hogy egy adott neuron, az aktiváló vagy gátló neurontranszmitter jelenlététől függően, meghatározott időpontban egyértelmű, egyirányú hatás alatt áll. /Eltérően pl. a simaizom sejttől, melyen egyidejűleg mindig két ellentétes hatás érvényesül./ A másodlagos hirtívő rendszer szerepe ennek az egyértelmű jelnek az egyirányú erősítése - bármiféle moduláció nélkül. Az "idegszövet" azonban nem csak neuronokból áll: a következő fejezetben vázolom a glia szerepét az idegszövet alapvető funkcióinak szabályozásában. Jelenleg nincs megbízható adat arra vonatkozóan, hogy a glia is "egyirányú rendszernek" tekinthető-e.

"Kétirányú rendszernek" tekintjük a másodlagos hirtívő rendszer szabályozása szempontjából az olyan sejteket, melyeken bármely időpontban egyidejűleg két ellentétes irányú aktiváció érvényesül. A simaizom esetén pl. szimpatikus és paraszimpatikus hatás mindig együttesen jelentkezik - természetesen adott időpontban az élettani funkció valamelyik paraméter túlsúlyát mutathatja. A sejtszintű regulációban azonban ilyenkor is kimutatható az ellentétes irányú aktiváció jelenléte. Az egyik elsődleges aktiváció másodlagos hirtívője ilyen rendszerek esetén rendszerint a Ca^{++} , a másiké a cAMP. A cAMP szerepe ebben az esetben az, hogy növelje a " Ca^{++} jelet" semlegesítő folyamatok sebességét. A cGMP szerepe ugyanakkor a "cAMP jel" hatásának csökkentése - rendszerint olyan módon, hogy növeli a citoplazmatikus



szabad Ca^{++} koncentrációt. A Ca^{++} , cAMP, ill. cGMP között fennálló feed back kapcsolatok az ilyen kétirányú rendszerekben az alapvető sejtfunkciók szabályozásának sajátos, dualisztikus jelleget kölcsönöznek. Ezt fogalmazza meg a "Jin-Jang hipotézis": a másodlagos hirtvivő Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszerre épülő sejtszintű szabályozás két ellentétes irányu hatást eredményez, amelyek egymást kiegészítik, feltételezik. Ezek egyensúlyára vezethető vissza a sejt jellegzetes, tipikus funkciójának /pl. hormon szekréció, kontrakció/ szabályozása. /Jin és Jang az ó-kinai mitológiában a világ jelenségeit rendező, meghatározó ös-elvek./

Értekezésem szempontjából elsősorban azok a feed back mechanizmusok jelentősek, melyek lehetővé teszik, hogy a citoplazmában a szabad Ca^{++} és a cAMP kölcsönösen szabályozzák egymás szintjét /Strewler és Orloff 1977/. A fent mondottak értelmében az ilyen visszacsatolások szerepe a "kétirányú rendszerekben" a leginkább szembetűnő, de fontosak az "egyirányú rendszerként" definiált sejtekben is. A feed back kapcsolat természetesen nem zárja ki, hogy adott fiziológiai funkciót tekintve mind a Ca^{++} , mind a cAMP egyirányba hasson /pl. a mellékvesében a hormonszekréciót fokozza/. Az egyirányú rendszerek esetében a Ca^{++} és a cAMP közötti visszacsatolások feltehetően a másodlagos hirtvivő jel "tulerősítésétől" védik a sejteket /Berridge 1975; Rapp és Berridge 1977/. A biokémiai alapot részben az adenil-cikláz, részben a ciklusos-nukleotida foszfodi-

eszteráz /E.C.3.4.1.17/ Ca^{++} érzékenysége szolgáltatja. Az ATP-ből cAMP-t generáló adenil-cikláz aktivitását a Ca^{++} kétfázisos jelleggel módosítja: sejttípustól függő koncentráció érték $/10^{-6}-10^{-8} \text{ M } \text{Ca}^{++}/$ alatt aktiválja, ennél magasabb koncentrációban gátolja az enzimet. Amennyiben tehát a Ca^{++} szint "nagyon alacsony" a citoplazmában, a cAMP szint is alacsony. Kis mennyiségű Ca^{++} felvétele /pl. hormon aktivációt követően/ mintegy trigger hatásként iniciálja a cAMP képződést. Ez másodlagosan tovább növeli a citoplazmatikus Ca^{++} szintet részben az extracelluláris térből, részben az intracelluláris rezervoárokból a citoplazmába irányuló Ca^{++} flúxus aktiválásával. A megnövekedett Ca^{++} szint mostmár gátolja az adenil-cikláz aktivitását, ami a cAMP képződés csökkenéséhez vezet. Ezzel párhuzamosan a növekvő Ca^{++} koncentráció aktiválja a foszfodieszterázt is, így a cAMP degradáció sebessége ugyanakkor megnő. A Ca^{++} ugyanis egy "tropomiozin szerű", hőstabil citoplazmatikus fehérjével kapcsolódva létrehozza a foszfodieszteráz moderátor proteint, mely az aktiv enzim komponense. Ca^{++} hiányában /ill. alacsony Ca^{++} koncentrációk mellett/ a moderátor protein diszociál az enzimről, mely így aktivitását veszti /Brostrom és mtsi 1976; Watterson és mtsi 1976; Stevens és mtsi 1976/.

Az előzőekben már utaltam arra, hogy a citoplazmában a szabad Ca^{++} koncentráció, ill. a cAMP szintjének változásait a sejtmembrán kation "permeabilitásának" sajátos változásai kísérik. Mind a Ca^{++} , mind a cAMP szint emelkedése fokozza a K^{+} és Na^{+} gradiens irányu transzportjának sebessé-

gét. A jelenség élettani szerepe alaposan tanulmányozott a madár vörösvérsejt esetén /Kregenow 1977/: lehetővé teszi a vörösvérsejt alakjának és térfogatának gyors, hormonális szabályozását. Ez biztosítja, hogy különleges megterhelés esetén /pl. hosszantartó repülés/ a vérkeringés - a hemodinamika kedvező irányu változása miatt - gyors alkalmazkodásra képes. Nincs adat azonban arra vonatkozóan, hogy milyen transzport regulációs mechanizmusok eredményezik ezeket a változásokat. Nem ismeretes az sem, hogy a Ca^{++} és cAMP feed back kölcsönhatásai hogyan játszanak szerepet ennek szabályozásában. Az bizonyos, hogy a Na^+, K^+ -ATPáz legfeljebb másodlagos módon vehet részt ezeknek a "cAMP dependens" kation mozgásoknak a szabályozásában. Ezért beszél Kregenow "second pump" mechanizmusról.

Számos megfigyelés utal arra, hogy emlősök sejtjeiben is észlelhető a K^+ és Na^+ gradiens irányu transzportjának növekedése a cAMP koncentráció függvényeként /Rasmussen és Goodman 1977; Strewler és Orloff 1977/. Nem tisztázott azonban, hogy mi a jelenség mechanizmusa és milyen szerepet játszik a transzport folyamatok szabályozásában.

A.5. A glia kation transzport sajátosságai

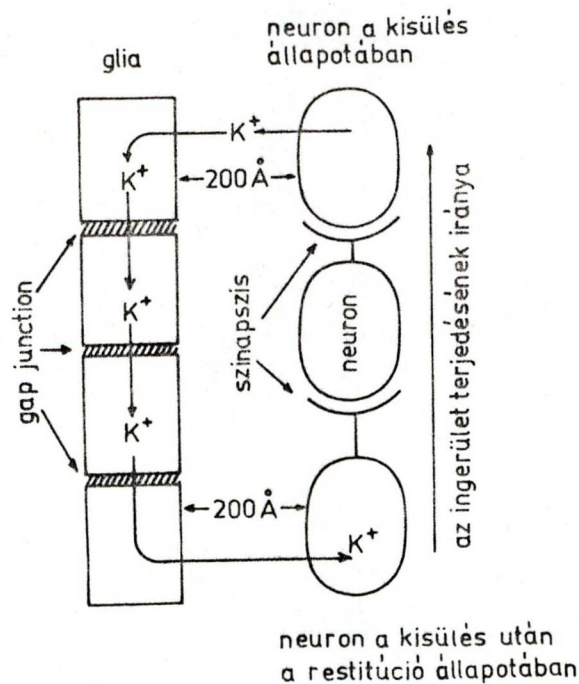
Értekezésem kereteit meghaladná azoknak az eredményeknek az ismertetése, melyek a glia kation transzportját - mindenek előtt a K^+ transzportot - az elmúlt évtizedben az érdeklődés középpontjába állították. Itt csupán vázlatosan azokat a tényeket ismertetem, amelyek indokolttá tették, hogy

a gliát válasszam modellként kísérleteim során.

A glia a központi idegrendszer jelentős tömegét adó sejttípus, melyet a morfológusok már a század elején leírtak, azonban szinte a legutóbbi évtizedig "passzív" támasztó szövetnek tekintettek. Ektodermális eredetű, mint a neuron, de akciós potenciált nem hoz létre. Az ingerület vezetésében nem vesz részt.

A glia, mint a neuron mikrokörnyezetében annak közvetlen szomszédja, szabályozza a neuron ingerületi folyamatát anélkül, hogy a két sejt között közvetlen érintkezés állna fenn /Nicholson 1979; Somjen 1979; Nicholson 1980/. /Az intercelluláris rés átlag 100-200 Ångström./ A neuron ugyanis "kisülése" során K^+ -ot ad le, ami az intercelluláris rés K^+ szintjét 2-3 mM-ről 40-80 mM-ra növeli. Ezt a jelentős mennyiségű K^+ -ot a glia igen gyorsan felveszi /ezt "in situ" közvetlen, mikroelektrodás mérések igazolták emlős agykérgen/. Ilyen módon a glia "pufferolja" a neuron környezetét a K^+ szempontjából, és ezzel lehetővé teszi a neuron membrán gyors repolarizációját. Igazolást nyert, hogy a gliának ez a szabályozó, " K^+ pufferoló szerepe" alapvetően fontos a központi idegrendszer működéséhez. /Ennek zavara mutatható ki számos súlyos idegrendszeri betegségben: agyödéma, epilepszia...stb./ /Lux és Neher 1973; Varon és Somjen 1979; Nicholson 1979; Somjen 1979; Nicholson 1980/. Ezt a glia neuron transzport kapcsolatot vázolja az 1. ábra.

Ujabb adatok alapján valószínű, hogy számos gyógyszerhatás, amely a központi idegrendszer működését befolyásolja



1. ábra: A glia szerepének vázlatja a K^+ homeosztázis fenntartásában a működő neuron környezetében

/pl. egyes "major tranquillánsok"/ nem közvetlenül a neuron, hanem elsődlegesen a glia működését módosítja /Henn és mtsi 1978/.

A glia tehát olyan sejt, melynek élettani funkciója a központi idegrendszer működésének az orvosi gyakorlat szempontjából is fontos szabályozása és ennek a funkciónak a központjában a K^+ transzport áll. Ugyanakkor nagyszámu adat bizonyítja azt is, hogy a glia tevékenysége a szervezetben kiterjedt hormonális irányítás függvénye. Kimutathatók a glia membránon pl. béta-adrenerg és dopamin receptorok /Henn és mtsi 1978/. Nagymértékben indokolt ezért an-

nak a feltételezése, hogy a glia legfontosabb funkcióját jelentő K^+ transzport szabályozásban a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer szerepet játszik.

B. AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITÜZÉSE

A glia funkció fenti, vázlatos ismertetése alapján is megállapítható: ez a sejt feltétlenül alkalmas modell annak a kérdésnek a vizsgálatára, hogy az eukariota kation transzport - mindenek előtt a K^+ transzport - milyen módon függ a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer szabályozó tevékenységétől.

Ennek a kérdésnek a tanulmányozása volt értekezésem célkitűzése. Hangsúlyozni szeretném azonban, hogy a problémát jelenlegi vizsgálataink során nem a glia sejt fiziológiája vagy biokémiája szempontjából tanulmányoztuk, hanem a gliát modellként tekintettük a fenn vázolt transzport szabályozási folyamatok vizsgálatához.

Munkánkat a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer által irányított kationtranszport szabályozásának tanulmányozása során elsősorban a Ca^{++} szerepének közelítésére koncentráltuk.

Másrészt, fontos feladatnak tekintettük adatok szerzését arra vonatkozóan, hogy milyen kooperáció áll fenn a

Na^+, K^+ -ATPáz által fenntartott aktiv kation transzport és a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer által meghatározott kation mozgások között.

Miután vizsgálataink modellje a glia sejt volt, ahol a fentiek szerint az irodalom a K^+ mozgások élettani szerepét hangsúlyozza - függetlenül a Na^+ mozgásától - természetes kérdésként merült fel, lehetséges-e a K^+ transzport olyan szabályozása, mely részben független a Na^+ transzport szabályozásától.

A fenti célkitűzés megvalósításához természetesen fontos a megfelelő glia sejtmodell megválasztása. Ezzel kapcsolatosan szükséges arra utalni, hogy eukarioták transzport folyamatainak vizsgálatára nem állnak rendelkezésre olyan általánosan használt modellek, mint a magvatlan emlős vörösvértest. Amint a fentiekben említettem, az eukariota madár vörösvérsejt sok szempontból megfelelő modell, azonban első sorban speciális problémák vizsgálatára előnyös. Az elmúlt években - különösen az idegrendszer transzport folyamatainak tanulmányozására - több szerző sikerrel alkalmazta a sejttenyésztési technikát. Különösen alkalmasak az ún. "monolayer" sejttenyészetek, ahol megfelelő "sejtbarát" felületen a sejtek megtapadva egyetlen réteget képeznek. Az ilyen sejtpopulációval végzett transzport kísérleteket technikailag igen egyszerűvé teszi az a tény, hogy az inkubáló médium és a sejtek elválasztása, továbbá a sejtek "mosása" centrifugálás nélkül megoldható viszonylag rövid idő /10-20 másodperc/ alatt. A médium pH /eukariota sejtek feltétlenül $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$

puffer rendszert igényelnek/ stabilizálása a szövettenyésztő laboratóriumokban egyébként is szükséges CO₂ termosztátokban elvégezhető.

C. MÓDSZEREK ÉS ANYAGOK

a. MÓDSZEREK

C.1. Glia sejttenyészetek készítése

Glia sejttenyészeteket Booher és Sensenbrenner módszerre /Booher és Sensenbrenner 1972/ szerint csirke embrió agyból készítettünk: a 17 napos csirke embrió agyát steril körülmények között kivettük, majd az agyszövetet nylon szitán /átlag pórus átmérő 48 μ / 20% főtális borjuszavót tartalmazó Eagle "Minimal Essential Medium" /MEM/ oldatba préseltük /mechanikus disszociálás/. Az így nyert sejtszuspenziót úgy higitottuk 20% főtális borju savót tartalmazó MEM-mel, hogy a sejtszám $1-5 \times 10^6$ sejt/ml legyen a tenyésztés indításakor. Ezt a sejtszuspenziót 6 cm átmérőjű Falcon plasztik Petri csészékbe vittük és termosztátba helyeztük. A tenyésztést 5% CO₂-ot tartalmazó légtérben, 37° C-on végeztük. A sejteken az első héten 3, később 4 naponként cseréltük a tápoldatot /MEM, 20% főtális savóval/.

A tenyészeteket általában 14 napos tenyésztési idő után használtuk fel kísérletekhez; olyan kísérleteinkben, ahol valamely adott paraméter változását a tenyésztési idő

függvényében vizsgáltuk, ennél rövidebb és hosszabb tenyésztési periódus után is használtunk tenyészeteket.

A fentiek szerint készített glia tenyészetekben a sejtek szorosan tapadnak a tenyésztő edény alján. Mint azt elektronmikroszkópos vizsgálataink kimutatták /Szentistványi és mtsi 1979/, a sejtek több rétegben helyezkednek el egymás felett, de 4 hetes tenyésztési idő után sincs azonban több 3-4 rétegnél. Így ezek a tenyészetek a diffúziós viszonyok szempontjából jó közelítéssel "monolayer"-ként kezelhetők.

C.2. A glia kation transzport vizsgálata

Kísérleteink során glia sejttenyészetekben a K^+ , Na^+ és Ca^{++} transzportját vizsgáltuk részben "egyensúlyi", részben "nem egyensúlyi" feltételek mellett. Mint általában az ionmozgások tanulmányozása esetén, "egyensúlyi" feltételeknek tekintjük azokat a kísérleti viszonyokat, amikor a vizsgált ionokra vonatkozóan sem a médiumban, sem a sejtekben nem lép fel koncentráció változás a kísérlet adott feltételei mellett. Ettől eltérően, "nem egyensúlyi" feltételek esetén a vizsgált ionok koncentrációja változik a sejtekben, ill. a médiumban. Sejttenyészetek /mint intakt eukariota modellek/ esetében "egyensúlyi" feltételeket megfelelő médium megválasztásával egyszerűen megvalósíthatunk, ez a tény jelenti egyik fontos előnyüket transzport kísérletekben /eltérően egyéb vizsgálati objektumoktól, pl. frakcionált centrifugálással nyert u.n. "bulk preparátumok"/.

Mindkét típusu kísérletben az ionmozgások követésére

radioaktív izotópokat alkalmaztunk nyomjelzőként. A K^+ nyomjelzésére elsősorban ^{86}Rb izotópot alkalmaztunk, mely irodalmi adatok szerint /Latzkovits és mtsi 1974/ a K^+ "kémiai nyomjelzője", viszont a ^{42}K izotóp felezési idejénél lényegesen hosszabb felezési ideje technikai előnyt jelent a sejtenyészetekkel végzett munkában. Eredményeinket azonban minden esetben ellenőriztük ^{42}K alkalmazásával végzett kísérletekkel. A Na^+ és a Ca^{++} transzport tanulmányozásához ^{22}Na , ill. ^{45}Ca izotópot használtunk.

A transzport kísérletek kivitelezése Latzkovits és mtsi módszere /Latzkovits és mtsi 1974; Latzkovits 1978/ szerint történt. Az ezen módszernek megfelelő, ill. ezzel analóg technika az irodalomban általánosan elfogadott /Kimelberg 1974; Kukes és mtsi 1976a, b; Hertz 1978/.

A megfelelő tenyésztési idő után a glia sejteket tartalmazó Petri csészék sorozatát használtuk olyan számban, hogy a kinetikus görbe /vagy koncentráció függvény/ minden pontjának három tenyészet párhuzamos mérési adatai feleljenek meg. A kísérleteket CO_2 termosztátban végeztük és az alkalmazott médium 10% borju savót tartalmazó Tyrode oldat volt. A Tyrode oldat ionösszetétele: 154-148 mM Na^+ , 2,68 mM K^+ , 0,49 mM Mg^{++} , 0-8 mM Ca^{++} , 0,36 mM $H_2PO_4^-$, 5,55 mM glükóz, pH 7,4. A Tyrode oldat ionösszetételének beállításakor a borju savó ion tartalmát is figyelembe vettük, amelyet előzetesen meghatároztunk. Az iontranszport influx komponensének vizsgálatakor a Tyrode oldat tartalmazta a megfelelő izotópot, általában 37-54 kBq/ml izotóp koncentrációban és ez az

oldat érintkezett a kívánt ideig a sejtekkel. Az efflux komponens vizsgálatánál a sejteket - az izotópot tartalmazó Tyrode oldattal végzett inkubálással /30-60 perc/ - izotóppal "telítettük" /"loading"/, majd az izotópot tartalmazó "meleg" Tyrode oldatot izotópot nem tartalmazó "hideg" Tyrode oldatra cseréltük, majd a tenyészeteket a kívánt ideig ismét CO_2 termosztátba helyeztük. A médium csere, beleértve a "meleg" Tyrode oldat elöntése utáni háromszori mosást is, 20-30 másodperc alatt elvégezhető.

Mind az influx, mind az efflux kísérletekben adott időpontban megfelelő számú párhuzamos Petri csészét kivettünk a CO_2 termosztátból, a médiumot leöntöttük és a sejteket háromszor mostuk izotóniás szacharóz oldattal /a művelet ugyancsak 20-30 másodperc alatt elvégezhető/.

A gyors médium cserét az teszi lehetővé, hogy a sejtek szorosan tapadnak /monolayer formájában/ a Petri csésze alján, ezért a médium és a mosófolyadék egyszerűen leönthető, és az oldatok adagolása automata pipettával pillanatszerűen végezhető. Egyes kísérleteinkben, mint a ^{22}Na influx és efflux vizsgálata esetében, a médium cserét és háromszori mosást technikai asszisztens segítségével 15 másodpercen belül végeztük. Ez lehetővé tette gyors változások kinetikájának pontos meghatározását.

A médiumokat, a hőmérséklet- és pH-eltérések kiküszöbölése érdekében, CO_2 termosztátban történt előinkubálás után alkalmaztuk. A befejező mosáshoz használt izotóniás szacharóz oldatot 0°C -ra hűtve használtuk.

A sejteket a szacharózzal végzett mosás után a Petri csészékben, lefedve, egy éjszakán át szobahőmérsékleten száritottuk. Ezután a sejteket tömény hangyasavban disszolváltuk, és megfelelő térfogatu részleteit használtuk ionmeghatározáshoz, radioaktivitás méréshez és fehérje meghatározáshoz. Az ionmeghatározást Perkin-Elmer atomabszorpciós spektrométerrel végeztük. A radioaktivitás méréshez Nuclear Chicago tri-carb spektrométert használtunk. A ^{86}Rb -ot és a ^{42}K -ot vizes közegben, a Cherenkov effektus alapján, a ^{22}Na -ot speciális "gamma edény"-ben folyadékscintillációval mértük. A ^{45}Ca lágy β -sugárzásának mérését EGTA tartalmu folyadékscintillációs koktél alkalmazásával oldottuk meg. A fehérje meghatározásához a tömény hangyasavas mintát szárazra pároltuk, majd 1 N NaOH-ban újra feloldottuk. A fehérje meghatározást ezután Lowry szerint [Lowry és mtsi 1951] végeztük.

C.3. A cAMP anyagcsere vizsgálata

A cAMP anyagcsere vizsgálatát az iontranszport mérésekkel egyidőben végeztük, azonos tenyészet sorozatot és azonos médiumot használtunk, de a médium radioaktiv nyomjelzőt nem tartalmazott. A médium előntése után a sejteket perklórsavval kicsaptuk, homogenizálócsőbe kapartuk és kézzel homogenizáltuk. A homogenizátum centrifugálása után a./ a felüluszót leszívás után KOH oldattal közömbösítettük és a felhasználásig -20°C -on tároltuk, b./ a csapadékot háromszor ismételt desztillált vízben történő reszuszpéndálással és



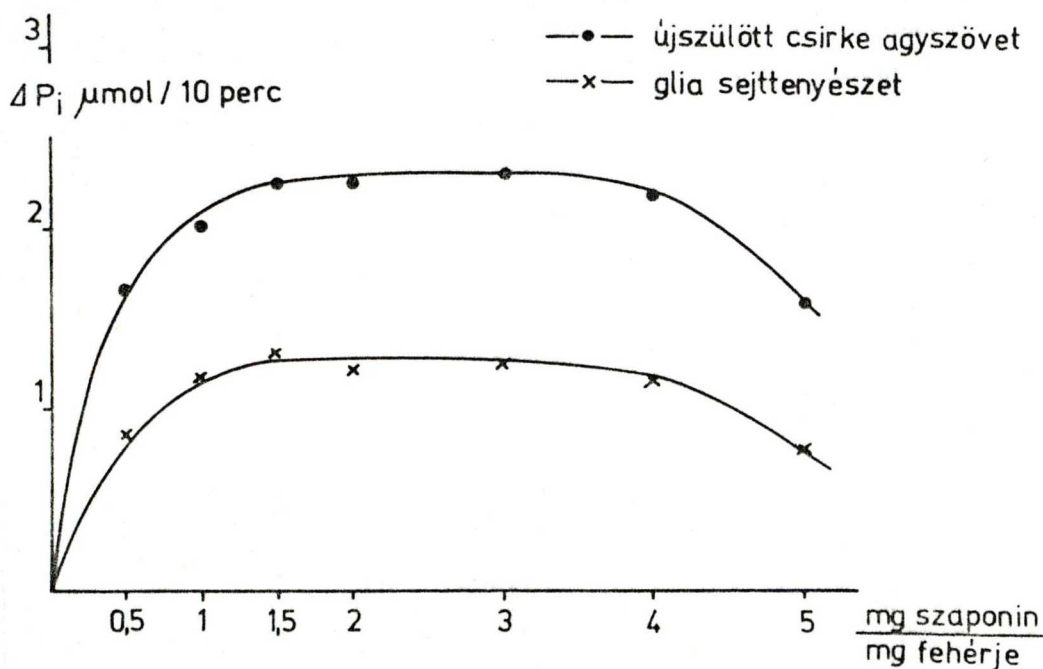
centrifugálással neutrálisra mostuk, 1 N NaOH-ban feloldottuk és a fehérje tartalmát Lowry szerint /Lowry és mtsi 1951/ meghatároztuk. A cAMP tartalom meghatározása céljából a mélyhűtött mintákat felengedés után centrifugáltuk és a felüluszó megfelelő részletét használtuk. A cAMP mennyiségét Brown /Brown és mtsi 1971/ módszere szerint határoztuk meg. A meghatározás elvi lépései: a./ Specifikus, cAMP érzékeny protein kináz kötőhelyéről a radioaktív szubsztrátot / ^3H -cAMP/ a megfelelő cAMP-vel kiszorítjuk. A kötőfehérjét és a cAMP-ot olyan arányban alkalmazzuk, hogy a kötőhelyek telítve legyenek. b./ A fehérjét elkülönítjük a szabad cAMP-től azáltal, hogy ezen utóbbit aktiv szénen megkötjük, és a fehérjéhez kötött radioaktivitást meghatározzuk. c./ Kalibrációs görbét készítünk, melyről a kísérleti minták cAMP tartalma leolvasható. Eredményeinket pmol cAMP/mg fehérje értékben fejeztük ki.

C.4. ATPáz aktivitás vizsgálatok

ATPáz aktivitási vizsgálatainknál glia sejttényészetekből, valamint újszülött csirke agyszövetéből készített homogenizátumot használtunk. Az ATPáz aktivitás mérésének elve az, hogy a feltárt szövetet ATP tartalmu oldatban inkubáljuk és a felszabadult anorganikus foszfátot / P_i / meghatározzuk.

A sejtmembrán belső oldalán elhelyezkedő ATPáz enzim szabaddá tételéhez a sejtek szaponinos feltárását alkalmaztuk. Előkísérleteinkben ugyanis, az ismert detergenssek közül, a szaponin bizonyult az általunk használt rendszerben a legelőnyösebbnek ATPáz aktivitás meghatározásához, mivel az ATPáz

aktivitás változását a szaponin : szövet arány függvényében vizsgálva találtunk egy olyan, viszonylag széles szaponin:szövet tartományt, melyben az ATPáz aktivitás nem függ a szaponin:szövet aránytól /2. ábra/.

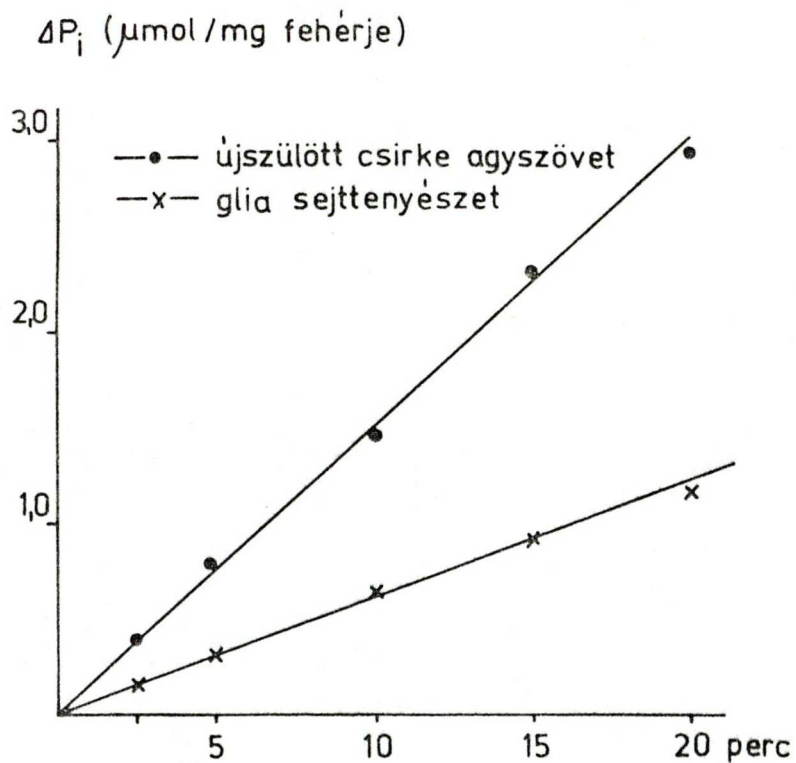


2. ábra: Szaponin koncentráció változásának hatása újszülött csirke agyszövet és tenyésztett glia sejtek Na⁺, K⁺-ATPáz aktivitására

Ez azért fontos, mert szövettenyészeteket használva objektumként, azok fehérje tartalma a homogenizátum készítésekor még nem ismeretes. /A tenyészetek fehérjetartalma ±15 %-os eltéréssel standardizálható./ Kísérleteinkben ezért a szövetek homogenizálásához 100 mg% szaponint tartal-

mazó pufferolt, izotóniás oldatot alkalmaztunk, ami ~2 mg szaponin/mg fehérje koncentrációnak felelt meg.

Az inkubálás időtartama és az ATP hidroliziséből keletkező P_i mennyiségének összefüggését vizsgálva azt találtuk, hogy 20 perces inkubálásig mindkét típusu szövetnél az ATPáz aktivitás változása lineáris volt /3. ábra/.



3. ábra: Újszülött csirke agyszövet és tenyésztett glia sejtek Na^+, K^+ -ATPáz aktivitásának változása az inkubálási idő függvényében

Kísérleteinkben ezért 10 perces inkubálási időt választottunk; az ezen ideig felszabadult P_i már jól mérhető, de még biztosan kezdeti sebességet határozzunk meg.

A fentieket figyelembe véve kísérleteinkben a következő módon jártunk el: a sejthomogenátok részletét 6mM ATP-t és 6mM ATP+2mM ouabaint tartalmazó, 37° C-ra előmelegített oldatokhoz adtuk; 10 perc inkubálás után a reakciót 20 %-os triklórecetsav oldattal leállítottuk. Centrifugálás után a felülszókából meghatároztuk a P_i -t Martin és Doty /Martin és Doty 1949/ szerint, a csapadékból pedig a C.3. fejezetben /27. oldal/ ismertetettek szerint mosás után fehérjét határoztunk meg. Eredményeinket $\mu\text{mol ATP/mg fehérje/perc}$ értékben fejeztük ki. Össz-ATPáz aktivitásnak nevezzük az ouabain jelenléte nélkül elbontott ATP mennyiségét fehérje és időegységre vonatkoztatva. A Na^+, K^+ -ATPáz aktivitás számszerű értékét az össz-ATPáz aktivitás és az ouabain jelenlétében mért, ouabain inszenzitív ATPáz aktivitás különbsége adja meg, ugyancsak $\mu\text{mol ATP/mg fehérje/perc}$ értékben kifejezve.

A pufferolt, izotóniás oldat, melyben mind a szaponint, mind az ATP-t oldottuk, az alábbi összetételű volt: 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 50 mM TRIS, 1 mM DTE /dithioeritritol/, pH 7,4.

b. ANYAGOK

Kísérleteink során használt valamennyi anyag analitikai tisztaságu volt; részben a Reanal Finomvegyszergyár készítménye. Az ATP /adenozin-5'-trifoszforsav-di-Na só/ és DTE /ditioeritritol, 2,3-dihidroxil-1,4-ditiolbután/ Sigma, USA; az EGTA /etilénglikol-bisz/2-aminoetil/-tetraecetsav/ és ouabain /G-strofantin/ Fluka, Svájc; a folyadék szcintillációs koktél Koch-Light Laboratories, Anglia gyártmánya volt. A szövettényésztéshez használt adatok a Gibco-Bio-cult cég készítményei voltak.

A radioaktív izotópokat a MTA Izotóp Intézete szállította, a ^{86}Rb , ^{42}K és ^{45}Ca hazai, a ^{22}Na szovjet gyártmánya volt, a ^3H -cAMP /2,8- ^3H -adenozin-3':5'-ciklikus foszfát ammonium só/ az Amersham cég, Anglia, gyártmánya volt.

D. EREDMÉNYEK

D.1. A Na^+, K^+ -ATPáz aktivitása és a K^+ transzport sebessége közötti összefüggés glia sejttényészetekben

Az értekezésem célkitűzéseként megjelölt probléma első megközelítéseként feltétlenül tanulmányoznunk kellett, mennyiben lehetséges a glia K^+ transzport sajátosságainak leírása

és értelmezése az "aktiv pumpa mechanizmus" alapján.

Ez mindennek előtt azért szükséges, mert több szerző egybehangzó kísérleti adatai szerint a glia membrán Na^+, K^+ -ATPáz az extracelluláris K^+ koncentráció emelkedése nagymértékben aktiválja, így a K^+ transzport tulajdonságai, az ennek megfelelő élettani funkció, kielégítően értelmezhető a "pumpa mechanizmusnak" megfelelően. Az elsőként L. Hertz /Hertz és Schousboe, 1975/ által kifejtett, napjainkban gyakran idézett elképzelés szerint, a neuron ingerületi folyamata során, a glia-neuron közötti résben megjelenő "excess K^+ " aktiválja a glia Na^+, K^+ -ATPáz és ez eredményezi a glia K^+ felvétel gyors megnövekedését. /A glia K^+ felvétel fokozódását az extracelluláris K^+ koncentráció függvényében "in situ" kísérletek igazolták /Somjen 1979; Nicholson 1979; Nicholson 1980/.

Mégis azt kell mondanunk, hogy a Na^+, K^+ -ATPáz szerepe nagymértékben problematikus. "In situ" kísérletben az enzim aktivitásra vonatkozóan természetesen semmi felvilágosítást nem nyerhetünk. Azok a biokémiai modellek pedig /Prince és mtsi 1978; Grisar és mtsi 1978/ melyek felhasználásával eddig szimultán végeztek enzim aktivitás és transzport sebesség mérést, nagymértékben vitathatók: sem az "agyszelet", sem a gradiens centrifugálással nyert izolált sejt preparátumok nem reprezentálhatják teljes mértékben az intakt sejteket, melyekkel sejttenyészetek esetén dolgozunk. /Az ilyen modellekkel nem valósíthatunk meg egyensúlyi viszonyokat. Az intracelluláris K^+ koncentráció gyakran jelentősen alá-

csonyabb, a Na^+ koncentráció jelentősen magasabb, mint az intakt sejtben./

Másrészt, saját kísérleteinkben sem tételeztük fel a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer kizárólagos szerepét, hanem ennek valamilyen együttműködését a pumpa mechanizmussal.

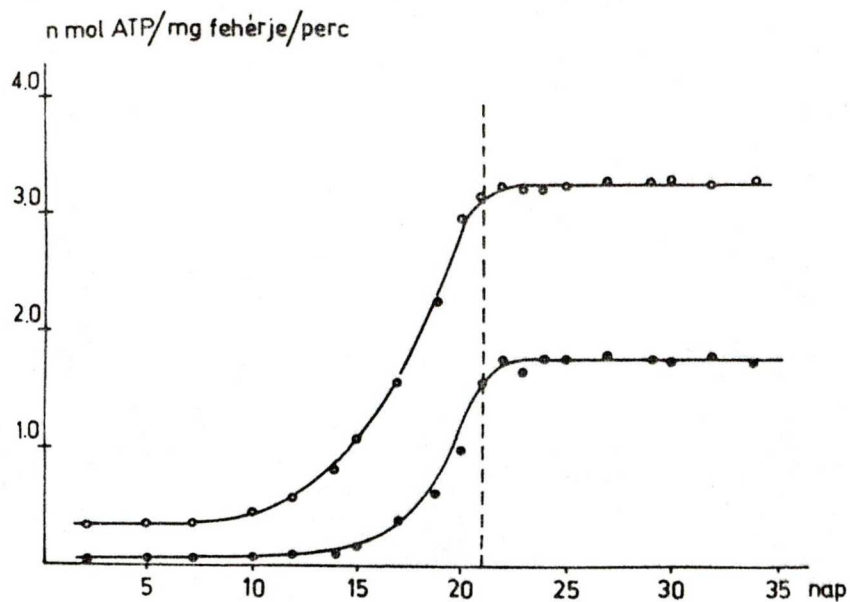
A sejttenyészetek - amellet, hogy intakt sejtekkel végezhetjük a transzport mérését, egyéb fontos előnyt is nyújtanak eukarioták esetén a Na^+, K^+ -ATPáz aktivitás és a transzport sebességek közötti összefüggés vizsgálatában. Fontos hangsúlyoznunk ugyanis, hogy olyan értelemben "intakt sejt ATPáz" mérést, mint magvatlan emlős vörösvértestek esetén, eukariótákkal nem végezhetünk. Az intakt sejt K^+ transzportját és a sejtéből készített homogenátum enzim aktivitását kell egymásnak megfeleltetnünk. A sejttenyészetek azonban lehetőséget nyújtanak arra, hogy a két tényezőt a sejtérés függvényeként vizsgáljuk. Amennyiben a K^+ transzport kizárólag a Na^+, K^+ -ATPáz aktivitás függvénye, - mint ahogyan a fent említett szerzők feltételezik - a sejtérés során azonosan kell változniuk.

A csirke embrió agyból készített glia tenyészetek esetén várható volt, hogy a sejtérés során a Na^+, K^+ -ATPáz aktivitás jellegzetes változásai következnek be: ilyen változások ugyanis az embrionális csirke agyban lejátszódnak a differenciálódás során /Bignami és mtsi 1966/.

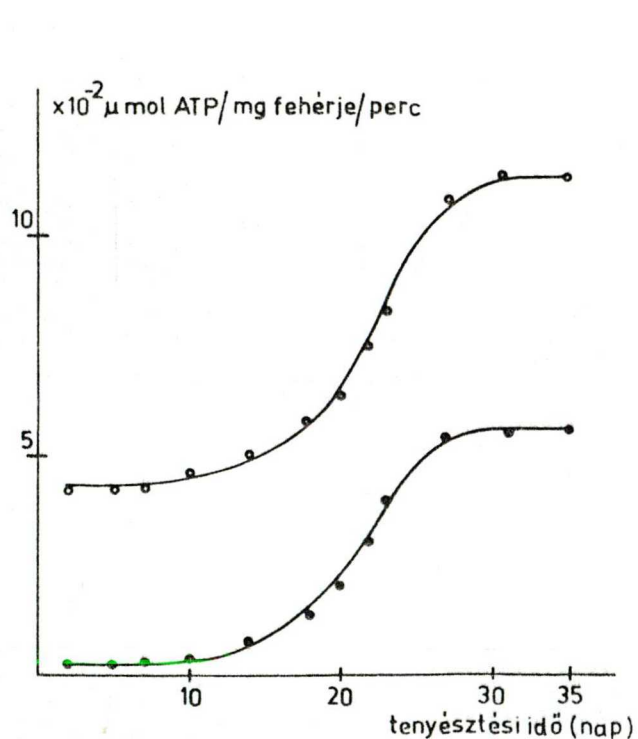
Az elmondottak értelmében összehasonlítottuk az egyen-
súlyi K^+ felvétel / ^{86}Rb ill. ^{42}K felvétele a médiumból/ és az ATPáz /ouabain szenzitív ill. össz-ATPáz/ aktivitás vál-

tozását glia tenyészetekben a tenyésztési idő függvényeként. Eredményeinket a 4., 5. és 6. ábrák mutatják. Látható egyrészt, hogy a glia tenyészetekben az ATPáz aktivitás változása /5. ábra/ szigorú párhuzamot mutat az embrionális csirke agy in vitro "érése" függvényeként észlelhető változással /4. ábra/. Mind az össz-, mind a ouabain szenzitív ATPáz aktivitás alacsony értékről indul, mind a tenyészetben, mind az embrionális agyban. Feltűnő a ouabain szenzitív komponens alacsony értéke. /Előkísérletekben megvizsgáltuk, hogy a ouabain szenzitív ATPáz aktivitás, amint az irodalmi adatok alapján várható volt, mind az embrionális csirke agy, mind a sejttenyészetek esetén megfelel a Na^+, K^+ -dependens ATPáz aktivitásnak./ Mint azt a 4. és 5. ábra szemlélteti, a ouabain dependens ATPáz, valamint az össz-ATPáz aktivitás mind a tenyészetekben, mind az embrionális agyszövetben a 21. nap körül /ez a csirke kikelésének ideje/ ugrásszerű emelkedést mutat. Ezzel szemben a K^+ felvétel változását glia tenyészetben 30 napos tenyésztési ideig követve /6. ábra/ a felvétel a hatodik-nyolcadik napig növekszik, majd a tizenötödik napig állandó értéket tart és ezután kismértékű csökkenés észlelhető, ugyanakkor, amikor az ilyen koru tenyészetekben az ATPáz aktivitás értéke /5. ábra/ kiugróan megemelkedik.

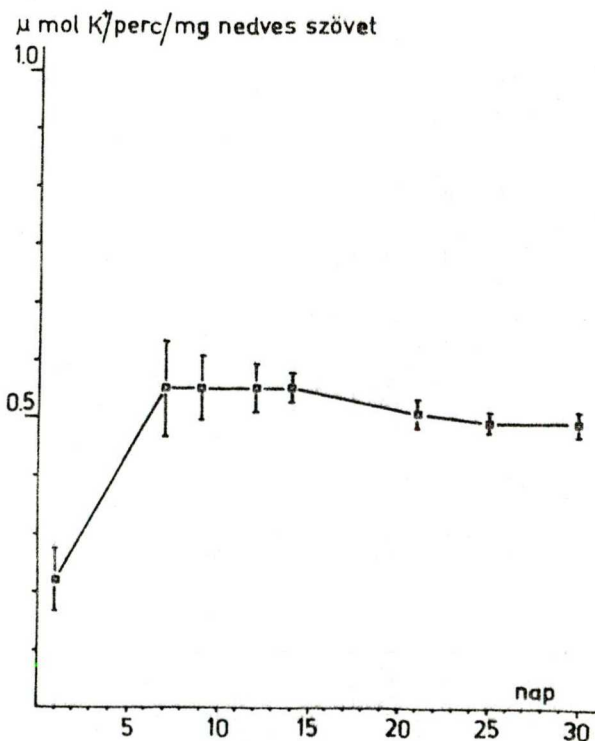
A Na^+, K^+ -ATPáz enzim specifikus inhibitora, a ouabain glia tenyészetekben a K^+ transzportját is gátolja. A sejtek K^+ tartalma /7. ábra/ jelentősen lecsökken már 10^{-5} M ouabain jelenlétében, meredek, az első néhány percben gyors



4. ábra: Csirke agyszövet ATPáz aktivitásának változása az embrió, ill. a fiatal csirke életkorának függvényében. -o-: össz-ATPáz
-●-: Na⁺,K⁺-ATPáz



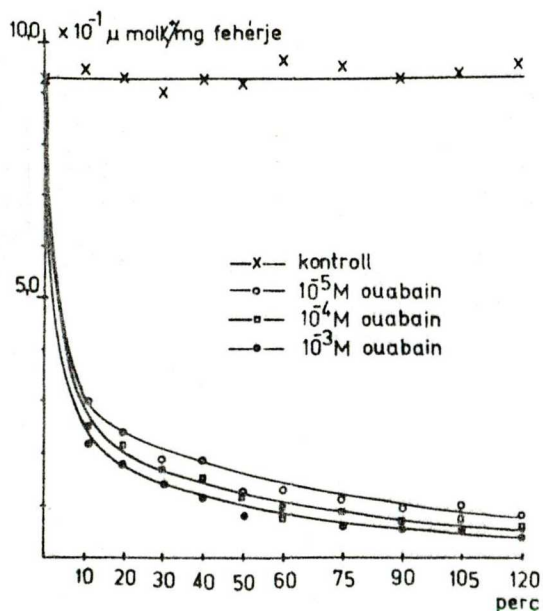
5. ábra: Tenyésztett glia sejtek ATPáz aktivitásának változása a tenyésztési idő függvényében. -o-: össz-ATPáz
-●-: Na⁺,K⁺-ATPáz



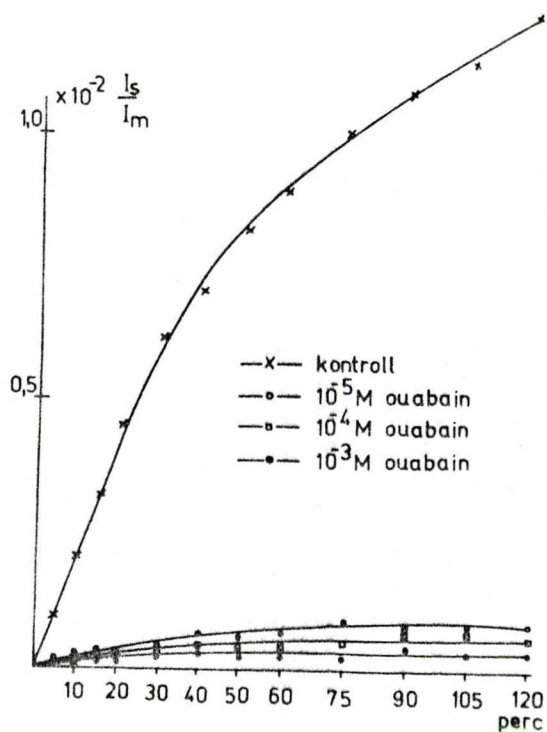
6. ábra: Tenyésztett glia sejtek K⁺ felvételének változása a tenyésztési idő függvényében

san eső görbét nyerünk, ha sejtek K^+ tartalmának változását időben követjük. A ouabain koncentráció 10^{-4} , 10^{-3} M-ra történő növelése nem okoz további lényeges változást. Ugyanezen glia tenyészetek ^{86}Rb felvételét vizsgálva /8. ábra/ hasonló változásokat figyelhetünk meg ouabain jelenlétében. Míg a kontroll tenyészetek folyamatosan vesznek fel ^{86}Rb -ot a médiumból, addig ouabain jelenlétében a ^{86}Rb felvétele jelentősen lecsökken, tehát a pumpa gátlása a K^+ felvétel gátlását okozza.

Ezen jelenség ellenére, azaz, hogy a glia sejtekben a K^+ mozgása ouabain dependens, azt mondhatjuk, hogy nincs egyértelmű összefüggés a Na^+, K^+ -ATPáz enzim működése és a



7. ábra: Ouabain hatása tenyésztett glia sejtek K^+ koncentrációjára az inkubálási idő függvényében



8. ábra: Ouabain hatása tenyésztett glia sejtek ^{86}Rb felvételére az inkubálási idő függvényében

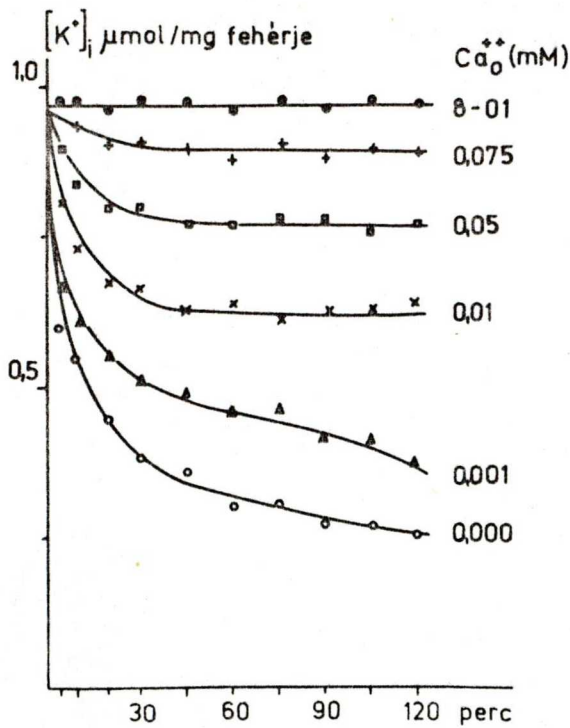


K^+ transzport között glia sejttenyészetekben, mivel a sejttérés során a sejtek Na^+, K^+ -ATPáz aktivitása és K^+ felvétele nem változik párhuzamosan a sejttérés függvényeként.

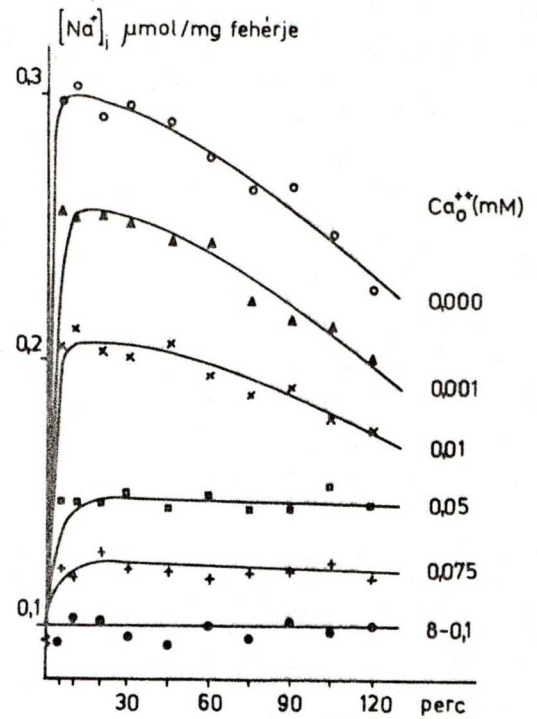
Ez a megállapítás /ami kidomborítja a tenyészetek technikai előnyeit transzport mechanizmusok vizsgálata során/ arra utal, hogy az intakt sejtben a Na^+, K^+ -pumpa működését egyéb mechanizmusok "felülszabályozzák". Mai ismereteink szerint ugyanis az "izolált" Na^+, K^+ -pumpa ATP hidrolizáló és kation transzportáló kapacitása szigorú sztöchiometriát mutat, faj- és szövetspecifitás nélkül /Glynn és Karlsh 1975; Sarkadi és Tosteson 1979/. Semmi ok sincs annak feltételezésére, hogy ez a szigorú sztöchiometria a glia sejt esetében nem lenne érvényes. Nagyszámu adat /Rasmussen 1970; Berridge 1975; Rapp és Berridge 1977; Rasmussen és Goodman 1977/ bizonyítja azonban, hogy ezt a sztöchiometriát az intakt sejtben módosíthatják bizonyos "felülszabályozó" mechanizmusok a sejtműködés aktuális igényeinek megfelelően /pl. a sejttérés különböző időszakában/.

Amint a bevezetőben részletesen kifejtettem, ezek a "felülszabályozó" mechanizmusok oly módon manipulálják a Na^+, K^+ -pumpa aktivitását, hogy a passzív kation mozgásokat befolyásolják elsődlegesen, amit a kation koncentrációk következményes megváltozása miatt, a Na^+, K^+ -pumpa másodlagos aktivitás módosulása követ /Glynn és Karlsh 1975; Wallick és mtsi 1979/.

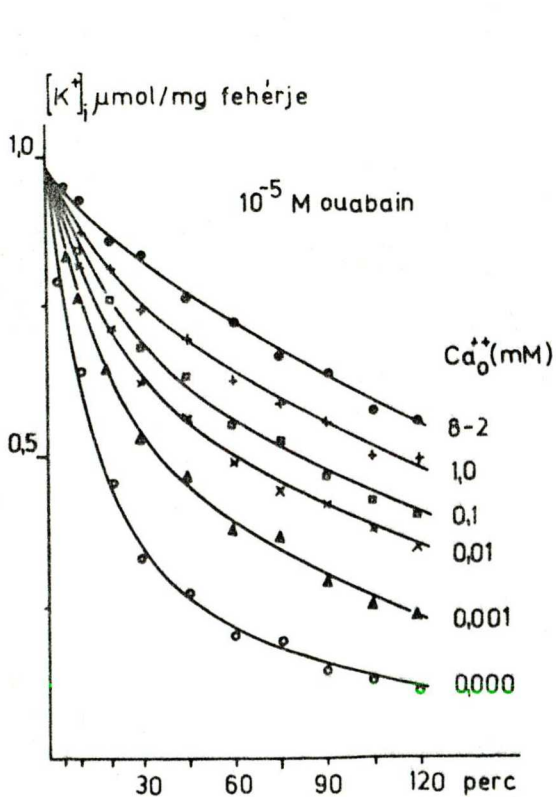
Ezek között a "felülszabályozó" mechanizmusok között irodalmi adatok alapján /Rasmussen 1970; Berridge 1975;



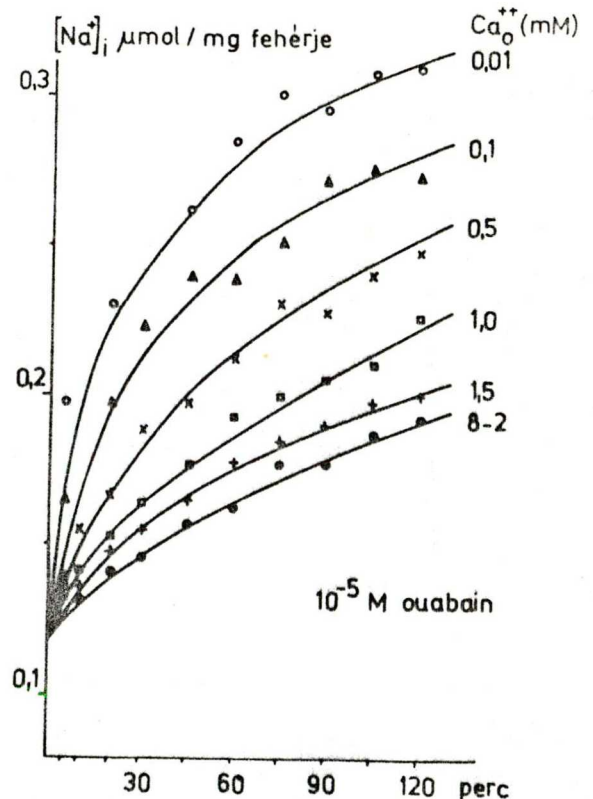
9. ábra: Tenyésztett glia sejtek K^+ koncentrációjának változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációknál az inkubálási idő függvényében



10. ábra: Tenyésztett glia sejtek Na^+ koncentrációjának változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációknál az inkubálási idő függvényében



11. ábra: Tenyésztett glia sejtek K^+ koncentrációjának változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációknál ouabain /10⁻⁵M/ jelenlétében az inkubálási idő függvényében



12. ábra: Tenyésztett glia sejtek Na^+ koncentrációjának változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációk mellett ouabain /10⁻⁵M/ jelenlétében az inkubálási idő függvényében

Wenner és Hackney 1976; Meech 1976; Rasmussen és Goodman 1977; Rapp és Berridge 1977; Strewler és Orloff 1977/ nagy jelentőséget kell tulajdonítanunk a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszernek.

Az agyszövet érdekes sajátossága, hogy a neuron élet-tani funkciójával párhuzamosan a glia mikrokörnyezetében a kation koncentrációk változnak /1. ábra/. Korábban említett az extracelluláris K^+ koncentráció növekedés /"excess" K^+ / szerepét a glia Na^+, K^+ -pumpa aktiválásában. A neuron ki-sülését követően lejátsszódik azonban egy másik szignifikáns változás is: a glia mikrokörnyezetében a Ca^{++} koncentráció jelentősen lecsökken /Prince és mtsi 1978; Nicholson 1979; Somjen 1979; Nicholson 1980/.

A továbbiakban ezért azt vizsgáltuk, hogy az extracel-luláris Ca^{++} koncentráció csökkenés, egyáltalán az extracel-luláris Ca^{++} koncentráció változása befolyásolhatja-e egy-részt a glia K^+ transzportot, másrészt ha ilyen jelenség fel-lép, abban szerepet játszhat-e az intracelluláris Ca^{++} -cik-lusos nukleotida rendszer alterációja.

D.2. Az extracelluláris Ca^{++} szerepe a K^+ transzport sebes-ségének kontrollálásában

A 9., 10., 11. és 12. ábrák mutatják, hogy a tenyésztett glia sejtekben hogyan változnak az intracelluláris K^+ / $[\text{K}^+]_i$ / és Na^+ / $[\text{Na}^+]_i$ / koncentrációk, ha az extracelluláris Ca^{++} koncentrációk / $[\text{Ca}^{++}]_o$ / változnak. Ouabain jelen-léte nélkül, amikor a Na^+, K^+ -pumpa működik /9. 10. ábrák/,

8 és 0,1 mM $[Ca^{++}]_o$ mellett a sejtek K^+ és Na^+ koncentrációja nem mutat változást. 0,1 mM $[Ca^{++}]_o$ alatt a sejtek K^+ koncentrációja csökken /9. ábra/, Na^+ koncentrációja növekszik. Ezek a változások a kísérleti periódus első szakaszában játszódnak le és ezután egyensúly áll be. A $[Ca^{++}]_o$ extrém csökkentése /0,001 mM/ vagy megvonása a médiumból már folyamatos K^+ kiáramlást eredményez /9. ábra/.

A tenyésztett glia sejtek Na^+ koncentrációjában ezek az extrém $[Ca^{++}]_o$ értékek a kezdeti szakaszon meredeken felálló maximum görbe szerinti változást okoznak /10. ábra/, ami arra utal, hogy a kezdeti időben nagy sebességgel felvett Na^+ egy részét a Na^+, K^+ -pumpa a sejtől eliminálja. A Na^+ koncentráció változásának ezen jellege azt is jelenti, hogy a Ca^{++} megvonás hatására bekövetkezett megnövekedett Na^+ permeabilitást a pompa fokozott működése ellensúlyozza. Ugyanez a következtetés vonható le a 0,01-0,075 mM $[Ca^{++}]_o$ tartományban a K^+ koncentráció változása alapján /9. ábra/: az intracelluláris K^+ koncentráció csökkenését a pompa aktiválódása ellensúlyozza és a sejtekben a K^+ koncentrációra vonatkozóan egyensúly áll be.

Ouabain jelenlétében /11., 12. ábrák/, amikor a Na^+, K^+ -pumpa működése gátolt, természetesen a sejtek K^+ koncentrációja folyamatosan csökken és Na^+ koncentrációja folyamatosan növekszik. Ouabain jelenlétében / 10^{-5} M/ a $[K^+]_i$ és $[Na^+]_i$ függése a külső Ca^{++} koncentrációtól módosul, az ionmozgások 2 mM $[Ca^{++}]_o$ alatt válnak Ca^{++} -függővé. Az ouabain jelenléte miatt egyébként is fennálló K^+ kifolyás mértéke megnő a

$[Ca^{++}]_o$ csökkenése eredményeképpen. Hasonló viselkedést mutat a sejtek Na^+ koncentrációjának változása is, amint azt a 12. ábra szemlélteti: ouabain jelenlétében a görbék lefutása megváltozik, a telítési szakasz elmarad, a sejtek folyamatosan vesznek fel Na^+ -ot és adnak le K^+ -ot.

A 9., 10., 11. és 12. ábrán demonstrált változások igen jól értelmezhetők az alábbi mechanizmus szerint:

A $[Ca^{++}]_o$ csökkenése a médiumban a fiziológiás 2 mM érték alá "megnyit" egy membrán "csatornát" /"kapu"-t; a nemzetközi irodalom ezt a jelenséget gating-nek nevezi/, amelyen keresztül a koncentráció gradiens irányában megindul a sejtekből a K^+ kiáramlása ill. a Na^+ passzív felvétele. Amennyiben a pumpa nem gátolt /és a "kapu" nem túlzottan "tág"/, ezt a passzív K^+ kiáramlást és Na^+ felvételt a Na^+, K^+ -pumpa ion koncentráció változásokat követő aktiválódása kompenzálja, megnövekedett K^+ felvétel ill. Na^+ kiűzés útján. Ezért nem észlelhető 2 mM és 0,1 mM $[Ca^{++}]_o$ között koncentráció változás a sejtekben ouabain távollétében. Azt a tényt, hogy ez a kompenzációs mechanizmus működik, alátámasztja, hogy ouabain jelenlétében a passzív mozgások 2-0,1 mM tartományban Ca^{++} érzékenyek lesznek /11., 12. ábra/.

Ugyanezt a következtetést bizonyítja, hogy ouabain alkalmazása nélkül 0,1 mM $[Ca^{++}]_o$ értékek alatt bekövetkezik ugyan a $[K^+]_i$ és $[Na^+]_i$ növekedés, azonban időben egyensúly alakul ki. Csak extrém alacsony $[Ca^{++}]_o$ értékek eredményeznek olyan "tág kapunyitás"-t, amelyet a Na^+, K^+ -pumpa ouabain

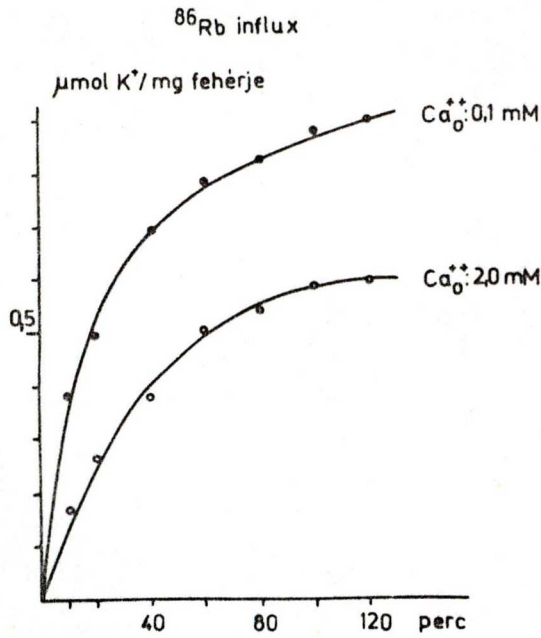
távollétében sem tud kompenzálni. Hogy a kompenzációs mechanizmus ilyenkor is működik, azt a 10. ábrán látható Na^+ maximum görbék erőteljesen alátámasztják.

A fenti mechanizmus további igazolására megvizsgáltuk a K^+ és Na^+ mozgásokat változó $[\text{Ca}^{++}]_0$ értékek mellett izotóp nyomjelzés alkalmazásával. Az izotóp ^{86}Rb és ^{22}Na nyomjelzés alkalmazása során nyert eredményeket szemlélteti a 13., 14., 15. és 16. ábra. Látható, hogy a fenn leírt mechanizmussal összhangban, ouabain távollétében az izotóp felvétel és leadás kinetikus görbéi szignifikáns eltérést mutatnak 2 mM és 0,1 mM $[\text{Ca}^{++}]_0$ mellett, ugyanakkor, amikor ebben a tartományban intracelluláris K^+ és Na^+ koncentráció változás nem észlelhető $[\text{Ca}^{++}]_0$ függvényeként.

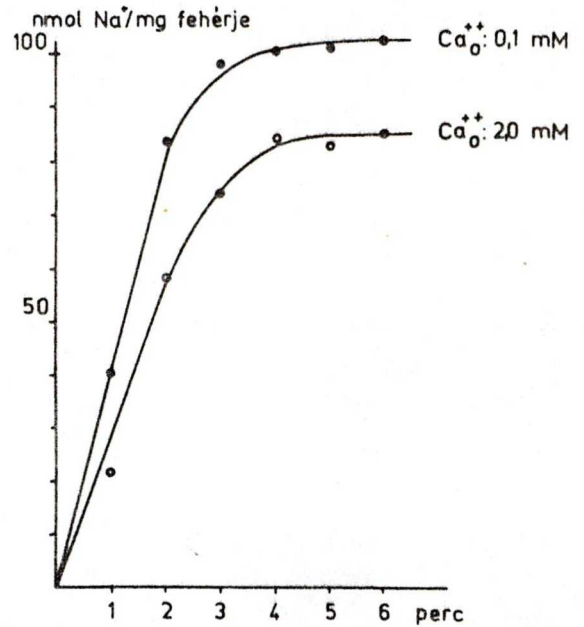
A továbbiakban az izotóp felvétel és leadás útján meghatározott K^+ és Na^+ fluxusok kezdeti sebességét adjuk meg $[\text{Ca}^{++}]_0$ függvényeként /I. táblázat/.

A kezdeti sebesség értékek kiszámítása során számos izotóp kinetikai probléma merül fel:

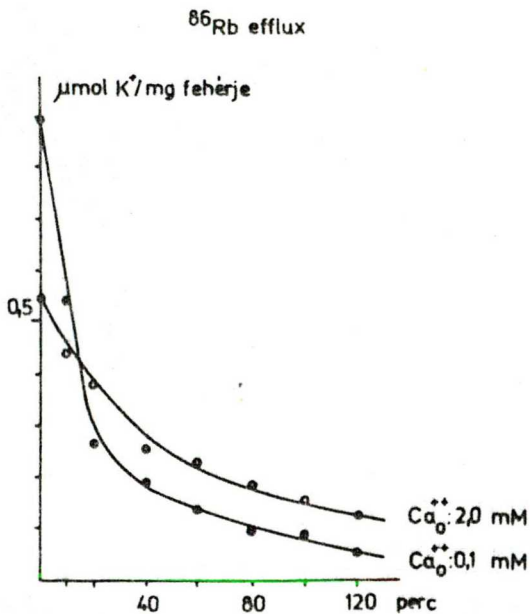
ouabain jelenlétében és ouabain távollétében végzett kísérletek esetén kell numerikus értékeket nyernünk a kezdeti sebességekre vonatkozóan. Ouabain távollétében a kation poolok egyensúlyban vannak, így ^{86}Rb , ^{42}K vagy ^{22}Na alkalmazásával végzett influx vagy efflux kísérletekben a kezdeti sebességek meghatározása egyszerű. Ouabain jelenlétében azonban /7., 8., 11., 12. ábrák/ a kation poolok steady state állapota megszűnik, tehát a kezdeti sebesség értékek kiszámításához a kezdeti koncentráció változásokat is figyelembe kell



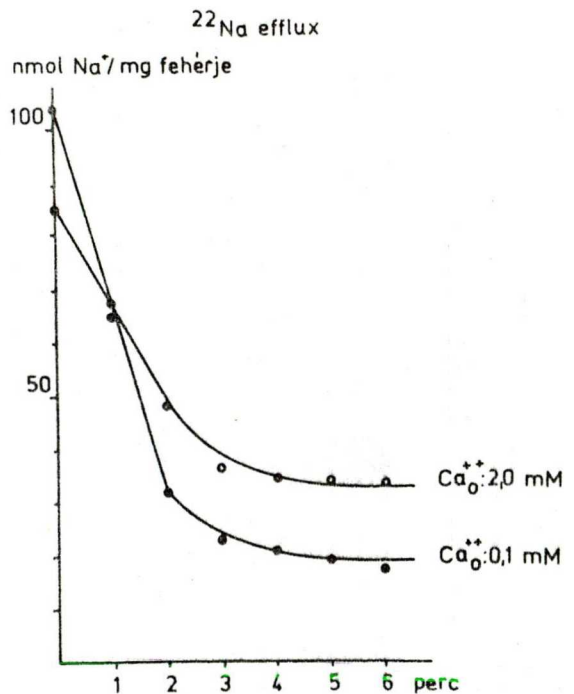
13. ábra: Tenyésztett glia sejtek ^{86}Rb felvételének változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációk mellett az inkubálási idő függvényében



14. ábra: Tenyésztett glia sejtek ^{22}Na felvételének változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációk mellett az inkubálási idő függvényében



15. ábra: ^{86}Rb kiáramlásának változása tenyésztett glia sejtekben különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációk mellett az inkubálási idő függvényében



16. ábra: ^{22}Na kiáramlásának változása tenyésztett glia sejtekben különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációk mellett az inkubálási idő függvényében

venni.

Ezt az alábbi megoldással tudjuk megvalósítani:
az izotóp megoszlás általános egyenlete a glia sejt - médium
két kompartmentes rendszerre vonatkozóan a következőképpen
írható fel:

$$\Delta I_s = \int_0^t V_i S_m dt - \int_0^t V_e S_s dt \quad (1)$$

$$\Delta C = \int_0^t |V_i - V_e| dt \quad (2)$$

ahol:

- ΔI_s a radioaktivitás változása a sejtben /dpm/mg fehérje/
 V_i az influx kezdeti sebessége /nmol kation/mg fehérje/perc/
 V_e az efflux kezdeti sebessége /nmol kation/mg fehérje/perc/
 S_m a radioaktív nyomjelző fajlagos aktivitása a médiumban
/dpm/nmol kation/
 S_{m_t} egy adott időpillanatban
 S_{m_0} nullapercben
 S_s a radioaktív nyomjelző fajlagos aktivitása a sejtben
/dpm/nmol kation/
 S_{s_t} egy adott időpillanatban
 S_{s_0} nullapercben
 ΔC a kation koncentráció változása a sejtekben a kezdeti
időintervallumban /a kísérlet kezdetétől számított első

20-180 mp/

t egy adott időpillanat

A szövettényészetekkel végzett kísérletek lehetővé teszik, hogy minden 20 másodpercben meghatározzuk I_s , C , S_m és S_s értékét, ezek időbeni változását az első 2-3 percen. Azt találtuk, hogy a kísérletek első 2-3 perces szakaszára vonatkozóan ezek az értékek lineáris időfüggést adnak; következésképpen erre a szakaszra vonatkozóan a kezdeti sebességek mint konstansok jelentkeznek. Ilyen módon az (1) és (2) egyenlet egyszerűen megoldható és a következő összefüggést szolgáltatja:

$$V_i = \frac{2\Delta I_s - \Delta C S_{s_t}}{S_{m_o} + S_{m_t} - S_{s_t}} \quad V_e = \frac{2\Delta I_s - \Delta C S_{m_t}}{S_{m_t} - S_{s_o} - S_{s_t}}$$

Ezen egyenletekkel számolva tehát a kezdeti értékeket pontosan kapjuk meg akkor is, ha az intracelluláris kation koncentráció változik.

Az I. Táblázatban összefoglalt nagyszámu adatot könnyen áttekinthetjük, ha a külső Ca^{++} koncentrációra vonatkozóan 3 tartományt különböztetünk meg:

1./ 10 mM - 2 mM $[Ca^{++}]_o$ mellett mind ouabain távollétében, mind jelenlétében a K^+ és Na^+ mozgások, az influx és efflux egyaránt független a külső Ca^{++} koncentrációtól. Ez az eredmény teljesen egybehangzó a 9., 10., 11., 12. ábrán feltüntetett koncentráció változások Ca^{++} dependenciájával.

I. Táblázat

A Na^+ és K^+ fluxusok kezdeti sebességének változása az extracelluláris Ca^{++} koncentráció függvényeként tenyésztett glia sejtekben

nmol / mg fehérje / perc									
S.D. < 3 %									
^{86}Rb					^{22}Na				
$[\text{Ca}^{++}]_o$	Influx		Efflux		Influx		Efflux		
mM	A	B	A	B	A	B	A	B	
10	21,8	1,15	20,8	46,8	26,1	50,7	25,3	0,79	
8	22,0	0,96	20,4	46,6	26,5	50,2	25,8	0,71	
6	21,3	1,01	20,3	46,3	25,8	50,2	25,6	0,75	
4	22,4	1,21	21,1	45,9	25,9	50,6	25,1	0,76	
2	21,7	1,16	20,9	46,1	26,4	51,0	25,4	0,76	
1,5	27,4	1,13	28,1	53,7	29,9	58,3	30,1	0,79	
1,0	31,3	1,12	32,2	58,4	38,4	61,4	37,5	0,77	
0,5	39,2	1,20	40,1	67,3	43,3	65,3	41,9	0,77	
0,1	53,2	1,81	54,7	81,9	61,1	76,2	59,8	0,79	
0,05	79,5	1,91	98,8	126,1	80,2	99,1	65,4	0,82	
0,001	99,4	1,86	121,5	149,9	92,1	110,6	70,4	0,87	
0,00	105,1	1,93	150,1	181,3	109,9	115,8	73,6	0,89	

A: ouabain nélkül

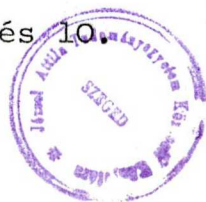
B: ouabain jelenlétében $/10^{-5} \text{ M}/$

Azt mondhatjuk tehát, hogy a " Ca^{++} -gating" 2 mM $[\text{Ca}^{++}]_o$ érték alatt következik be.

2./ A 2 mM és 0,1 mM $[\text{Ca}^{++}]_o$ tartomány reprezentálja azokat a Ca^{++} koncentráció értékeket, amelyben in vivo körülmények között /Prince és mtsi 1978; Nicholson 1979; Somjen 1979; Nicholson 1980/ a neuronális kisülést köve-

tően a glia mikrokörnyezetében, tehát a glia-neuron közötti részben a Ca^{++} koncentráció változhat. Látható, hogy ebben a tartományban ouabain távollétében, annak ellenére, hogy a 9. és 10. ábra adatai szerint a glia sejtekben a $[\text{K}^+]_i$ és $[\text{Na}^+]_i$ független $[\text{Ca}^{++}]_o$ -tól, a nyomjelző technikával meghatározott fluxusok szignifikáns változásokat mutatnak: mind a K^+ felvétele és leadása, mind a Na^+ felvétele és leadása megnő a $[\text{Ca}^{++}]_o$ csökkenésének függvényeként. Ouabain hatására, összhangban a fenn vázolt mechanizmussal és a 11., 12. ábra adataival, az uphill kation mozgások, tehát a K^+ influx és Na^+ efflux elveszti $[\text{Ca}^{++}]_o$ érzékenységét, azaz nem nő a $[\text{Ca}^{++}]_o$ csökkentésével. Ugyanakkor a downhill kationmozgások, tehát a K^+ efflux és Na^+ influx Ca^{++} érzékenysége megmarad. Ez újabb fontos bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a $[\text{Ca}^{++}]_o$ függvényeként bekövetkező Na^+ és K^+ fluxusváltozások létrejöttében a " Ca^{++} -gating", azaz a passzív fluxusok megnövekedése játssza az iniciáló szerepet, amit aztán másodlagosan követ a Na^+, K^+ -pumpa által meghatározott uphill kation mozgások megnövekedése.

3./ Ebben a $[\text{Ca}^{++}]_o$ tartományban /0,01 mM - 0 mM/ az izotóp technikával meghatározott fluxusok jellegzetességei megegyeznek azzal, amit a 2./ tartományra vonatkozóan leírtam, azzal az eltéréssel, hogy mind a K^+ -ra, mind a Na^+ -ra vonatkozóan az influx és efflux értékek ouabain távollétében sem egyeznek meg: a K^+ efflux értékei magasabbak, mint az influx értékek, ill. a Na^+ influx értékek meghaladják az efflux értékeket. Ez ismét összhangban van a 9. és 10.



ábra adataival, amelyek szerint a $[Ca^{++}]_o$ értékek csökkenése 0,1 mM alá koncentráció változást eredményez a sejten belül mind a K^+ -ra, mind a Na^+ -ra vonatkozóan. A jelenségek tehát erre a tartományra vonatkozóan is összhangban állnak az azal az interpretációval, hogy a fokozott " Ca^{++} -gating" által eredményezett passzív Na^+ és K^+ mozgásokat a Na^+, K^+ -pumpa megnövekedett aktivitása csak részben tudja kompenzálni.

A 2./ és 3./ tartomány között az eltérés tehát abban áll, hogy a 2./ tartománynak megfelelő $[Ca^{++}]_o$ változás által kiváltott passzív Na^+ és K^+ fluxusnövekedést a Na^+, K^+ -pumpa teljes mértékben kompenzálni képes, míg a 3./ tartománynak megfelelő $[Ca^{++}]_o$ értékek mellett a passzív K^+ és Na^+ fluxusok megnövekedése olyan mértékű, hogy a pumpa mechanizmus csak részlegesen képes azt kompenzálni.

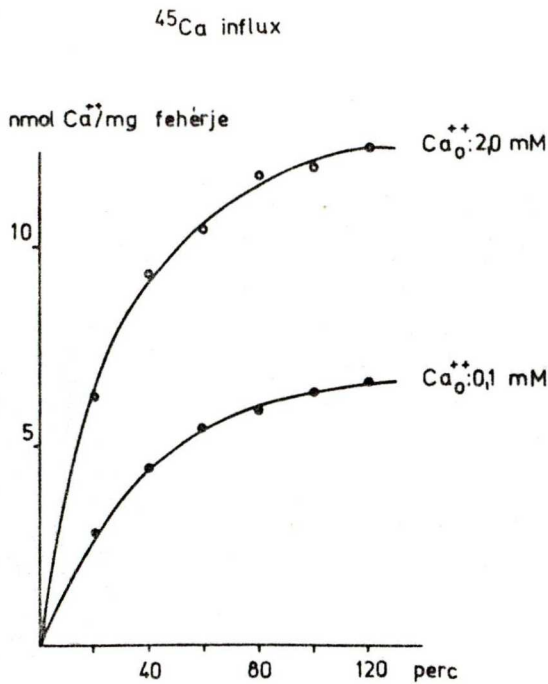
D.3. Az extracelluláris Ca^{++} változás hatása az intracelluláris Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszerre

Az extracelluláris Ca^{++} koncentráció a fiziológiás 2 mM alá csökkenésének a fentiekben /D.2. pont/ ismerttetett hatása a tenyésztett glia sejtek K^+ és Na^+ transzportjára olyan jelenség, amely analógiába hozható az extracelluláris Ca^{++} általánosan ismert permeabilitást csökkentő hatásával /Wenner és Hackney 1976/. Az irodalomban ma általánosan elfogadott hatásmechanizmus szerint a Ca^{++} -nak egyfajta "pórusokat tömítő" szerepet tulajdoníthatunk a membrán külső oldalán. E szerint a felfogás szerint a $[Ca^{++}]_o$ csökkentése a médiumban a sejtből leak transzportot eredményezne.

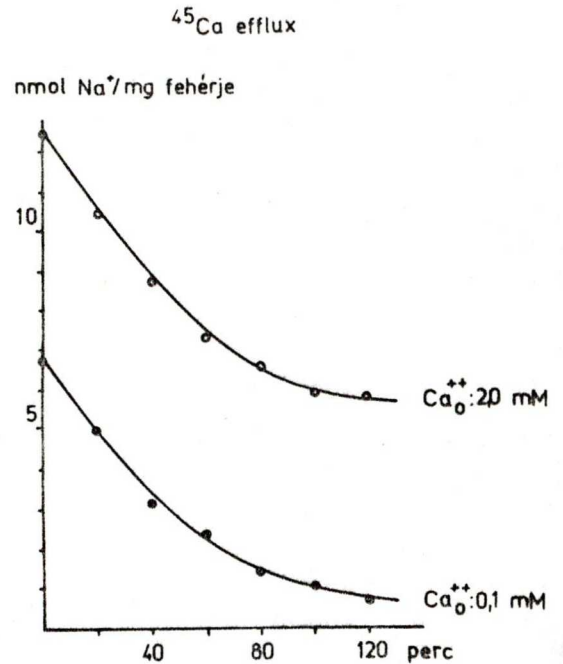
A bevezetésben ismertetett /Gárdos 1954, 1958; Meech 1976/ a Ca^{++} közelmúltban felismert specifikus hatásai, továbbá a saját kísérleteinkben a K^+ és Na^+ transzportjának nagyfoku érzékenysége a fiziológiai Ca^{++} koncentráció változásokra ellentmondanak ilyen egyszerű értelmezésnek.

Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a $[\text{Ca}^{++}]_o$ változások következtében a fentiekben leírt K^+ és Na^+ fluxus változások vajon a membránt érő külső hatás következtében jönnek-e létre, vagy a $[\text{Ca}^{++}]_o$ csökkenése triggerelhet esetleg olyan intracelluláris mechanizmusokat, melyek "felül szabályozzák" a Na^+, K^+ -pumpát, mint arra a 0. l. pontban utaltam. Ennek érdekében megvizsgáltuk a Ca^{++} felvétel és leadás $[\text{Ca}^{++}]_o$ függését glia sejtenyészetekben ^{45}Ca alkalmazásával.

A 17. és 18. ábra mutat be egy olyan kísérlettipust, melyben eltérő $[\text{Ca}^{++}]_o$ mellett követtük 120 percig a Ca^{++} felvételt ^{45}Ca alkalmazásával, majd 120 perc után a ^{45}Ca -ot tartalmazó médiumot izotópmentes médiumra cseréltük, mely az ábrán feltüntetett koncentrációban tartalmazott Ca^{++} -ot, és követtük a ^{45}Ca leadását. Látható /17. ábra/, hogy két eltérő /2 mM és 0,1 mM/ $[\text{Ca}^{++}]_o$ érték mellett a Ca^{++} felvétel sebessége jelentős eltérést mutat /lásd a görbék kezdeti meredekségét/, míg a Ca^{++} leadás esetén /18. ábra/ az efflux sebessége /a kinetikus görbék meredeksége/ azonos értéket mutat. A 17. és 18. ábra, mint tipuskísérletek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy míg a Ca^{++} felvétel nagymértékben Ca^{++} -függő, addig a Ca^{++} leadás se-



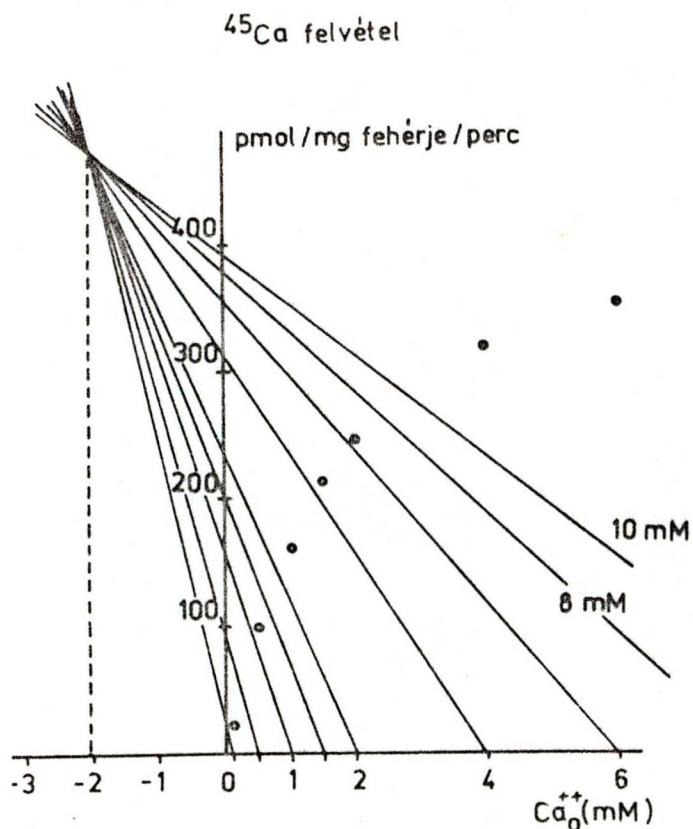
17. ábra: Tenyésztett glia sejtek ^{45}Ca felvételének változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációk mellett az inkubálási idő függvényében



18. ábra: ^{45}Ca kiáramlásának változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációk mellett tenyésztett glia sejtekből az inkubálási idő függvényében

bessége független a külső Ca^{++} koncentrációtól. Ezen megállapítás igazolására további kísérleteket végeztünk.

Részletesen vizsgáltuk a Ca^{++} felvétel és leadás kezdeti sebességének $[\text{Ca}^{++}]_o$ függését. Amint azt a 19. ábra mutatja, a Ca^{++} felvétel $[\text{Ca}^{++}]_o$ - dependenciája megfelel az egyszerű Michaelis-Menten kinetikának. Az ábra a Cornish-Bowden /Cornish-Bowden és Eisenthal 1974; Cornish-Bowden 1975/ féle "direkt" lineáris ábrázolást alkalmazza. Ez az ábrázolásmód K_M és $V_{\max}$ értékekre sokkal pontosabb adatokat



19. ábra: A ^{45}Ca felvétel kezdeti sebességének változása az extracelluláris Ca^{++} koncentráció függvényében. Cornish-Bowden féle ábrázolás a K_M és $V_{\max}$ meghatározásra
 $(K_M = 2,05 \text{ mM } [\text{Ca}^{++}]_o; V_{\max} = 470 \text{ pmol } \text{Ca}^{++} / \text{mg fehérje/perc})$

szolgáltató, mind a Lineweaver-Burk féle ábrázolás.

A Ca^{++} felvételre nyert $K_M = 2,05 \text{ mM } [\text{Ca}^{++}]_o$ és $V_{\max} = 470 \text{ pmol } \text{Ca}^{++} / \text{mg fehérje/perc}$. Ugyanakkor, mint azt a II. Táblázat mutatja, a fentieknek megfelelően a Ca^{++} influx értékek erőteljesen csökkennek a $[\text{Ca}^{++}]_o$ csökkenésével, míg az efflux csökkenése ehhez viszonyítva elhanyagolható a fiziológiás $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{++}]_o$ érték alatt.

II. Táblázat

A Ca^{++} fluxusok kezdeti sebességének, valamint az intracelluláris cAMP koncentráció változása tenyésztett glia sejtekben az extracelluláris Ca^{++} koncentráció függvényeként

^{45}Ca		cAMP max. szintjei	
$ \text{Ca}^{++} _0$	Influx	Efflux	(pmol/mg fehérje)
mM	S.D. < 6 %		S.D. < 20 %
10	391	388	19
8	375	381	21
6	345	359	23
4	305	348	18
2	241	357	21
1,5	208	361	20
1,0	160	344	25
0,5	100	349	31
0,1	26	351	49
0,05	15	359	89
0,01	8	348	151
0,005	6	353	110

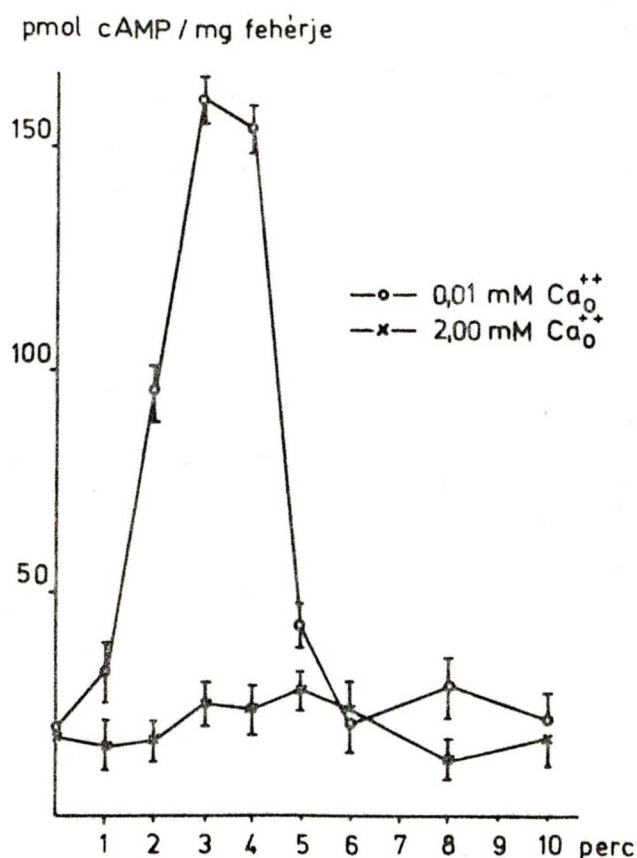
$$[\text{Ca}^{++}]_i = 14,4 \pm 0,6 \text{ nmol/mg protein}$$

Azt mondhatjuk tehát, hogy $[\text{Ca}^{++}]_0$ értékét 2 mM érték alá csökkentve létrejön a Ca^{++} influx és efflux fiziológiás egyensúlyának felbomlása. Noha erre jelenleg közvetlen kísérleti bizonyítékot nem szerezhettünk /az intracelluláris sza-

bad Ca^{++} koncentráció meghatározása nem lehetséges/ a Ca^{++} felvétel és leadás egyensúlyának átmeneti megbomlása szükségszerűen csökkenti a membrán belső környezetében az intracelluláris szabad Ca^{++} koncentrációt.

Igen nagyszámu irodalmi adat szerint a $[\text{Ca}^{++}]_i$ csökkenése a membrán környezetében olyan "trigger" esemény, amely kiválthat egyrészt átmeneti cAMP koncentráció növekedést és/vagy jelentős mennyiségű Ca^{++} mobilizációt az intracelluláris rezervoárokból /mitokondrium, endoplazmatikus retikulum /Scarpa és Carafoli 1978; Sulakhe és St.Louis 1980/. A Ca^{++} átmeneti mobilizációja az intracelluláris rezervoárokból történhet egyrészt a cAMP szint megemelkedésének következtében, de következménye lehet egyszerűen a $[\text{Ca}^{++}]_i$ átmeneti csökkenésének. Hangsúlyozni szeretném, hogy a fentiekben többször idézett nagyszámu irodalmi adat szerint a $[\text{Ca}^{++}]_i$ csökkenése trigger hatásként jelentkezik: kismértékű koncentráció ingadozás jelentős cAMP szint ingadozást hozhat létre, ill. Ca^{++} mobilizációt eredményezhet az intracelluláris rezervoárokból /Rasmussen 1970; Berridge 1975; Rapp és Berridge 1977; Rasmussen és Goodman 1977; Strewler és Orloff 1977/. A fenti lehetőség igazolására megvizsgáltuk, hogy a $[\text{Ca}^{++}]_o$ csökkenése létre hozhat-e tenyésztett glia sejtekben átmeneti cAMP koncentráció növekedést. Eredményeinket a 20. ábra és II. Táblázat mutatja.

A 20. ábra feltünteti, hogy a $[\text{Ca}^{++}]_o$ értéket 2 mM-ról 0,01 mM-ra csökkentve a cAMP szint a sejtekben rövid időtartamra megemelkedik. /A $[\text{Ca}^{++}]_o$ csökkentését vagy ugy



20. ábra: Tenyésztett glia sejtek cAMP koncentrációjának változása különböző extracelluláris Ca^{++} koncentrációknál az inkubálási idő függvényében.

értük el, hogy a médiumot 20 mp alatt, a háromszori mosást is beleértve, az alacsony Ca^{++} tartalmu médiumra cseréltük, vagy számított mennyiségű EGTA oldatot adtunk a médiumhoz./

A II. Táblázat feltünteti az egyéb $[\text{Ca}^{++}]_0$ értékek hasonló technikával történt kialakítása mellett mért cAMP csucok maximális értékeit. A változás kinetikája a csucok magasságától függetlenül megegyezett a 20. ábrán bemutatott cAMP változások kinetikájával.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a $[Ca^{++}]_o$ csökkenése a fiziológiás 2 mM érték alá olyan trigger esemény a glia sejt számára, amely megnöveli a sejtben a cAMP szintet. Noha ez a növekedés átmeneti, a magas szint néhány perc múlva megszűnik /20. ábra/, feltétlenül olyan változásnak tekinthető, mely az idézett irodalmi adatok szerint, iniciál egy "gating" mechanizmust, amely megnöveli a K^+ és Na^+ passzív /downhill/ fluxusait.

Felmerülhet az a kérdés, hogy a fiziológiás 2 mM $[Ca^{++}]_o$ felett, ahol szintén észleltünk eltérést a $[Ca^{++}]_o$ függvényeként a Ca^{++} felvétel ill. leadás sebesség értékei között, miért nem észlelhető a cAMP generáló rendszer aktivációja. Bár ennek a kérdésnek a megválaszolása további kísérleti munkát igényel, kézenfekvő az a feltételezés, hogy a fenti szabályozó mechanizmusnak van egy küszöb értéke a $[Ca^{++}]_i$ értékek vonatkozásában. Amennyiben a $[Ca^{++}]_i$ ezen érték alá csökken, ez a változás mint trigger esemény, iniciálja a fenti mechanizmust.

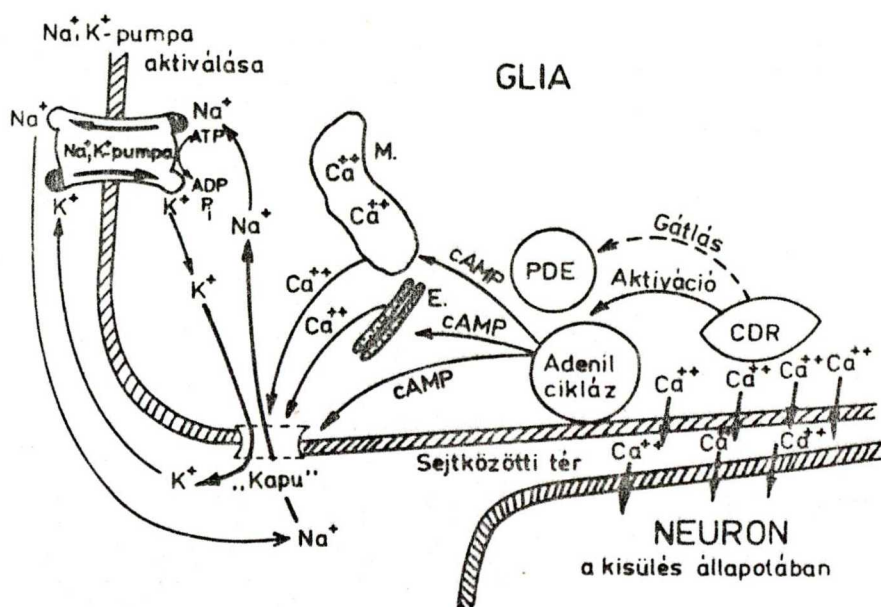
E. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A vizsgálataink alapját képező megfigyelések, melyeket a 0.1. pontban ismertettem, felvetették azt a kérdést, hogy a glia sejtekben a K^+ transzportot meghatározó Na^+, K^+ -pumpának lehet-e "felülszabályozó" mechanizmusa. Felmerült



továbbá az a kérdés is, hogy ebben a felülszabályozásban a Ca^{++} -ciklusos nukleotida rendszer szerepet játszik-e. Ismer-tetett eredményeink alapján azt kell mondanunk, hogy mindkét feltételezés megalapozottnak és indokoltnak bizonyult.

Ezt a felülszabályozó mechanizmust vázolja a 21. ábra, fiziológiai szerepével összefüggésben. Az ábra összefoglalja



21. ábra: A Ca^{++} és cAMP szerepének vázlatos ábrázolása a glia sejt Na^+ és K^+ transzportjának szabályozásában.

CDR: Ca-dependens regulátor fehérje

PDE: Ciklusos nukleotida foszfodieszteráz enzim E.C. 3.4.1.17.

M: Mitochondrium

E: Endoplazmatikus retikulum

a rendelkezésre álló, fentiekben idézett irodalmi adatokat és saját eredményeinket.

Az ingerület állapotában levő neuron környezetében a K^+ koncentráció megnövekszik /1. ábra/, a Ca^{++} koncentráció

lecsökken /Prince és mtsi 1978; Nicholson 1977, 1979; Somjen 1979/. A neuron működése következtében a sejtközüti részben bekövetkező ionkoncentráció változások a glia sejtben események láncolatát indítják meg. Az intercelluláris rés csökkent Ca^{++} koncentrációja megbontja a glia sejt membránján keresztül fennálló Ca^{++} felvétel és leadás egyensúlyát, ennek eredményeként a glia Ca^{++} -ot veszít /ld. D.3. 17., 18. ábra, II. Táblázat/.

Az ábrán CDR-rel jelölt fehérje Ca^{++} -dependens regulátor/ szabályozza az adenil cikláz és foszfodieszteráz enzim aktivitását a Ca^{++} ionokon keresztül. Ez olyan Ca^{++} -fehérje komplex, melynek molekuláris szerkezete és hatásmechanizmusa nagymértékű egyezést mutat az izom kontrakcióját szabályozó troponin-C-vel /Stevens és mtsi 1976/, mely az aktomiozin ATPáz regulátor fehérjéje. A Ca^{++} és CDR egy adott koncentrációja, mely az adenil cikláz enzimet aktiválja annak a koncentrációnak felel meg, amely a foszfodieszteráz enzimet gátolja /Brostrom és mtsi 1976/.

A glia sejtben a lecsökkenő Ca^{++} koncentráció miatt a Ca^{++} ledisszociál a CDR fehérjéről, ennek hatására megszűnik a PDE enzim aktiv konformációja. Miután a PDE enzim nem működik, viszont az adenilát cikláz enzim aktiválódik /a Ca^{++} és a CDR fehérje kedvező koncentrációja következtében/, lavinaszerűen megindul a cAMP képződése. A mechanizmus jelentősége, hogy igen kis $[\text{Ca}^{++}]_i$ koncentráció változás a

CDR-PDE-adenil cikláz enzimek környezetében nagymértékű intracelluláris cAMP szint emelkedést hozhat létre. A Ca^{++} és cAMP összehangolt egymásutáni lépéseket tartalmazó működési mechanizmusa biztosítja az ingerre adott végső válasz kialakulását. A cAMP szabályozza mind a saját, mind a citoszol Ca^{++} koncentrációját; a Ca^{++} viszont a cAMP koncentrációját szabályozza és meghatározza a cAMP saját hidrolízisére gyakorolt hatásának mértékét. A megnövekedett intracelluláris cAMP szintek hatására Ca^{++} válik szabaddá az intracelluláris rezervoárokból /Berridge 1975; Rapp és Berridge 1977; Rasmussen és Goodman 1977/.

A K^+ és Na^+ gradiens irányu transzportjának létrejöttében /gating/ szerepe lehet a Ca^{++} ionoknak, a cAMP-nek vagy együttesen mindkettőnek. A citoplazmatikus szabad Ca^{++} szint megemelkedése létrehozhatja a Gárdos effektust, a K^+ szelektív kiáramlását /Gárdos 1954, 1958/. A Na ionok megnövekedett permeabilitásáért felelős lehet egyrészt a Ca^{++} koncentráció növekedése azáltal, hogy a $[\text{Ca}^{++}]_i$ szint egy küszöb érték fölé való emelkedése nemcsak a K^+ , de a Na^+ mozgását is lehetővé teszi /a "kapu" tágabb/ /Meech 1976/. Másrészt nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a jelenség létrejöttében a cAMP játszik szerepet membránhoz kötött protein kinázok révén, amelyek cAMP-függő foszforilációja megváltoztatja a transzmembrán Na^+ transzportot /Rasmussen és Goodman 1977/.

A glia sejtekbe beáramló Na^+ és onnan kifolyó K^+ aktíválja a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -pumpát a Na^+, K^+ -ATPáz enzim vektoriális mű-

kódése alapján /Glynn és Karlsh 1975; Wallick és mtsi 1979/. A pumpa fokozott működése következtében a Na^+ és K^+ koncentrációk visszaállnak a kezdeti szintre, megtörténik a Ca^{++} visszavétele az intracelluláris rezervoárokba /mitokondrium, endoplazmás retikulum/, a glia sejt nyugalomba jut, készen újabb ingerek felvételére.

A célkitűzésben felvetett kérdésre, hogy lehetséges-e a K^+ transzport szabályozása a Na^+ transzporttól függetlenül, eredményeink alapján azt kell mondanunk, hogy a glia sejtben a Na^+ és K^+ mozgásának szabályozása közös mechanizmus révén történik, nincs olyan szelektív mechanizmus, mely csak kizárólagosan a K ionok mozgásáért lenne felelős.

Eredményeink a glia sejt élettani szerepével kapcsolatban két szempontból tarthatnak számot érdeklődésre. Egyrészt, mint korábban említettem, a neuron működése során a glia mikrokörnyezetében a Ca^{++} koncentráció igen gyors változásai játszódnak le a 2-0,1 mM tartományban. Ebben a tartományban vizsgálataink szerint bár a glia sejtek kation koncentrációja nem változik, de kimutatható mind a K^+ mind a Na^+ fluxusok szignifikáns növekedése, egyrészt a passzív permeabilitás, másrészt a Na^+, K^+ -pumpa aktivációja következtében. Mindkét jelenség fontos szerepet tölthet be a glia sejt élettani funkcióinak ellátásában.

Noha az a kérdés, hogy a glia sejt Na^+ és K^+ transzportjában a ciklusos nukleotida rendszer szerepet játszik-e, az irodalomban ezideig nem merült fel, találhatunk olyan közléseket, melyek a feltételezéssel egybehangzó adatokat szol-

gáltatnak. Rasmussen 1970-ben közölte, hogy Dictyostelium discoideum sejtekben az extracelluláris Ca^{++} koncentráció csökkenése a sejtekben cAMP szint emelkedést hoz létre. Emlős sejteken ezzel egyező megfigyelést nem közöltek, de nagyszámu adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a cAMP rendszeren keresztül érvényesülő hormonhatások nagymértékben függenek a $[\text{Ca}^{++}]_o$ -tól.

Másrészt, miután számos irodalmi adat utal arra, hogy a glia funkciók igen fontos hormonális kontroll alatt állnak, a glia sejt kísérleteinkben mutatott nagyfoku érzékenysége az extracelluláris Ca^{++} koncentráció változások iránt ezeket a hormonhatásokat nagymértékben módosíthatja. Ennek a ténynek számos neuropatológiai folyamatban, ill. pszichofarmakológiai hatások létrejöttében lehet jelentősége.

IRODALOMJEGYZÉK

- BAKER, P.E. /1970/: in "Calcium and cellular function"
/Ed. A.W. Cuthbert/ Macmilland and Co. Ltd. London,
pp. 96-107.
- BERRIDGE, M.J. /1975/: in "Advances in cyclic nucleotide
research" Vol. 6. /Eds. P. Greengard and A.G. Robi-
son/ Raven Press, New York, pp. 1-98.
- BIGNAMI, A., G.PALLADINI, G. VENTURINI /1966/: Brain Res.
3, 207-209.
- BOOHER, J. és M. SENSENBRENNER /1972/: Neurobiology, 2,
97-105.
- BROSTROM, M.A., C.O. BROSTROM, B.M. BRECKENRIDGE, D.J.
WOLFF /1976/: J. Biol. Chem. 251, 4744-4750.
- BROWN, B.L., J.D.M. ALBANO, R.P. EKINS, A.M. SGHERZI /1971/:
Biochem. J. 121, 561-562.
- BROWN, B.L., R.P. EKINS, J.D.M. ALBANO /1972/: Adv. Cyclic
Nucleotide Res. 2, 25-40.
- CORNISH-BOWDEN, A. és R. EISENTHAL /1974/: Biochem. J. 139,
721-730.
- CORNISH-BOWDEN, A. /1975/: Biochem. J. 149, 305-312.
- CRANE, R.K. /1977/: Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 78,
99-159.
- DE VELLIS, J. és G. KUKES /1973/: Texas Rep. Biol. Med. 31,
/3/ 282-289.
- ELLORY, J.C. /1977/: in "Membrane transport in red cells"
/Eds. J.C. Ellory and W.L. Lew/ Academic Press, London,
New York, pp. 363-381.
- FAHN, S., G.J.KOVAL, R.W.ALBERS /1966/: J.Biol. Chem. 241,
1882-1891.
- FERREIRA, H.G. és V.L. LEW /1977/: in "Membrane transport in
red cells" /Eds. J.C. Ellory and W.L. Lew/ Academic

- Press, London, New York, pp. 53-90.
- FRANCK, G., Th. GRISAR, G. MOONEN, E. SCHOFFENIELS /1978/:
in "Dynamic properties of glia cells" /Eds. E. Schoffeniels, G. Franck, L. Hertz, and D.B. Tower/ Pergamon Press, New York, pp. 315-325.
- FREEDMAN, M.H. /1979/: Cell Immunol. 44, 290-313.
- GÁRDOS, G. /1954/: Acta physiol. hung. 6, 191-199.
- GÁRDOS, G. /1958/: Biochim. Biophys. Acta 30, 653-654.
- GLYNN, I.M. és S.J.D. KARLISH /1975/: Biochem. Soc. Spec. Publ. 4, 145-158.
- GRISAR, T., G. FRANCK, E. SCHOFFENIELS /1978/: in "Dynamic properties of glia cells" /Eds. E. Schoffeniels, G. Franck, L. Hertz and D.B. Tower/ Pergamon Press, New York, pp. 359-369.
- GUNN, R.B. /1979/: in "Membrane transport in biology" Vol.2. /Ed. D.C. Tosteson/ Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 59-80.
- GUNN, R.B. /1980/: Ann. Rev. Physiol. 42, 249-259.
- HENN, F.A., D.J.ANDERSON, A. SELLSTRÖM /1978/: in "Dynamic properties of glia cells". /Eds. E. Schoffeniels, G. Franck, L. Hertz and D.B. Tower/ Pergamon Press, New York, pp. 435-441.
- HERZT, L. és A. SCHOUSBOE /1975/: in "International review of neurobiology" Vol. 18. /Eds. C.C.Pfeiffer and J.R. Smythies/ Academic Press, New York, London, pp.141-211.
- HERTZ, L. /1978/: Brain Res. 145, 202-208.
- INESI, G. /1979/: in "Membrane transport in biology" Vol. 2. /Ed. D.C. Tosteson/ Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 357-393.
- JENKINSON, D.H., D.G. HAYLETT, K. KOLLER /1978/: in "Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach" /Eds. R.W. Straub, and L. Bolis/ Raven Press, New York, pp. 89-105.
- JØRGENSEN, P.L., J.C. SKOU, L.P. SOLOMONSON /1971/: Biochim. Biophys. Acta 233, 381-393.

- KAPLAN, J.G. /1978/: Ann. Rev. Physiol. 40, 19-41.
- KIMELBERG, H.K. /1974/: J. Neurochem. 22, 971-976.
- KOEFOED-JOHNSEN, V. és H.H. USSING /1960/: in "Mineral metabolism" Vol. 1. /Eds. C.L. Comar and F. Bronner/ Academic Press, New York, London, pp. 169-203.
- KREGENOW, F.M. /1977/: in "Membrane transport in red cells" /Eds. J.C. Ellory and W.L. Lew/ Academic Press, London, New York, pp. 383-426.
- KUKES, G., R. ELUL, J. DE VELLIS /1976 a/: Brain Res. 104, 71-92.
- KUKES, G., J. DE VELLIS, R. ELUL /1976 b/: Brain. Res. 104, 93-105.
- LATZKOVITS, L., M. SENSENBRENNER, P. MANDEL /1974/: J. Neurochem. 23, 193-200.
- LATZKOVITS, L. /1978/: in "Dynamic properties of glia cells" /Eds. E. Schoffeniels, G. Franck, L. Hertz, D.B. Tower/ Pergamon Press, New York, pp. 327-336.
- LEW, V.L. és L. BEAUGÉ /1979/: in "Membrane transport in biology" Vol. 2. /Ed. D.C. Tosteson/ Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 81-116.
- LING, G.N. /1977/: Mol. Cell Biochem. 15, 159-171.
- LOWRY, O.H., N.F. ROSENBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL /1951/: J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- LUX, H.D. és E. NEHER /1973/: Exp. Brain Res. 17, 190-205.
- MARTIN, J.B. és D.M. DOTY /1949/: Anal. Chem. /Washington/ 21, 965-973.
- MEECH, R.W. /1976/: in "Calcium in biological systems" /Ed. C.J. Duncan/ Cambridge Univ. Press., Cambridge, pp. 161-191.
- MULLINS, L.J. /1979/: in "Membrane transport in biology". Vol. 2. /Ed. D.C. Tosteson/ Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 161-210.
- NATHANSON, J.A. /1977/: Physiol. Reviews, 57, 157-256.
- NICHOLSON, C. /1979/: in "The Neurosciences: Fourth Study Program" /Eds. F.O. Schmitt and F.G. Worden/ MIT Press Journals, Cambridge, Massachusetts, London, pp. 457-476.

- NICHOLSON, C. /1980/: in "Neurosciences Res. Prog. Bull."
Vol. 18. /Ed. G. Adelman/ MIT Press Journals, Cambridge, Massachusetts, London
- OSCHMAN, J.L. /1978/: in "Membrane transport in biology"
Vol. 3. /Ed. G. Giebisch/ Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 55-93.
- PARKER, J.C. /1977/: in "Membrane transport in red cells"
/Eds. J.C. Ellory and W.L. Lew/ Academic Press, London New York, pp. 427-465.
- POST, R.L., S. KUME, T. TOBIN, B. ORCUTT, A.K. SEN /1969/:
J. Gen. Physiol. 54, 306-321.
- PRINCE, D.A., T.A. PEDLEY, B.R. RAMSON /1978/: in "Dynamic properties of glia cells" /Eds. E. Schoffeniels, G. Franck, L. Hertz, D.B. Tower/ Pergamon Press, New York, pp. 281-303.
- RAPP, P.E. és M.J. BERRIDGE /1977/: J. Theor. Biol. 66, 497-525.
- RASMUSSEN, H. /1970/: Science 170, 404-412.
- RASMUSSEN, H. és D.B.P. GOODMAN /1977/: Physiol. Reviews 57, 421-509.
- REUTER, H. és N. SEITZ /1968/: J. Physiol. London, 195, 451-463.
- ROSENBERG, T. /1948/: Acta Chem. Scand. 2, 14-28.
- SARKADI, B. és D.C. TOSTESON /1979/: in "Membrane transport in biology" Vol. 2. /Ed. D.C. Tosteson/ Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 117-160.
- SCARPA, A. és E. CARAFOLI /eds./ /1978/: in "Annals of the New York Academy of Sciences". Vol. 307. New York Acad. Sci., New York.
- SCHULTZ, S.G. és P.F. CURRAN /1970/: Physiol. Rev. 50, 637-656.
- SKOU, J.C. /1971/: in "Current topics in bioenergetics"
Vol. 4. /Ed. D.R. Sanadi/ Academic Press, London, New York
- SOMJEN, G.G. /1979/: Ann. Rev. Physiol. 41, 159-177.



- STEVENS, F.C., M. WALSH, H.C. HO, T.S. TEO, J.H. WANG
/1976/: J. Biol. Chem. 251, 4495-4500.
- STREWLER, G.J. és J. ORLOFF /1977/: in "Advances in cyclic
nucleotide research" Vol. 8. /Eds. P. Greengard and
G.A. Robison/ Raven Press, New York, pp. 311-361.
- SULAKHE, P.V. és P.J. ST. LOUIS /1980/: in "Prog. Biophys.
Molec. Biol." Vol. 35. /Eds. D. Noble and T.L. Blundell/
Pergamon Press, New York, pp. 135-195.
- SZENTISTVÁNYI, I., Z. JANKA, Á. RIMANÓCZY, L. LATZKOVITS, A.
JUHÁSZ /1979/: Cell. Mol. Biol. 25, 315-321.
- USSING, H.H. /1949/: Acta Physiol. Scand. 19, 43-67.
- USSING, H.H. és A. LEAF /1978/: in "Membrane transport in
biology" Vol. 3. /Ed. G. Giebisch/ Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1-26.
- VARON, S.S. és G.G. SOMJEN /1979/: in "Neurosciences Res.
Prog. Bull." Vol. 17. /Ed. G. Adelman/ MIT Press
Journals, Cambridge, Massachusetts, London.
- WALLICK, E.T., L.K. LANE, A. SCHWARTZ /1979/: Ann. Rev.
Physiol. 41, 397-411.
- WATTERSON, D.M., W.G. HARRELSON jr., P.M. KELLER, F.
SHARIEF, T.C. VANAMAN /1976/: J. Biol. Chem. 251,
4501-4513.
- WENNER, C. és J. HACKNEY /1976/: Arch. Biochem. Biophys.
176, 37-42.
- WHITFIELD, J.F., A.L. BOYNTON, J.P. MACMANUS, M. SIKORSKA,
B.K. TSANG /1979/: Mol. Cell. Biochem. 27, 155-179.
- WILEY, J.S. /1977/: in "Membrane transport in red cells"
/Eds. J.C. Ellory and W. L. Lew/ Academic Press,
London, New York, pp. 337-361.