

IMMOBILIZÁLÁS HATÁSA A KÜLÖNBÖZŐ TIPUSU VÁZIZMOK
SZARKOPLAZMATIKUS RETIKULUMÁNAK FEHÉRJE ÉS
LIPID ÖSSZETÉTELÉRE

GAJDOS LÁSZLÓ



Orvosi-biológiai doktori disszertáció

S z e g e d

1982

B 5088



E 2.169

T A R T A L O M

BEVEZETÉS

I.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	1 oldal
I.1.	A harántcsikolt izom szerkezete.....	4 "
I.1.2.	A biokémiai jellemzőkben lévő különbségek.....	5 "
I.1.3.	Morfológiai különbségek.....	6 "
I.1.4.	Fiziológiai, funkcionális kü- lönbségek.....	7 "
I.2.	A kontrakció molekuláris mechanizmusa.....	7 "
I.3.	Általában a biomembránokról.....	9 "
I.3.1.	A biológiai membránok néhány kö- zös tulajdonsága.....	10 "
I.4.	Az izomsejt membránjai.....	12 "
I.5.	A szarkoplazmatikus retikulum.....	12 "
I.5.1.	A szarkoplazmatikus retikulum membránrendszer összetétele.....	16 "
I.5.1.1.	A Ca^{2+} -ATP-áz fehérje.....	17 "
I.5.1.2.	A kalcium-kötő fehérjék.....	23 "
I.5.2.	A szarkoplazmatikus retikulum lipidjei.....	26 "

I.6.	A szarkoplazmatikus retikulum sajátságai a különböző rost- tipusú izmokban.....	29 oldal	
II.	KISÉRLETES RÉSZ.....	30	"
II.1.	A szarkoplazmatikus retikulum preparálása.....	31	"
II.2.	Fehérjemeghatározás.....	32	"
II.3.	Az SR preparátumok tisztaságának ellenőrzése.....	34	"
II.3.1.	Elektronmikroszkópos vizsgálá- tok.....	35	"
II.3.2.	Szarkolemmalis marker enzimek vizsgálata.....	35	"
II.3.3.	Mitokondriális szennyezettség ellenőrzése.....	39	"
II.4.	Az SR funkciójának biokémiai vizsgálata.....	41	"
II.4.1.	Ca-45 felvétel.....	41	"
II.4.2.	Az SR marker enzimeinek vizs- gálata.....	43	"
II.5.	Az SR preparátumok fehérjéinek gélelektroforetikus vizsgálata..	46	"
II.6.	Az SR preparátumok lipid össze- tételének vizsgálata.....	49	"
II.6.1.	Lipidek extrahálása.....	49	"

II.6.2.	Koleszterintartalom meghatározása.....	50	oldal
II.6.3.	A foszfolipidek frakcionálása.....	51	"
II.6.3.1.	A foszfolipidek meghatározása.....	52	"
II.7.	Száranyagtartalom meghatározása.....	53	"
III.	EREDMÉNYEK.....	55	"
IV.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÖSSZEFOGLALÁSA.....	75	"
	IRODALOM.....	81	"
	KÖSZÖNET		

B E V E Z E T É S

A vázizom a mozgások kivitelezésére specializálódott szövetféleség.

Működése során kémiai energia alakul át mechanikai munkává.

Az izomműködés intenzitása befolyásolja az izom anyagcserefolyamatait. Fokozott munkavégzéskor az anyagcserefolyamatok is fokozódnak, az izmok hipertrofizálódnak. A csökkent igénybevétel együtt jár az anyagcserefolyamatok lassulásával, az izmok atrofizálódnak.

Az izombiokémiai kutatások eredményei alapján az izom működésében beálló változások még igen sok, más változást indukálnak az izomrostokban.

Munkánk célja annak vizsgálata volt, hogy az izom működésében kísérletesen előidézett változások hogyan befolyásolják a különböző típusú harántcsikolt izmok szarkoplazmatikus retikulumának fehérje- és lipidösszetételét.

I. I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

Intézetünkben régóta vizsgáljuk, hogy a különböző környezeti hatások hogyan befolyásolják a váz /harántcsikolt/ izom szerkezetét, anyagcseréjét, elektrofiziológiai, fiziko-kémiai sajátosságait, egyéb paramétereit.

A különböző típusú harántcsikolt izmok biológiai egyensúlya sokféle kísérleti beavatkozással megváltoztatható. Például tenotómiával /az izmokat rögzítő inak átmetszése/, denervációval /az izomrostokat beidegző idegek átmetszése/, az immobilizálás különböző formáival, így gipszeléssel is /F. Guba et al. 1977, Ö. Takács et al. 1977, I. Sohár et al. 1977/. Ezek a beavatkozások izomatrofiához, a fehérjekompartmentek összetételének megváltozásához, ultrastrukturális változásokhoz vezetnek. Ezen változások megfigyelhetők az izomrostok fokozott igénybevételekor is /tréning, hosszú idejű kísérletes stimulálás/, amikor az izmok hipertrofizálódnak.

A gipszeléses immobilizálás olyan változásokat idéz elő a különböző izomrostokban, mely változások

nagymértékben hozzájárulnak az ultrastrukturális és metabolikus változások jobb megértéséhez.

A vázizmok kevert rosttipusúak. Fiziológiai szerepük szerint megkülönböztetünk lassú, gyors és intermedier izomrostokat.

A lassú rostok kis átmérőjűek /300 Å/, mitokondriumban gazdagok, "széles" a Z-vonaluk. Lassan fáradnak, az ATP regenerálódását a mitokondriális oxidatív foszforiláció által biztosítják. Motoros véglemezők felszíni, szabálytalan redőzöttségű, kis felületű.

A gyors rostok nagyobb átmérőjűek /450 Å/, mitokondrium tartalmuk alacsonyabb, Z-vonaluk keskenyebb, mint a lassú rostoké. Gyorsan aktiválódnak és gyorsan ki is fáradnak. A működésükhöz szükséges energiát anaerob glikolizissel biztosítják. Motoros véglemezők szabályos, mély redőzöttséget mutat, nagy felületű.

A gyors rostok egy további típusa az intermedier rostok, melyek nevüket a közepes mitokondrium tartalomról, a fáradással szembeni viszonylagos ellenállásukról kapták. A rostok átmérője /350 Å /, a Z-vonal szélessége, a motoros egység típusa a lassú és gyors rostok közötti átmenetet mutatja.

Az egyes motoneuronok különböző frekvenciájú ingerek által aktiválódhatnak, így a különböző rostpopulációk egyszerre, vagy külön működhetnek.

Ez teszi az izmokat rendkívül változékonnyá és alkalmazkodóvá fiziológiai szerepük megfelelő betöltése számára.

Az izomszövet alkalmazkodóképességének klasszikus példája a kereszt reinnerváció, vagy a hosszú idejű kísérletes stimulálás. Kísérletekben, ha a gyors izomrostok saját beidegzését megszüntették, majd ezt követően a gyors rostokat olyan impulzusokkal ingerelték hosszú időn át, ami a lassú izomrostokat is éri in vivo, akkor az eredetileg gyors izomrost átalakult lassúvá.

Változás figyelhető meg a kontrakció gyorsaságában a már említett végtag-gipszeléskor is.

A külső tényező hatására bekövetkező funkcióváltozás módosítja a sejtek metabolizmusát és összetételét, különös tekintettel a kontraktilis apparátusra.

A különböző kezelések hatására az izom fenotípusában beálló változások sokfélék. Annyi bizonyos, hogy az izom aktivitása döntően befolyásolja a fenotípust, a különböző faktorok hatnak a genetikus állomány expressziójára. Ugyanakkor szerepe van pl. a táplálkozásnak, a hormonális hatásoknak is /Buresová M., Gutmann E. 1971./.

Az izomrostok heterogenitása, a különböző faktorok hatására bekövetkező változások azt mutatják, hogy

az izomszövet rendkívül plasztikus. Az izomsejtek a szükségleteknek megfelelően képesek alkalmazkodni környezetük változásaihoz /F. Guba, 1980./.

Az izomszövet plaszticitása megmutatkozik a fejlődésében, a betegségekre való reagálásában is, s mindezek kialakulásában genetikus, neuromuszkuláris és metabolikus interakciók játszanak szerepet.

I.1. A harántcsikolt izom szerkezete

A harántcsikolt, vagy vázizom az akaratlagos mozgásokat végző izomtípus. Az izom mikroszkópos képén harántcsikolat figyelhető meg, mely a strukturféhrjék egyenlőtlen eloszlásából adódó fénytörési különbség következménye.

Az izomkötegen belül izomnyalábok találhatóak, melyeket kötőszöveti elemek különítenek el egymástól.

Az izomnyalábok izomrostokból épülnek fel.

A tetanikus és tónusos izomrostok között lényeges különbségek figyelhetők meg mind a biokémiai jellemzőkben, mind morfológiai és funkcionális vonatkozásban /Bálint M., 1978./.

I.1.2. A biokémiai jellemzőkben lévő különbségek a következők:

1./ A tetanikus /fehér, gyors, fast twitch/ izomrostok kevesebb mioglobint tartalmaznak mint a tónusos /vörös, lassú, slow twitch/ izomrostok, ezért színük valamivel világosabb.

2./ A tetanikus rostok miozinja három különböző molsúlyú könnyű láncot tartalmaz, a tónusos izomrostok miozinjának kétféle könnyű lánc van. A könnyű láncokat a miozinból történő izolálhatóságuk alapján két csoportra osztjuk:

- a./ Az ún. DTNB /ditio-bisz-nitrobenzoesav/ könnyű láncok a miozinból DTNB-vel vonhatók ki úgy, hogy az ATP-áz aktivitásuk megmarad.
- b./ A másik csoportot az alkáli könnyű láncok képezik, melyek a miozinból nem vonhatók ki enzimaktivitásuk elvesztése nélkül.

A tetanikus izomrostok a miozin két nehéz lánc mellett háromféle könnyű láncot tartalmaznak, melyek közül kettő monomer /alkali könnyű láncok/ és egy dimer /DTNB könnyű láncok/. A tónusos izomrostok miozinja két nehéz láncot és egy-egy alkali és DTNB könnyű láncot tartalmaz.

3./ A tónusos rostok neutrális zsír, foszfolipid és koleszterin tartalma magasabb.

4./ A tetanikus izomrostok miozin ATP-áz aktivitása magasabb mint a tónusos rostoké.

5./ A tetanikus rostok szarkoplazmatikus retikulumának Ca^{2+} -felvevő kapacitása magasabb a tónusos rostokéhoz képest.

6./ A tetanikus izomrostok főleg glikolitikus anyagcseréjűek. A működésükhöz szükséges ATP-t anaerob glikolizissel biztosítják. A tónusos izomrostokban az oxidatív anyagcsere dominál. Mitokondriumban gazdagabban, az ATP oxidatív foszforilációval képződik.

I.1.3. Morfológiai különbségek

1./ A tetanikus izomrostok miofibrillumainak harántcsikoltsága kifejezettebb, mint a tónusos rostoké. A miofibrillumban izotróp /polarizációs mikroszkópban kettőstörést nem mutató/ és anizotróp területek láthatók.

A szarkoméren belül /Z-membránok közötti terület/ az I-zónában a vékony /aktinból, troponinból, tropomiozinból, fölépített/ filamentumok találhatóak. Az A-zóna vastag /miozin tartalmú/ és vékony filamentumokat tartalmaz. Az A-zónát kettéosztja a H-zóna, melyben csak vastag filamentumok találhatóak. A H-zóna közepén az M-vonal húzódik.

2./ A tónusos rostok kapilláris érhálózata dúsabb.

3./ A tónusos rostok szarkoplazmás retikuluma kevésbé fejlett, mint a tetanikus rostoké.

I.1.4. Fiziológiai, funkcionális különbségek

1./ A tetanikus izomrostok az akaratlagos mozgások /helyváltoztatás/ kivitelezésében játszanak szerepet. A tónusos izomrostok /antigravitációs izmok/ a tónus fenntartásában, a testtartás kialakításában vesznek részt.

2./ A tónusos izomrostok tartós munkavégzésre képesek, míg a tetanikus rostok hamarabb fáradnak.

3./ Eltérő a kétféle izomrost kontrakciókészsége is. A tetanikus rostok kontrakciójának ideje 15-20 msec., a tónusos rostoké 50-60 msec.

4./ A tónusos rostok relaxációja lassúbb, mint a tetanikus rostoké.

I.2. A kontrakció molekuláris mechanizmusa

Ismeretes, hogy elektromos impulzus hatására az izomrostokban Ca^{2+} -ionok szabadulnak fel, melynek

következtében aktiválódik a kontraktilis apparátus. Az impulzus az izomrostokat burkoló szarkolemmához jut, mely az impulzust végigvezeti az izomrost felületén.

A szarkolemma - plazmalemma - valódi sejtmembránnak tekinthető. Funkcióját illetően különböző ionok és anyagok transzportjában vesz részt. Az ingert képviselő depolarizációs hullám a szarkolemmáról áttérjed a miofibrillumokat borító szarkoplazmatikus retikulumra. A depolarizációs hullám hatására a szarkoplazmatikus retikulumból Ca^{2+} -ionok szabadulnak fel, megnő a miofibrillum szabad Ca^{2+} -koncentrációja 10^{-7} - 10^{-9} M-ről 10^{-6} M-ra.

A depolarizációs hullám megszűnésével a Ca^{2+} -ionok visszajutnak a szarkoplazmatikus retikulumba, lecsökken az izomrostban a szabad Ca^{2+} -koncentráció, a kontrakció befejeződik, az izom relaxálódik.

Az izom citoplazma - szarkoplazma - különböző sejtorganelleumokat tartalmaz; így az izom összehúzódásra és elernyedésre képes szubcelluláris elemeit, a miofibrillumokat.

A miofibrillumok mellett található az energiaház-tartásban igen fontos szerepet játszó mitokondriumok. Ezek tartalmazzák a terminális oxidáció és oxidatív foszforilálás enzimszisztémáját. A szarkoplazmában ezenkívül glikogén szemcsék és zsírcseppek is előfordulnak.

A szarkoplazmában, közvetlenül a miofibrillumok felületén helyezkedik el a szarkoplazmatikus retikulum membránrendszer /továbbiakban SR/, mely a szarkoplazma strukturált része és fontos szerepe van az izomműködés szabályozásában.

Az SR részletes tárgyalása előtt a biomembránokkal kívánok foglalkozni, röviden.

I.3. Általában a biomembránokról

A biológiai membránok főleg fehérjékből és lipidekből állnak. A sejteket elkülönítik környezetüktől, s ezáltal a sejtek individualitását is biztosítják. A membránok szelektív permeabilitású barrierék, speciális transzportrendszerekkel. Ezek a transzportrendszerek szabályozzák az intracelluláris közeg molekuláris és ionos összetételét.

Az eukariota sejtek belső membránokat is tartalmaznak, amelyek a sejtorganellumok határát képezik.

A membránok teremtik meg a kapcsolatot a sejt és környezete között. Speciális receptorokat tartalmaznak a külső ingerek felfogására, kémiai vagy elektromos jeleket képesek továbbítani.

Biológiai rendszerekben két fontos energiaátalakító folyamat is membránokhoz kötött. A fotoszintézis

a kloroplasztok belső membránjában, az oxidatív foszforilálás a mitokondriumok belső membránjában megy végbe.

I.3.1. A biológiai membránok néhány közös tulajdonsága

1./ A membránok lemezes szerkezetűek, vastagságuk 60-100 Å.

2./ Főleg fehérjéket és lipideket tartalmaznak. A fehérje-lipid súlyarány a legtöbb membránban 1:4-től 4:1-ig terjed.

3./ A membrán lipidjei relative kis molekulák, melyek hidrofil és hidrofób tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezek a lipidek vizes fázisban spontán bimolekuláris réteget képeznek. Ez a lipid kettős réteg a barrier/gát/ a poláris molekulák átáramlásakor.

4./ Specifikus fehérjék különböző funkciókat "adnak" az egyes membránoknak. Ezen fehérjék lehetnek pumpa-rendszer tagjai, receptorok, enzimek. A membránok lipidjei megfelelő környezetet biztosítanak a fehérjék működéséhez.

5./ A membránok aszimmetrikusak, ami azt jelenti, hogy külső és belső felületük rendszerint különböző.

A membránok kialakításában résztvevő lipidek legnagyobb csoportját a foszfolipidek képezik /foszfatidil-kolin, -etanolamin, -szerin, -inozitol/. Ezek amfipatikus molekulák, melyek hidrofil és hidrofób régiókkal rendelkeznek, s ez teszi őket alkalmassá arra, hogy a membránokban orientáltan helyezkedjenek el.

Hidrofób részeikkel egymás felé fordulva alkotják a membránok belső részét, hidrofil részeik a membránok külső és belső felszínét képezik.

Sok membrán tartalmaz glikolipideket és koleszterint is. A fehérjék különbözőképpen helyezkedhetnek el a membránokban.

Némely fehérje hidrofób kölcsönhatások révén részben besüllyed a membránba /extrinszik vagy perifériás fehérjék/, mások teljesen átérlik a membránt /integráns fehérjék/, ilyenkor a lipid kettős réteg mint oldószer szolgál ezen fehérjék számára.

A ma elfogadott "folyékony mozaik modell" szerint /S.J.Singer, G.L.Nicholson, 1972./ a membránok fehérjék és lipidek kétdimenziós dinamikus szerkezete, melyben a fehérjék és lipidek oldalirányú mozgása is megvalósulhat.

A membránok fluiditása függ a membránokat alkotó zsírsavláncok hosszától és a telítetlen kötések számától.



I.4. Az izomsejt membránjai

Az izomsejt membránok durván két csoportra oszthatók:

Az egyik csoportba tartozik a mag és a mitokondrium membrán, a lizoszómális membránok, melyek közösek a legtöbb emlős sejtben.

A másik csoportba azok a membránok tartoznak, melyek egyedül az izomban találhatóak. Ezek a perifériás idegek és a kontraktilis apparátus makromolekulái között teremtik meg a kapcsolatot és magukban foglalják a felületi membránt, vagy szarkolemmát, a T-tubuláris rendszert és a szarkoplazmatikus retikulumot.

A szarkolemma funkcióját illetően különböző ionok és anyagok transzportjában vesz részt. Legfontosabb tulajdonsága, hogy képes szelektíven és gyorsan megváltoztatni permeabilitását Na^+ és K^+ ionra. Ez a membrán permeabilitásában beálló változás az alapja az ingerület hatására képződő akciós potenciálnak, mely a szarkolemmában tovaterjed.

I.5. A szarkoplazmatikus retikulum

A szarkoplazmatikus retikulum speciális funkcióval bíró membránrendszer.

Szabályozza a szarkoplazmán belüli kalcium szintet, mely ion közvetlenül felelős az aktin-miozin rendszer aktiválódásáért. Az SR képes gyorsan megkötni az intracelluláris kalciumot egy energiaigényes folyamatban és képes lecsökkenteni a szintjét, s ezt a szintet határozatlan ideig tartani. A megfelelő jelre adott válaszként a kalcium ismét képes felszabadulni az SR-ből, megindítva a kontrakciót a troponinhoz való kötődéssel.

A kalciumnak ez az egymást követő felszabadulása és reakkumulálása az SR által, adja az alapját az izomkontrakció és relaxáció mechanizmusának.

Az idegimpulzus megszűnésekor az SR Ca^{2+} -transzport ATP-áz enzime begyűjti a Ca^{2+} -ot a miofibrilláris területekről és az SR-ben tárolja /Weber et al.

1963./.. A felületi membránból eredő akciós potenciál és az SR kalcium felszabadító mechanizmusa közötti kapcsolatot a T-tubuláris rendszer teremti meg.

A T-tubuláris rendszer a felületi membrán keskeny betüremkedései, melyek behatolnak a rostokba, a rostok tengelyére merőlegesen. A T-tubulusok mellett, a tubulusok mindkét oldalán "ciszternális" képződmények figyelhetők meg, melyek egybeolvadnak /kommunikálnak/ a longitudinális tubulusokkal két T-tubulus közötti területen. A T-tubulus és a két ciszternális rész képezi együtt az ún. triádokat /G. Inesi, 1981./.

A T-tubuláris rendszer a szarkolemmához hasonlóan képes az akciós potenciált az izomsejt belsejébe aktivan vezetni.

Relaxációban a szarkoplazma kalcium koncentrációja 10^{-7} - 10^{-9} M, s ez a kontrakció ideje alatt 10^{-6} M-ra nő.

Elektronmikroszkópos megfigyelések alapján először Poster és Palade írta le az SR-t /Poster K., Palade G.E., 1957./. Megfigyeléseik alapján ez a membránrendszer tubulusoknak, vezikulumoknak és ciszternáknak olyan hálózata, mely körülfogja a miofibrillumokat.

Elektrofiziológiás kísérleteket végezve megállapították, hogy elektromos ingerlés hatására lokalizált kontrakciót kaptak, ha a depolarizációt ott indukálták, ahol a külső membrán "befordul" a rost belsejébe, kialakítva a T-tubulusokat /Franzini-Armstrong C., 1964./. Az SR Ca^{2+} -kötő képességét fragmentált SR membránnal vizsgálták. A membrán fragmentumok magas és specifikus kalcium akkumuláló képességet mutattak, s különleges rendszerként szolgálhatnak az aktiv iontranszport mechanizmusának tanulmányozására.

Az SR pellet ELMI-s képen 600-3000 Å átmérőjű vezikulák láthatók /G.Inesi, 1972./.

A vezikulák egy 60-70 Å vastagságú membránnal ha-

tároltak, mely háromrétegű elrendeződést mutat /Baskin R.J., 1971./. Ez azt jelenti, hogy a vezikulák lezártak.

A vezikulák felületén negatív festés után ELMI-ben 30-40 Å átmérőjű partikulumok figyelhetők meg. Ezek a kis partikulumok a felülethez 2 nm átmérőjű nyelcskével kapcsolódnak /Deamer D.W., Baskin R.J., 1969./.

Intakt SR membránok fagyasztva-töréses metodikával készített preparátumaiban a membránok hidrofób belsejében 90-100 Å nagyságú globulusok láthatók. Hosszabb idejű tripszines emésztés után a külső partikulumok nem láthatók sem negatív festett, sem fagyasztva-töréses preparátumokban, a hidrofób globulusok azonban továbbra is jelen vannak.

A fagyasztva-töréses technikával a membrán a belső kettős réteg legkevésbé ellenálló felszínén törik. Így konvex és konkáv törési felületek alakulnak ki. A hidrofób, belső globulusok majdnem kizárólag a konkáv felületen találhatóak. Számos megfigyelés alapján: a külső partikulumok és a belső globuláris részek azonosak az ATP-áz fehérjével. Az ATP-áz fehérjének van egy hidrofil és egy hidrofób része. A hidrofil rész - negatív festett felületeken mint felületi partikulum figyelhető meg - megfelel egyenként az ATP-áz polipeptid láncának.

A hidrofób, globuláris részek oligomer fehérje képzésére törekvő ATP-áz polipeptid láncok, s ezek a membrán belsejében találhatóak /D.Scales, G.Inesi 1976., Packer L. et al. 1974./.

Szolubilizálószerekkel végzett kísérletek alapján /Le Maire M. et al. 1976./ a teljes aktiv enzim molsúlya minimálisan 400.000 daltonra tehető. Ez a molsúly megfelel négy egyenként kb. 100.000 daltonos alegységből felépülő fehérjének. Az alegységek egymással kapcsolódva hidrofil csatornákat alakítanak ki, melyeken keresztül transzportálódik a Ca^{2+} /V.M.C.Madeira, 1980./.

I.5.1. A szarkoplazmatikus retikulum membránrendszer összetétele

Az SR az izomban a kalcium transzportjára és kötésére specializálódott membránrendszer. A membrán szárazanyag súlyának 60-70 %-át a fehérjék adják, 30-40 %-át pedig a lipidek.

Az SR legnagyobb molsúlyú fehérjéje a Ca^{2+} -aktivált ATP-áz, mely integráns fehérje, Kisebb fehérjéi a calsequestrin, a "kalcium kötő fehérje" /HACBP/, valamint egy proteolipid, glikoproteinek és alacsony molsúlyú, ismeretlen funkciójú fehérjék is találhatóak a membránban.

Lipidjeinek nagy része főleg foszfolipid, mely az összlipid kb. 90%-át képezi.

A továbbiakban az SR fehérjéit szeretném tárgyalni, különös tekintettel a kalcium transzportját végző Ca^{2+} -ATP-áz enzimre és a Ca^{2+} kötő fehérjékre.

Az SR fehérjéi

A SR-ből hét fehérjét izoláltak /Ostwald T., MacLennan D.H., 1974./:
az ATP-ázt, néhány vizoldékony savanyú fehérjét, melyek molsúlya: 55 000, 46 000, 38 000, 33 000 és 20 000 és egy proteolipidet. A SR-ben található glikoproteinek közül MacLennan és munkatársai /K.P. Campbell, D.H. MacLennan, 1981./ izoláltak és tisztítottak egy 53 000 molsúlyú fehérjét, mely a harántcsikolt izom szarkoplazmatikus retikulumának integráns fehérjéje.

I.5.1.1. A Ca^{2+} -ATP-áz fehérje

A Ca^{2+} -transzport ATP-áz /E.C.3.6.1.3./ egy kb. 102 000 daltonos fehérje /Martonosi A., Halpin R.A. 1971., MacLennan D.H. 1970., McFarland B.H., Inesi G. 1971., Meissner G., Fleischer S. 1971./. Legfőbb funk-

ciója a kalcium kötése és felszabadítása /A.Martonosi 1971./.

A Ca^{2+} -kötődése és membránon keresztüli transzportjának mértéke többféle úton tanulmányozható. Egyik legismertebb módszer az ATP és oxalátion jelenlétében végzett Ca^{2+} kicsapás. Így több μM Ca/mg protein kicsapható az SR vezikulákban /Hasselbach W., Makinose M. 1961./.

A Ca^{2+} -kötődés úgy is tanulmányozható, hogy az SR-ből tisztán izolált fehérjék Ca^{2+} -kötő képességét vizsgálják.

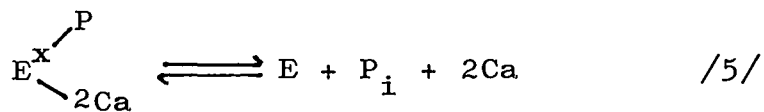
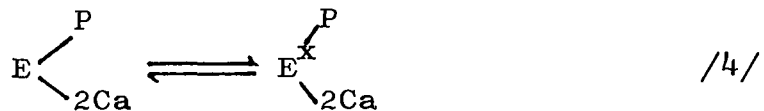
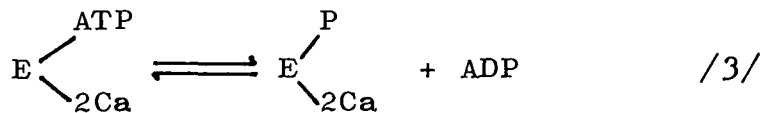
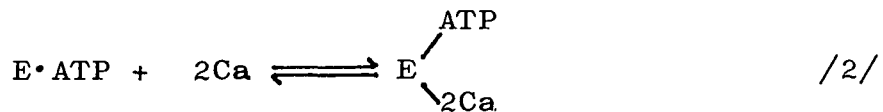
Az SR fehérjéi két fő csoportra oszthatók /D.H. MacLennan, P.T.S.Wong 1971./:

a./ intrinszik fehérjék: az ATP-áz, proteolipid és

b./ extrinszik fehérjék: több vizoldékony savanyú fehérje, a calsequestrin /CS/ és a Ca^{2+} -t magas affinitással kötő fehérje /High Affinity Calcium Binding Protein - HACBP/

Mint említettem, a Ca^{2+} SR membránon keresztüli transzportját a Ca^{2+} -transzport ATP-áz enzim végzi. Ennek a transzport folyamatnak a mechanizmusa lényegében tisztázott. A Ca^{2+} aktiv transzlokációja sztöchiometrikus kapcsolatban van az ATP hidrolizisével. Minden ATP mole-

kula hidrolizisekor 2 atom kalcium helyeződik át a membránon. Az ATP hidrolizise a Ca^{2+} -transzport ATP-áz által történik, egy foszforilált fehérje kialakításával egyidőben. A folyamat a következő lépésekből áll:



A foszfoprotein kialakulása a mikroszómák külső felületén történik /1-3. lépés/, amelyet egy izomer átalakulás és egyidejűleg a Ca^{2+} -nak a membrán belső oldalára való jutása követ /4. lépés/. A foszfoprotein hidrolizise együtt jár a Ca^{2+} felszabadulásával a membrán belső felszínén /5. lépés/, ezt követően pedig a karrier molekula visszanyeri eredeti konformációját

/6. lépés/, /Degani C., Boyer P., 1973./.

Az SR Ca-pumpa fehérjének a szerkezetét és funkcióját kutatva, Ikemoto a Ca^{2+} -ATP-áz fehérje három konformációs állapotát különbözteti meg /N.

Ikemoto; közlés alatt/.

Az un. alap állapot Ca^{2+} hiányában figyelhető meg, valamint létezik egy Ca és egy Mg-állapot.

Az enzim e két utóbbi állapota abban különbözik egymástól, hogy a Ca-állapotban az enzim valamilyen fém. ATP komplexszel foszfoenzimet /EP/ képes kialakítani. A Mg-állapotban az enzim anorganikus foszfáttal / P_i / tud EP-t kialakítani.

Az enzimvizsgálatok eddigi eredményei alapján az enzim a Ca-állapotban található a membránban. A fém ATP indukálta reakcióban a Ca-állapot "átváltozik" Mg-állapottá úgy, hogy közben több EP intermedier képződik.

A Mg-állapot kialakítható közvetlenül is az alap-állapotból magas Mg^{2+} koncentráció /20mM/ jelenlétében, Ca^{2+} hiányában.

A fém.ATP jelenlétében az ATP γ -foszfátja épül be a Ca^{2+} -ATP-ázba és egy "acid stabil" EP képződik.

A Ca^{2+} -ATP-áz számára a szubsztrát a Mg•ATP.

Ezt Yamada és munkatársai vizsgálatai is alátámasztják, melyek szerint a Ca^{2+} -ATP-áz aktivitás és az EP képződés elsősorban Mg•ATP függő és nem ATP függő /S.Yamada et al. 1980./.

A kalcium kötődésének mechanizmusa

Minden Ca^{2+} -ATP-áz fehérjén két Ca-kötő vagy transzport hely és egy ATP-kötő hely van /Chevallier J., Butow R.A. 1971., Ikemoto N. 1975., Meissner G. 1973./.

A Ca^{2+} két lépésben kötődik az enzimhez:

- 1./ első lépésben egy Ca^{2+} gyorsan, alacsonyabb affinitással kötődik,
- 2./ majd egy másik Ca^{2+} az előzőnél lassabban, magasabb affinitással kötődik.

A kötődés mechanizmusa szorosan összefügg a Ca^{2+} -ATP-áz oligomér sajátosságával. Feltételezhető, hogy az első Ca^{2+} kötődése konformációs változást indukál a fehérje egyik alegységén, mely változás hatással van egy másik alegységre, amelyben szintén konformáció változás következik be.

Az eddigi vizsgálatokból kitűnik tehát, hogy az enzimatis aktivitás két fő lépésre osztható: az ATP-áz fehérje foszforilációjára és defoszforilációjára. A foszforilációhoz Ca jelenléte szükséges, kb. $0,3 \mu\text{M}$ koncentrációban /D.H.MacLennan, 1975/. A defoszforiláció Mg dependens.

MacLennan és munkatársai /P.S.Stewart, D.H. MacLennan, 1976/ az ATP függő kation transzport tanulmányozásához az ATP-áz molekulát tripszines kezelésnek vetették alá.

Az 1 M szukrózt tartalmazó közegben végzett tripszines emésztés eredményeként két fragmentumot kaptak. Egy 55 000 és egy 45 000 mólsúlyút, melyeket Sephadex és hidroxilapatit oszlopon izolálni is tudtak SDS jelenlétében.

Az 55 000 mólsúlyú töredék 50-50%-ban tartalmaz poláros és nem poláros aminosavakat.

A 45 000 mólsúlyú töredék 60%-ban nem poláros aminosavakat tartalmaz. Ez a fragmentum tehát több hidrofób komponenszt tartalmaz, s így nagyobb mértékben kapcsolódik az SR membrán hidrofób területeivel, a foszfolipid kettős-réteggel, s abba besüllyed.

Az 55 000-es fragmentum is kapcsolódik a foszfolipidekhez vagy közvetlenül, vagy a 45 000-es fragmentummal létesített diszulfidhidakon keresztül.

Az 55 000-es fragmentum további tripszines emésztés hatására egy 30 000 és egy 20 000 mólsúlyú fragmentumra hasad. Hasonló megállapításokra jutott Inesi és Scales is /Inesi G., Scales D. 1974., MacLennan D.H., Campbell K.P. 1979./.

További vizsgálataikkal kimutatták, hogy az ATP hidrolizis helye az 55 000 mólsúlyú fragmentumon van /Green N.M. et al. 1980/. Az ionofor aktivitás az 55 000 és 20 000 mólsúlyú fragmentumokhoz tartozik.

A Ca^{2+} kötődésének és transzportjának a helyét Pick és Racker határozták meg /Pick U., Racker E. 1979/ diciklohexil-karbodiimidde /DCCD/ végzett kísérletekben.



Megállapították, hogy a DCCD az SR Ca^{2+} -ATP-áz fehérjével kovalensen kötődik, s gátolja a Ca^{2+} -ATP-áz aktivitást, a Ca^{2+} -felvételt és a Ca^{2+} kötődését. A gátlás Ca^{2+} -mal felfüggeszthető, ami a Ca^{2+} és a DCCD között fennálló kompetícióra utal. A $[\text{C}^{14}]$ DCCD a Ca^{2+} -ATP-áz fehérje tripszines emésztése után a 20 000 daltonos fragmentumban volt kimutatható, ami bizonyította, hogy a Ca^{2+} -kötés és transzport helye ezen a fragmentumon található.

I.5.12. A kalcium-kötő fehérjék

Az SR membrán fehérjéinek egyik csoportját képezik a vizoldékony, extrinszik fehérjék. Ezek izolálhatók alacsony koncentrációjú dezoxikolsav /DOC/ és só mellett /0,1 mg DOC/mg fehérje, 1 M KCl/. Frakcionálásuk DEAE-cellulóz oszlopon, só gradienst /0,0-0,7 M KCl/ alkalmazva valósítható meg. /Ikemoto et al. 1974./:

0,33 M-nál egy 55 000 mólsúlyú fehérje izolálható - a HACBP /High Affinity Calcium Binding Protein/ /Ostwald T.S. and D.H. MacLennan 1974./

0,5 M-nál egy 45 000 mólsúlyú fehérje izolálható, mely a calsequestrin /CS/. Ezen fehérjék aminosav összetétele is ismert /D.H. MacLennan, P.T.S. Wong 1971., Ikemoto et al. 1971./

A HACBP-t felépítő aminosavak 32%-a savanyú karakterű, a bázikus aminosavak 13%-ban vannak jelen.

A fehérje 25 mol/mol Ca^{2+} -ot képes megkötni /460 nmol/mg fehérje/ 10^{-4} nagyságrendű disszociációs konstanssal / K_d /, 5 mM Trisz jelenlétében. Ugyanezek az adatok izotóniás KCl jelenlétében a következőképpen változnak meg: a Ca^{2+} -kötés értéke 0,85-1,05 mol/mol, a $K_d = 2,8-4,2 \times 10^{-6}$ M. Kísérletekben a Ca^{2+} -transzport a HACBP hatására megemelkedett, ami azáltal lehetséges, hogy a fehérje résztvesz a transzportfolyamatban.

A calsequestrin 37%-ban tartalmaz savanyú aminosavakat, főleg Glu-at és Asp-at. A bázikus aminosavak közül főleg a Lys és az Arg található meg mintegy 8%-ban.

A fehérje Ca^{2+} -kötése 43 mol/mol /970 nmol/mg fehérje/. A $K_d = 50 \mu\text{M}$ 5 mM Trisz-ben. Izotóniás KCl jelenlétében a Ca^{2+} -kötés 970 nmol/mg fehérje értéke nem változik, de a $K_d = 800 \mu\text{M}$.

A kétértékű kationok befolyásolják a Ca^{2+} kötődését; 0,1 mM Ca^{2+} és 0,1 mM Mg^{2+} jelenlétében a Ca^{2+} -kötődés 20%-kal csökken.

Ha a Ca^{2+} koncentráció 0,1 mM-nál nagyobb, a maximumisan kötött Ca^{2+} mennyisége 800 nmol/mg fehérje. Ilyenkor a fehérje oldhatatlan lesz, feltehetően a Ca^{2+} és a fehérjemolekula között kialakuló kötések

miatt. Ez felhígítással vagy dialízissel megszüntethető.

A Ca^{2+} kötődése pH 7,5 alatt alacsonyabb, ugyanakkor csökken az ATP energiáját felhasználó Ca^{2+} transzport is. Ez az állapot feltételezhetően növeli a Ca^{2+} SR-ből való felszabadulását.

A calsequestrin csak az izomszövet SR-ében fordul elő. A fehérje 1 M KCl jelenlétében DOC-tal való szolubilizálhatósága arra utal, hogy hidrofób kötésekkel kapcsolódik az SR-hez.

A két Ca^{2+} -kötő fehérje tulajdonságait összegezve megállapíthatjuk, hogy a calsequestrin a Ca^{2+} -ot közepes affinitással és magas kapacitással köti.

A HACBP, mint arra a neve is utal, a Ca^{2+} -ot magas affinitással köti. Ezek a fehérjék valószínűleg a membrán foszfolipidjeihez kötődnek kétértékű sóhidakon keresztül.

Meissner és Fleischer megállapították, hogy ha az SR membrán foszfolipidjeit foszfolipázos emésztésnek vetették alá, melynek során a foszfolipidek 80%-át elmozdították, a calsequestrin eltűnt a membrán-preparátumból /Meissner G., Fleischer S. 1972./. Más szerzők szerint a calsequestrin a membránban oldhatatlan Ca^{2+} -komplekként van jelen /Ikemoto N. 1972./.

Ikemoto és mtsai fluoreszcens és spektrum abszorpciós vizsgálataik alapján megállapították, hogy a calsequestrin szerkezete igen nagy változáson megy keresztül a Ca kötődésekor. Kalcium hiányában a fehérje "felcsavarodott" strukturájú, a kalcium kötődése után helikális szerkezetűvé válik.

I.5.2. A szarkoplazmatikus retikulum lipidjei

Az SR membrán szerkezetének kialakításában is igen fontos a lipidek részvétele. A kialakult szerkezetben a fehérje/lipid arány magasabb mint más membránok, pl. a mielin esetében.

Inesi vizsgálatai szerint a fehérjék a membrán száraz súlyának 54-71 %-át adják /Inesi G. et al.1964./.

A lipidek az SR membrán száraz súlyának 22-45 %-át képezik /Martonosi A. 1964./.

Meissner és Fleischer részletesen vizsgálták a nyúl harántcsikolt izom SR-ének lipid összetételét /G.Meissner, S.Fleischer 1971./.

A vezikulák kb. 0,65 mg lipidet tartalmaznak mg membránfehérjéenként. Az SR membrán általános tulajdonsága a szarkolemmával összehasonlítva, hogy alacsony a neutrális lipid tartalma és magasabb a telítetlen zsírsavak mennyisége /Fiehn W. et al. 1971./.

A foszfolipidek aránya 93%, a neutrális lipideké 7%. A neutrális lipidösszetétel viszonylag egyszerű. Fő komponensei a trigliceridek a koleszterin és a szabad zsírsavak /60-25-15% súlyra/. Az SR membrán lipidösszetétele nem állandó, hanem változik a fejlődés alatt. A változás jellegzetesége, hogy folyamatosan csökken a neutrális lipid és foszfolipid tartalom. Így a fejlődés folyamán csökken a totál foszfolipid/fehérje arány /E.Zubrzycka-Gaarn, M.G.Sarzala 1980./.

Azt is kimutatták, hogy bár a foszfolipid tartalom és összetétel az SR membránban eltérő a fejlődés korai állapotában, a lipid kettős-réteg fluiditása meglehetősen állandó.

Meissner és Fleischer eredményei felnőtt nyulak SR membrán lipidösszetételére vonatkoznak /G.Meissner, S.Fleischer 1971./.

A foszfolipidek közül a legnagyobb mennyiségben a foszfatidil-kolin /PC/ van jelen, a totál foszfolipidnek mintegy 73%-át alkotja. A többi foszfolipid már kisebb mennyiségben található.

A foszfatidil-etanolamin /PE/ 13%-ban, a foszfatidil-inozitol /PI/ kb. 8-9%-ban, a foszfatidil-szerin /PS/ 1-2%-ban. Ugyancsak lipid komponens a szfingomielin /SP/, a kardiolipin és a foszfatidsav is.

A foszfatidsav fontos intermedier a membrán neut-

rális- és foszfolipidjeinek szintézisében. A koleszterin és neutrális lipidek membránból történő kivonása nem befolyásolja az SR Ca^{2+} -ATP-áz aktivitását /Drabikowski W. et al. 1972./.

A foszfolipidek jelenléte nélkülözhetetlen a Ca^{2+} -transzport ATP-áz enzim működéséhez. Mesterséges membránokkal végzett kísérletekben megállapították, hogy a foszfatidil-kolin egyedül elég az ATP-áz aktivitás kiváltásához /M.Tada et al. 1978., Meissner G., Fleischer S. 1972./.

A kalcium transzport maximális aktivitásának kiváltásához foszfatidil-etanolamin jelenléte is szükséges.

A natív SR membránban kb. 90 lipidmolekula aszociálódik minden ATP-ázzal és kb. 30 molekula az, ami közvetlenül kapcsolódik ezzel a fehérjével /un. lipid-gyűrű/. Ebben a lipid gyűrűben koleszterin nem található /Warren G.B. et al. 1975./.

A többi lipidmolekula a lipid kettős-réteg kialakításában vesz részt /T.R.Hesketh et al. 1976., Scales D., Inesi G. 1976./.

Több szerző foglalkozott a lipidek SR membránon belüli eloszlásával /Hasselbach W., Migala A. 1975., Hidalgo C. and Ikemoto N. 1977., Sarzala M.G. and Michalak M. 1978./.

Megállapították, hogy a foszfatidil-etanolamin - mint az SR membránban egyik legnagyobb mennyiségben jelenlévő aminofoszfolipid - és a foszfatidil szerin a lipid

kettős-réteg külső felén helyezkedik el. A foszfatidil kolin kb. egyenlő arányban oszlik el a kettős réteg külső és belső felén.

Az alacsony koleszterin tartalom, a zsírsavláncok telítetlen kötéseire arra utalnak, hogy az SR egy viszonylag fluid membrán.

I.6. A szarkoplazmatikus retikulum sajátosságai a különböző rosttípusú izmokban

Az irodalmak nem tesznek éles különbséget a különböző rosttípusú izmok SR-ének sajátosságai között. Vizsgálataink alapján azonban a következő néhány különbség figyelhető meg a tónusos és tetanikus rostok SR-je között.

- 1./ A tónusos izomrostok szarkoplazmatikus retikuluma kevésbé fejlett, mint a tetanikus rostokat tartalmazó izmoké.
- 2./ A tetanikus izomrostok szarkoplazmatikus retikulumának Ca^{2+} felvevő kapacitása magasabb /kb. 5-ször/, mint a tónusos izomrostoké.
- 3./ A gyors rostok SR-ének Ca^{2+} -ATP-áz aktivitása /kb. 5-ször/ magasabb mint a lassú rostoké.
- 4./ Gyors rostok SR-ében a Ca^{2+} -ATP-áz a membrán fehérjéinek 60-70%-át adja, lassú rostokban pedig 40-50%-át.

II. K I S É R L E T E S R É S Z

Kísérleteinkben Uj-Zélandi, fehér, him nyulak jobb hátsó lábát nyújtott állapotban begipszeltük 1-2-4 és 6 hétre. Ebben a tartásban a gipszelt izmok eredeti funkciójukat nem képesek ellátni, s a csökkent igénybevétel miatt az izmok atrofizálódnak.

Az atrófia mértéke különböző a fehér /m. gastrocnemius/ és a vörös /m. soleus/ izomrostokban. Míg az előbbi izom esetén a súlycsökkenés összízomra vonatkoztatva 20-30 %-os a kontrollhoz képest, a vörös izomnál 50-60 %-os a súlycsökkenés. Tehát a m. soleusban - tónusos izom - az atrófia nagyobb mértékű. /F. Guba et al. 1977./.

A súlycsökkenés a legkifejezettebb az immobilizálás első két hetében mindkét izomtípusnál.

A gipszkötés eltávolítása után dekapitáltuk a nyulakat, majd kivérettük. Ezt követően kivettük a musculus gastrocnemiumot és musculus soleumot, s azonnal hűtöttük jég között. Az állatok levágása és az izmok kivétele között kb. 1,5 - 2 perc telt el.

II.1. A szarkoplazmatikus retikulum preparálása

A preparálásokat 2-3°C-os hőmérsékleten végeztük /G. Meissner, S.Fleischer 1971. módosított módszere alapján/. Amikor a jég közé helyezett izmok megfelelő mértékben lehültek, mindkét típusú izmot megtisztítottuk a kötőszövetes és egyéb részekről. Az izmokat ollóval tovább aprítottuk. Súlyukat mértük és súlyra számított 5 vol. homogenizáló oldatba helyeztük.

A homogenizálást MSE típusú késes homogenizálóval végeztük, 2-szer 20 sec-os időtartamig, 5 sec-os szünettel /a felmelegedés megelőzése miatt/, a maximális fordulatszám felével, ami kb. 8000 fordulat/percnek felel meg.

A homogenizátumot centrifugáltuk 900 g-n, 10 percig /sejtmag, sejttöredék eltávolítása/ K-24 típusú Janetzki hűthető centrifuga segítségével. A kapott felülúszót tovább centrifugáltuk 9000 g-n 10 percig /mitokondriumok eltávolítása/. Az így nyert felülúszót 4 réteg, a homogenizáló oldattal előre átitatott gézen szűrtük, s a szűrletet 40.000 g-n centrifugáltuk 50 percig /Beckman L5-50 típusu centrifugában/.

Az üledéket reszuszpendáltuk 0,3 M szukrózt és 2,5 mM HEPES-t tartalmazó pH 7,4-es oldatban. Ez volt a nyers SR frakció. A preparálás menete ezen lépésig megegyezett a gástronemius és soleus izmok esetében.

A soleust nem tisztítottuk tovább tekintettel az immobilizálás utáni kis kiindulási mennyiségekre.

A gastrocnemiusból ily módon nyert preparátumot tovább tisztítottuk lineáris szukróz gradiensen. A gradiens oldatok 0,25 M és 2 M szukrózt tartalmaztak, valamint 5 mM HEPES-t és 1 mM EDTA-t /pH 7/. A gradiens tetejére rétegeztük a gastrocnemius izomból kapott nyers SR frakciót.

2500 g-n 90 percen át tartó centrifugálás után /lengőfejes rotor/ két réteg különült el a gradiensben. Az egyik réteg nem penetrált a gradiensbe, ez volt a tisztított SR frakció.

A nem penetráló részt pipettával leszívtuk és tovább centrifugáltuk 90 000 g-n 60 percig /Beckman L5-50 centrifuga/.

Az üledéket reszuszpendáltuk 2,5 mM HEPES-t és 0,25 M szukrózt tartalmazó oldatban /pH 7,4/. A preparátumot további vizsgálatokhoz 2-3 órán belül felhasználtuk.

II. 2. Fehérjemeghatározás

Fehérjemeghatározást végeztünk módosított Folin módszerrel /Lowry O.H. 1978./. A fehérjemeg-

határozáshoz használt oldatok és összetételük a következő volt:

"A" oldat: 0,2 g nátrium-tartarát, 10 g nátrium-karbonát oldva 55 ml 1 N nátrium-hidroxidban, majd desztillált vízzel 100 ml-re töltve.

"B" oldat: 2 g nátrium-tartarát, 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oldva 90 ml desztillált vízben, majd hozzáadva 10 ml 1 N nátrium-hidroxid.

"C" oldat: Folin-reagens és desztillált víz 1:2 arányú elegye, mely mérés előtt frissen készül.

"D" oldat: 5 g nátrium-dodecilszulfát /SDS/ 90 ml 0,5 N nátrium-hidroxidban oldva 60°C-on lassú keverés mellett, majd lehütve szobahőmérsékletre 100 ml-re töltve 0,5 N nátrium-hidroxiddal.

A mérés kivitelezése

Minta:	mérendő fehérje /ul/ + deszt.viz	200 ul
	"D" oldat	400 ul
	2N nátrium-hidroxid	400 ul
	"A" oldat	720 ul

összerázva, 30' inkubálás 28°C-os viz-
fürdőn

"B" oldat 80 ul

összerázva, 20' inkubálás 28°C-os viz-
fürdőn

"C" oldat 2x120 ul

összerázva, 30' inkubálás 28°C-os viz-
fürdőn

Fotometrázás: 750 nm-en

Kontroll minta: desztillált víz 200 ul

a többi reagens és az összemérés sor-

rendje megegyezett a mintánál leirtakkal.

A fehérjetartalmat marha szérum albuminnal, ugyanezen
kísérleti körülmények között készített kalibrációs
görbéről olvastuk le.

A kontroll és immobilizált izmokból nyert SR
preparátumok "jóságát" különböző biokémia vizsgálá-
tokkal és elektronmikroszkópos vizsgálattal ellen-
őriztük.

II. 3. Az SR preparátumok tisztaságának ellenőrzése

Az SR preparátumaink más membrántöredékekkel
/szarkolemma, mitokondrium/, miofibrilláris fehér-

jékkal való "szennyezettségét" elektronmikroszkópos és biokémiai vizsgálatokkal ellenőriztük.

II.3.1. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A mintákat negatív festési eljárással preparáltuk szenezett és ionbombázott formvar hártýára. A fixálás 2%-os glutáraldehiddel, a festés 2%-os uranilacetáttal történt.

II.3.2. Szarkolemmális marker enzimek vizsgálata

A $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATP-áz aktivitást közvetett úton határoztuk meg /Matsui and Schwartz 1966./.

Mértük a $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -ionok aktiválta ATP-áz aktivitást / $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -ATP-áz/, majd ugyanilyen feltételek mellett a ouabainnal /Strophantin G/ való gátolhatóság mértékét.

A ouabain a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATP-áz működését specifikusan gátolja. A ouabain jelenlétében mért aktivitás elvileg megegyezik a csak Mg^{2+} jelenlétében mért ATP-áz aktivitással. Mértük a szarkolemma Mg^{2+} -ATP-áz aktivitását is. A $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -ATP-áz enzimaktivitás értékek és a ouabainnal gátolt



ATP-áz aktivitás értékek különbsége adja a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATP-áz enzimaktivitás értékét.

1./ A $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ - ATP-áz aktivitás méréséhez
használt reakciókeverék összetétele

50 mM-os Trisz-ben oldva: 4 mM MgCl_2
 100 mM NaCl
 10 mM KCl
 2 mM EDTA-sav pH 7,4

A mérés kivitelezése

1 ml fenti reakciókeverék
0,3 ml deszt.viz + fehérje /0,050-0,100 mg/
3' előinkubálás 37°C -on, majd a
reakció indítása

0,4 ml 20 mM-os Trisz-ATP hozzáadásával
10' inkubálás 37°C -on, majd a
reakció leállítás

2 ml 10% TCA /triklórecetsav/ hozzáadásával,
szűrés redős szűrőn.

A szűrletből az enzim által lehasított anorgani-
kus foszfátot határoztuk meg. /Eibl, H. 1969./

Minta összetétele:

0,2 ml szűrlet

5,0 ml desztillált víz

0,2 ml 0,375%-os Triton X-100

0,6 ml 2,5%-os kénsavas ammónium
molibdát

jól összerázva, fotometráls 30 per-
cen belül 660 nm-en.

A további enzimaktivitás méréseknél alkalmazott anorganikus foszfát meghatározási módszer mindig megegyezett az előbb leírtakkal.

A 2,5%-os kénsavas ammónium molibdát oldat
összetétele:

12,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oldva hűtés közben
80,1 ml konc. H_2SO_4 -ban, majd 500 ml-re
töltve hűtött desztillált vízzel.

2./ A ouabainnal való gátolhatóság mérése

1 ml $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -ATP-ázhoz való reakciókeverék

0,3 ml deszt.viz + fehérje /0,050-0,100 mg/

0,2 ml 10^{-3} M-os ouabain

3' előinkubálás 37°C -on,

továbbiakban a mérés megegyezett a $\text{Na}^+ + \text{K}^+ +$

Mg^{2+} -ATP-áz aktivitás mérésénél alkalmazott módszerrel az anorganikus foszfát meghatározására vonatkozóan is.

3. A Mg^{2+} + ATP-áz aktivitás méréséhez használt reakciókeverék összetétele:

50 mM-os Trisz-ben oldva: 2 mM EDTA-sav

4 mM MgCl_2 pH 7,4

A mérés kivitelezése

1 ml fenti reakciókeverékhez ugyanabban a sorrendben ugyanazokat a komponenseket hozzáadjuk, mint a $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -ATP-áz aktivitás mérésnél.

Kontroll minták

az egyes reakciókeverékek ATP-t ill. fehérjét nem tartalmazó szűrleteiből anorganikus foszfátot határoztunk meg.

II.3.3. Mitokondriális szennyezettség ellenőrzése

Vizsgálataink során nem mértünk közvetlenül mitokondriális marker enzimaktivitásokat. Méréseink során a nátrium-azid / NaN_3 / azon sajátosságát használtuk fel, hogy gátolja a mitokondriális Ca^{2+} -ATP-áz működését, de nem befolyásolja az SR Ca^{2+} -ATP-ázának aktivitását /A.M.Katz, 1970/.

Ca^{2+} -ATP-áz aktivitást mértük Ca^{2+} , majd $\text{Ca}^{2+} + \text{NaN}_3$, valamint EGTA+ NaN_3 jelenlétében. A Ca^{2+} jelenlétében mért ATP-áz aktivitás értékéből levonva a $\text{Ca}^{2+} + \text{NaN}_3$ jelenlétében mért ATP-áz aktivitás értékét, megkaptuk a mitokondriális Ca^{2+} -ATP-áz aktivitást. Mivel a NaN_3 gátolja a mitokondriális Ca^{2+} -ATP-ázt /azid-szenzitiv ATP-áz/ a kapott különbség arra adott felvilágosítást, hogy az SR preparátumunk mennyire volt szennyezett mitokondriális membrántöredékekkel.

A $\text{Ca}^{2+} + \text{NaN}_3$, valamint az EGTA+ NaN_3 jelenlétében mért ATP-áz aktivitás különbsége az SR saját Ca^{2+} -ATP-áz aktivitását adta /azid inszenzitiv Ca^{2+} -ATP-áz/.

Az enzimaktivitás mérésekhez használt reakciókeverékek összetétele:

I.	0,1 mM	CaCl_2	
	0,12 M	NaCl	
	19 mM	hisztidin	
	5 mM	NaN_3	pH 7

II.	1,0 mM	EGTA	
	0,12 M	NaCl	
	19 mM	hisztidin	
	5 mM	NaN ₃	pH 7
III.	0,1 mM	CaCl ₂	
	0,12 M	NaCl	
	19 mM	hisztidin	pH 7

A mérés kivitelezése

1-1 ml az I., II., III. reakciókeverékből
0,6 ml deszt.viz + fehérje /0,060-0,100 mg/
3' előinkubálás 37°C-on, majd a
reakció indítása

0,4 ml 20 mM-os ATP hozzáadásával
10' inkubálás 37°C-on, majd
a reakció leállítása

2 ml 10%-os TCA hozzáadásával
szűrés redős szűrőn, hűtés jég között

A szűrletből anorganikus foszfáttartalmat ha-
tároztunk meg.

Kontroll minták

az egyes reakciókeverékek ATP-t ill. fehérjét
nem tartalmazó szűrleteiből anorganikus fosz-
fátot határoztunk meg.

A foszfortartalmat minden esetben 10^{-4} M NaH_2PO_4 -tal készített kalibrációs görbéről olvastuk le. A specifikus aktivitásokat a következő összefüggés alapján számoltuk:

$$\frac{4 \cdot \text{össz } P_i}{\text{P atom-} \cdot \text{inkubálá-} \cdot \text{bemért}} = \frac{\mu\text{MP}_i / \text{mg}}{\text{súly} \cdot \text{si idő} \cdot \text{fehérje}} \quad \text{/mg/} \quad \text{fehérje/} \quad \text{perc}$$

II.4. Az SR funkciójának biokémiai vizsgálata

II.4.1. Ca-45 felvétel

Az SR vezikulák Ca-felvevő képességét izotópos, membránszűrési technikával ellenőriztük /G.Meissner and S.Fleischer 1971/.

Ezekből a vizsgálatokból arra kaptunk választ, hogy az SR Ca^{2+} -ATP-áz enzime milyen mértékben képes a közegből felvenni a jelzett Ca^{2+} -ionokat, s a felvett Ca^{2+} -ionokat a vezikulák mennyire képesek megtartani.

A méréshez használt reakciókeverék összetétele

0,1 M KCl

5 mM MgCl_2

0,1 mM Ca-45 /⁴⁵CaCl₂/
5 mM K-oxalát
10 mM hisztidin pH 7,3

A bemért fehérjemennyiség 0,060-0,100 mg volt.

A reakciót 5 mM ATP hozzáadásával indítottuk,
a mérés 23°C-on történt, 6 perc időtartamig.

A reakciót a közeg millipor membránon való átszűrésével állítottuk le /SYNPOR Membranfilter, 25 mm ø, 40 Å, Chemapol Praha/.

A szűrletekben a vezikulák által meg nem kötött Ca-45 rádióaktivitását mértük, szcintillációs módszerrel, a következő módon:

0,2 ml szűrlet
4 ml koktél
4 ml absz.alkohol szcintillációs

küvettában összemérve. A rádióaktivitást egy perc időtartamig mértük Packard szcintillációs számlálóban.

A koktél összetétele

60 g naftalin
4,2 g 2,5-difeniloxazol /PPO/
180 g 1-4 bis-/2-/5-feniloxazoil
benzin /POPOP/
70 ml desztillált víz
900 ml dioxán vagy toluol

A kontroll minták fehérjét nem tartalmaztak.

II.4.2. Az SR marker enzimeinek vizsgálata

Az SR-ben a legnagyobb mólsúlyú integráns fehérje a Ca-pumpa fehérje, mely a Ca^{2+} -ionokat transzportálja. A transzport energiaigényes, ATP felhasználásával megy végbe.

A Ca^{2+} -transzport ATP-áz aktivitás közvetlenül nem mérhető, biokémiai vizsgálatokban a mérés közvetett úton történik /M.G.Sarzala et al. 1975./. Mérhető egy össz / $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ /-ATP-áz aktivitás, Ca^{2+} és Mg^{2+} -ionok jelenlétében.

Mg^{2+} -ionok jelenlétében, Ca^{2+} -ionok hiányában egy alap / Mg^{2+} /-ATP-áz aktivitás mérhető.

A két aktivitás, a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependens /össz-ATP-áz/ és a Ca^{2+} -independens, Mg^{2+} -dependens /alap ATP-áz/ aktivitás számtani különbsége adja az extra / Ca^{2+} /- ATP-áz aktivitás értékét.

Az össz-ATP-áz aktivitás méréséhez használt reakciókeverék összetétele a következő /F.A. Sréter, 1975/:

0,1 M KCl

10 mM hisztidin

5 mM MgCl_2

5 mM K-oxalát
0,5mM EGTA
0,45 mM CaCl₂ pH 7,2

A mérés kivitelezése

1 ml fenti reakciókeverék
0,6 ml deszt.viz + fehérje /0,060-0,100 mg/
3' előinkubálás 37° C-on, majd
a reakció indítása

0,4 ml 20 mM-os ATP hozzáadásával
5' inkubálás 37°C-on, majd
a reakció leállítása

2 ml 10%-os TCA hozzáadásával,
szűrés redős szűrőn, hűtés jég között

A szűrletből az enzim által lehasított
anorganikus foszfátot határoztuk meg.

Az alap /Mg/ ATP-áz aktivitás méréséhez használt
reakciókeverék összetétele

0,1 M KCl
10 mM hisztidin
5 mM MgCl₂
5 mM K-oxalát
0,5 mM EGTA pH 7,2

A mérés kivitelezése

1 ml fenti reakciókeveréket használva a kísérleti körülmények megegyeztek az össz-ATP-áznál leirtakkal.

A szűrletből anorganikus foszfátot határoztunk meg.

Kontroll minták

az egyes reakciókeverékek ATP-t ill. fehérjét nem tartalmazó szűrleteiből anorganikus foszfátot határoztunk meg.

II.5. Az SR preparátumok fehérjéinek gélelektroforitikus vizsgálata

A kontroll és immobilizált izmokból preparált SR vezikulák fehérjeösszetételét poliakrilamid gél-elektroforézissal /PAGE/ vizsgáltuk /Weber et al. 1969./.

A fehérjéket 7,5%-os akrilamid gélen választottuk szét, foszfát pufferban.

A gél összetétele

18 ml 50%-os akrilamid oldat
60 ml foszfát törzspuffer
6 ml 15%-cs ammonium-peroxi-diszulfát
0,24 ml TEMED /tetrametil-etiléndiamin/
36 ml desztillált víz

50%-cs akrilamid oldat

50 g akrilamid
1,33 g bis-akrilamid
100 ml vízben enyhe melegítés közben oldva

Foszfát törzspuffer összetétele

9,1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
61,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
2 g SDS
1000 ml vízben oldva pH 7

Elektródpuffer összetétele

kétszeresre hígított foszfát törzspuffer

A fehérjemintákat futtatás előtt 5 percen át inkubáltuk forrásban lévő vízfürdőn, a következő összetételű oldatban:

0,5 ml foszfát törzspuffer
10 ml deszt.viz
1 g SDS
0,2 ml β -merkaptoetanol
10 mg brómfenolkék- jelzőfesték
20 ml-re kiegészítve glicerinnel

A fehérjemintát a szolubilizáló oldattal 1:3 térfogatarányban elegyítettük.

A géllapok mérete: 3 mm x 26 cm x 14 cm

Az egyes pályákra felvitt fehérjemennyiség 100 μ g volt. Az elektroforezist 400 mA áramerősségen indítottuk, 10 perc után, mely idő alatt a fehérje bekoncentráldott, majd az áramerősséget 420 mA-re emeltük.

Az elektroforezist akkor állítottuk le, amikor a jelzőfesték 10 cm-re behatolt a gélbe. Elektroforezis után a géllapokat fixáltuk egy órán át.



A fixáló oldat összetétele

227 ml metanol
47 ml konc. ecetsav
226 ml deszt. viz

Fixálás után a géleket festettük két órán át 0,05%-os Coomassie kék oldatban.

Az oldat összetétele

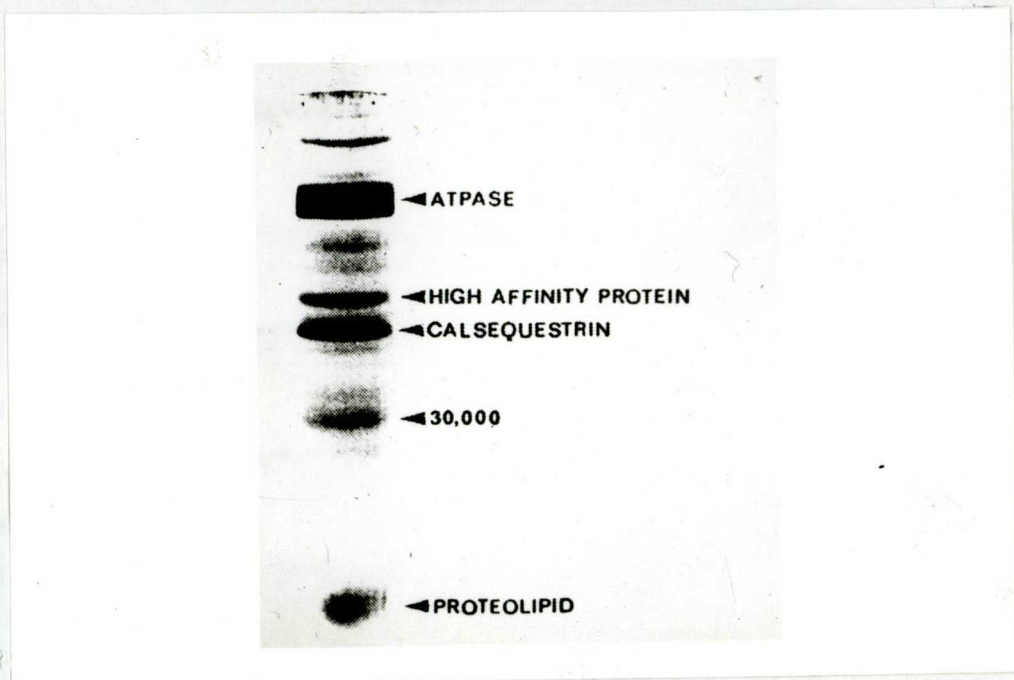
227 ml metanol
47 ml konc. ecetsav
226 ml deszt.viz
összeöntés után 0,25 g Coomassie B festék oldva

Festés során a festékanyag irreverzibilisen kötődik a fehérjékhez, a gél által megkötött festék pedig kimosható.

A mosó oldat összetétele

50 ml metanol
75 ml konc. ecetsav
875 ml deszt.viz

A gélben a fehérjemegoszlást Kipp and Zonen denzitométerrel értékeltük, sárga szinszűrővel.



1. ábra

Nyúl harántcsikolt izom SR-jének gélelektroforetikus képe /D.H.MacLennan, P.C.Holland 1975./

II. 6. Az SR preparátumok lipid összetételének vizsgálata

II. 6.1. Lipidek extrahálása

Az SR preparátumaink lipidtartalmát J. Folch és J.T.Dodge szerint extraháltuk /J.Folch 1957., J.T. Dodge 1963./.

Az SR membrán szuszpenziót ötszörös térfogat metanollal majd ezt követően kloroformmal extraháltuk, háromszor egymást követően. Az összegyűjtött extraktumokat 35^oC-on vákuum alatt bepároltuk. A közel szárazra párolt anyagot

újra extraháltuk kloroform-metanol /2:1/ elegyében, majd 0,75 vol. 0,1 N KCl-ot adtunk a rendszerhez. Hűtve, egy éjszakán át a fázisok jól elkülönültek. Az alsó, kloroformos fázis tartalmazta a lipideket.

Az extraktumból koleszterin- és foszfolipidtartalmat határoztunk meg.

II. 6.2. Koleszterintartalom meghatározása

A meghatározást Churcaine és Zlatkis módszere alapján végeztük /Churcaine A.J. et al. 1959., Zlatkis A.B. et al. 1963./.

A mérések kivitelezése

Minta összetétele

0,5 ml /lipid kivonat + konc. ecetsav/
6 ml konc. ecetsav, jól összekeverjük,
4 ml hígított color reagens, ismét jól összekeverjük és hűlni hagyjuk.

Fotometráálás 10 perc után 550 nm-en.

Kontroll minta

0,5 ml konc. ecetsav lipid kivonat nélkül
A mérés további menete megegyezik a mintánál leírt kísérleti feltételekkel.

A méréshez használt reagensek összetétele a következő

Ferri-klorid törzsoldat

2,5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oldva 85%-os H_3PO_4 -ban
100 ml végtérfogatban

Color reagens

4 ml ferri-klorid törzsoldat 50 ml-re
higitva konc. H_2SO_4 -val.

II.6.3. A foszfolipidek frakcionálása

A foszfolipideket kétdimenziós vékonyréteg-kromatográfiás technikával választottuk szét, szilikagél lapokon /Merck DC Fertigplatten, Kieselgel 60/ Rouser metodikája alapján /Rouser et al. 1966./. A vékonyréteg lapokat futtatás előtt félórát aktiváltuk 120°C -on.

A futtatandó mintákat az első dimenzióknak megfelelő jobb alsó sarokba csöppentettük részletenként, állandó szárítás közben úgy, hogy a startponton a folt átmérője 0,3-0,4 cm-nél ne legyen nagyobb.

A futtató elegyek összetétele

1. dimenzió

kloroform : metanol : 28%-os ammónium hidroxid
65 : 25 : 5 /v/v/v/

2. dimenzió

kloroform : aceton : metanol : ecetsav : viz
30 : 40 : 10 : 10 : 5 /v/v/v/v/v/

A futtatókádakba 200 ml-nyi futtató elegyet tettünk. A kádakat szűrőpapírral béleltük a kád teljes magasságában az egyenletes futtatóelegy-gőz telítettség biztosítása miatt. A futtatás konstans, 30°C hőmérsékleten történt.

Az 1. dimenzióban történő futtatás után a lapokat megszáritottuk 30°C-on, majd a lapok 90°-os elforgatásával a szétválasztást a 2. dimenzióban folytattuk.

Futtatás után a lapokat száritottuk és lefújtuk 50%-os kénsavval egyenletesen úgy, hogy a szilika-gél réteg átnedvesedjen.

Ezt követően a lapokat 180°C-on mineralizáltuk.

A foszfolipidek fekete foltok alakjában jelentek meg. A foltokat lekapartuk, meghatároztuk foszfolipid tartalmukat.

II.6.3.1. A foszfolipidek meghatározása

A foszfolipideket Kahovcova módszere alapján határoztuk meg /J.Kahovcova and R. Odavic 1969./.

4 ml desztillált víz + a lekapart folt
1 ml Hahn-Luckhaus reagens, jól össze-
keverjük
10 percig forraljuk vízfürdőn, majd
hűtjük
centrifugáljuk 2500 g-n 10 percen át
A felülúszó fotometrálnak 700 nm-en.

Anyag kontroll minta

A vékonyréteglap különböző helyeiről különböző területű foltokat kapartunk le, s ugyanúgy kezeljük, mint a minta esetében.

Kontroll minta

lekapart foltot nem tartalmazó, a mintával azonos összetételű oldat.

A kalibrációs görbéről leolvasott és számított mg P értéket megszorozva az irodalomból átvett faktorról $f = 22,5$, a foszfolipid tartalmat kaptuk meg mg-ban kifejezve. A kalibrációs görbét NaH_2PO_4 oldattal vettük fel.

II.7. Száranyagtartalom meghatározása

Az SR preparátumok száranyagtartalmát egy általunk kifejlesztett módszerrel határoztuk meg.

Gondosan megtisztított, szerves oldószerrel zsirtalanított fedőlemezeket hártásítottunk az elektronmikroszkópos metodikáknál is alkalmazott 1%-os Formvar oldattal.

Az így elkészített fedőlemezeket ionbombáztuk, mely elősegítette a fehérjék jobb tapadását a felületen. Az SR preparátumokból 25 μ l-es térfogatokat csöpentettünk a lemezekre, majd szárítószekrényben, 115^oC-on beszárítottuk. A beszáradt minták sótartalmát kétszer desztillált vízzel kimostuk úgy, hogy a fedőlemezeket egyenként bemártogattuk a desztillált vízbe. A mintákat ezután súlyállandóságig szárítottuk és súlyukat mértük.

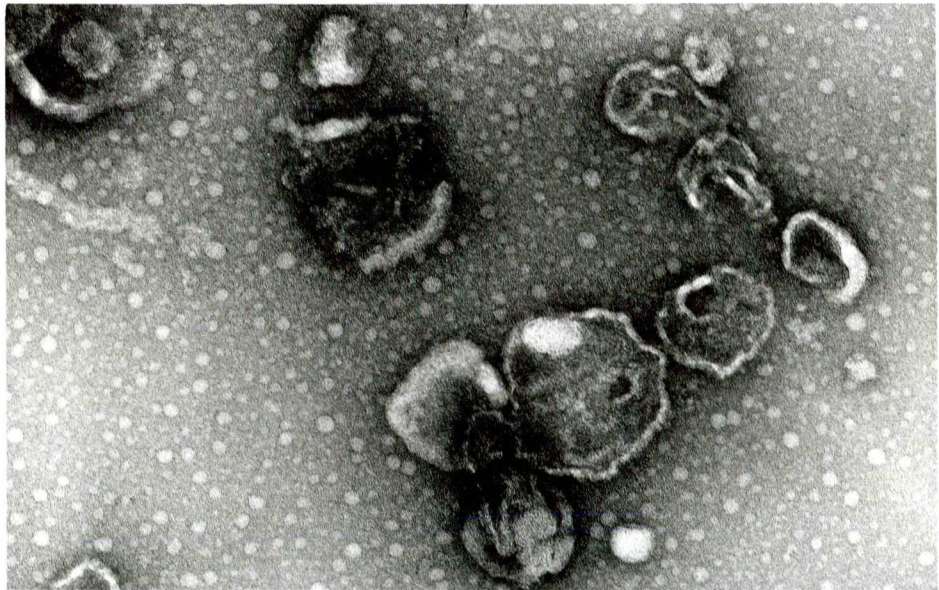
A minták súlyát hat tizedesjegy pontossággal mértük, zárt légterű, Sartorius analitikai mérlegen.

A kísérleteink során kapott eredményeket a következő fejezet taglalja.

III. E R E D M É N Y E K

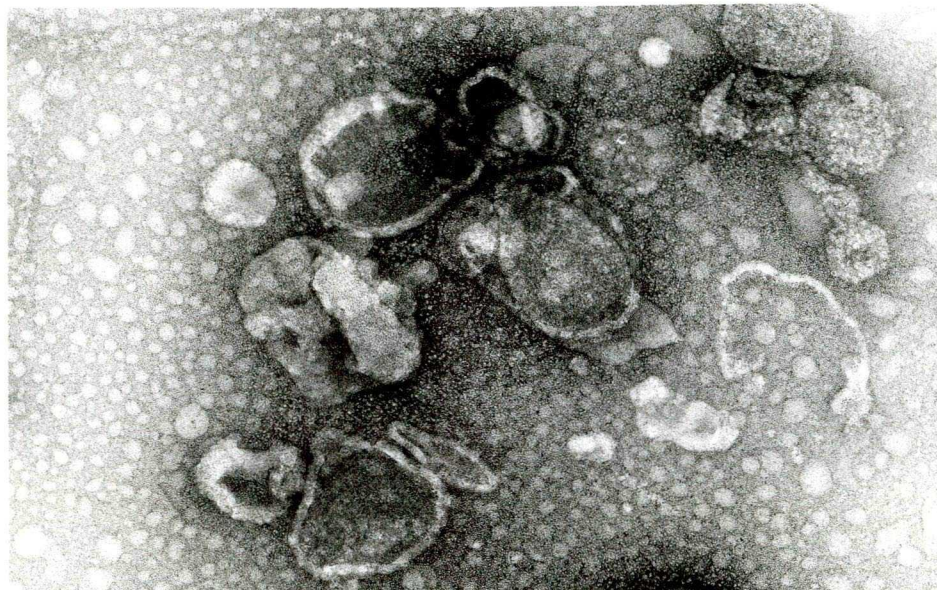
A kísérletes részben részletesen ismertettük az SR membrán preparálási metodikáját, valamint azt, hogy ellenőriztük a kapott membránrendszer tisztaságát.

Az 1. és 2. sz. elektronmikroszkópos felvétel a normál m. gastrocnemius és m. soleus SR preparátumainak negatív festési eljárással készült képét mutatja.



1. sz. felvétel

M. gastrocnemiusból preparált SR vezikulák negatív festéssel készült elektronmikroszkópos felvétele
Nagyítás: 88 000 x



2. sz. felvétel

M. soleusból preparált SR vezikulák negatív festéssel készült elektronmikroszkópos felvétele

Nagyítás: 88 000 x

A felvételeken lezárt SR vezikulák láthatók. A preparátumok kötőszöveti és strukturfehérje szennyeződéstől mentesek.

A szarkolemmális ATP-áz enzimaktivitás vizsgálataink szerint / Na^+ - K^+ -ATP-áz/ az SR preparátumok szarkolemma membrán töredékeket nem tartalmaztak.

Kísérleti eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy a m. gastrocnemius SR preparátumai mitokondriális szennyezettséget nem tartalmaztak.

Ezzel szemben a m. soleus SR preparátumai tartalmaztak mitokondriális szennyezettséget. Feltételezésünk szerint, ennek oka az lehet, hogy a m. soleusból preparált SR frakciókat szukroz gradiensen nem tisztítottuk. A mitokondriális szennyezettség mennyisége az immobilizálás előrehaladtával csökkent a kontrollhoz képest. az egyes preparátumokban /pl. 2 hetes kezelés hatására 50%-kal/ a mitokondriális ATP-áz enzimaktivitás értékek alapján. Csökkent a mitokondriális membránokra jellemző kardiolipin mennyisége is. A csökkenés oka lehet az is, hogy az elektronmikroszkópos vizsgálatok mitokondrium károsodást ill. mitokondrium szám csökkenést mutattak immobilizáció hatására.

Az SR funkciójának biokémiai vizsgálata

során kapott eredmények a következők.

A m. gastrocnemiusból preparált SR Ca-45 felvételének értékei maximum görbe szerint változtak.

Immobilizálás időtartama	kontroll	1 hét	2 hét	4 hét	6 hét
	$\mu\text{MCa}/\text{mg protein}$				
I.	1,00 \pm 0,01	1,93 \pm 0,01	3,13 \pm 0,02	1,03 \pm 0,02	0,905 \pm 0,03
II.	1,13 \pm 0,02	1,89 \pm 0,02	3,63 \pm 0,01	0,977 \pm 0,02	0,754 \pm 0,02
III.	1,26 \pm 0,01	1,67 \pm 0,01	3,31 \pm 0,02	1,05 \pm 0,02	0,878 \pm 0,02

1. sz. táblázat

A m. gastrocnemius SR vezikulák Ca-45 felvétel értékei immobilizáció hatására

A Ca-45 felvétel értékei a legmagasabbak két hetes immobilizálás után. A kontrollhoz viszonyítva 3x-os az emelkedés. Hosszabb kezelés hatására /4 hét/ az értékek csökkennek ill. hat hetes kezelés után megközelítik a kontroll értékeket / $p < 0,05$ a kontroll értékhez viszonyítva/.

A m. soleusból preparált SR vezikulák Ca-45 felvételének értékei szintén maximum görbe szerint változtak.

Immobilizálás időtartama	kontroll	1 hét	2 hét	4 hét	6 hét
	$\mu\text{MCo}/\text{mg protein}$				
I.	0,135 \pm 0,02	0,340 \pm 0,02	0,695 \pm 0,01	0,477 \pm 0,02	0,100 \pm 0,01
II.	0,203 \pm 0,02	0,290 \pm 0,01	0,640 \pm 0,02	0,413 \pm 0,01	0,095 \pm 0,01
III.	0,169 \pm 0,01	0,322 \pm 0,02	0,580 \pm 0,02	0,430 \pm 0,02	0,106 \pm 0,01

2.sz. táblázat

A m. soleus SR vezikulák Ca-45 felvétel értékei immobilizáció hatására

Két hetes immobilizáció után 5x magasabbak a kontroll értékeknél. Hosszabb kezelés hatására az értékek csökkennek /4 hét/, míg hat hét után kisebbek a kontroll értékeknél /p < 0,05 a kontroll értékhez viszonyítva/.

A m. gastrocnemiusból preparált SR vezikulák Ca^{2+} -
/extra/ ATP-áz értékei maximum görbe szerint vál-
toztak.

Immobilizálás időtartama		Total(Ca^{2+} - Mg^{2+}) μ MPI/mg protein/perc	Alap(Mg^{2+}) μ MPI/mg protein/perc	Extra(Ca^{2+}) μ MPI/mg protein/perc
kontroll	I.	3,38 \pm 0,08	1,28 \pm 0,02	2,10 \pm 0,07
	II.	3,66 \pm 0,04	1,40 \pm 0,02	2,26 \pm 0,04
	III.	3,96 \pm 0,04	1,46 \pm 0,03	2,50 \pm 0,03
1 hét	I.	4,21 \pm 0,06	1,30 \pm 0,07	2,91 \pm 0,06
	II.	4,45 \pm 0,07	1,27 \pm 0,09	3,18 \pm 0,05
	III.	4,03 \pm 0,12	1,24 \pm 0,06	2,79 \pm 0,06
2 hét	I.	6,12 \pm 0,08	1,62 \pm 0,04	4,50 \pm 0,07
	II.	6,25 \pm 0,05	1,63 \pm 0,06	4,62 \pm 0,04
	III.	6,30 \pm 0,04	1,54 \pm 0,05	4,76 \pm 0,05
4 hét	I.	4,59 \pm 0,05	1,49 \pm 0,03	3,10 \pm 0,03
	II.	4,13 \pm 0,04	1,46 \pm 0,03	2,66 \pm 0,02
	III.	4,50 \pm 0,04	1,86 \pm 0,04	2,64 \pm 0,15
6 hét	I.	3,50 \pm 0,05	0,681 \pm 0,07	2,82 \pm 0,05
	II.	3,30 \pm 0,09	0,775 \pm 0,14	2,53 \pm 0,06
	III.	3,71 \pm 0,08	0,952 \pm 0,05	2,76 \pm 0,05

3.sz. táblázat

A m. gastrocnemiusból preparált SR vezikulák ATP-áz
enzimaktivitás értékei

A Ca^{2+} /extra/ ATP-áz aktivitás értékek a legmagas-
sabbak a két hetes immobilizálás után, 2x-re emel-
kedtek a kontroll értékekhez viszonyítva. Hosszan-
tartó kezelés hatására az aktivitás értékek csökken-
nek /4hét/, majd megközelítik a kontroll értékeket
/p < 0,05 a kontroll értékhez viszonyítva/.

A $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ /össz/-ATP-áz aktivitás értékek vál-
tozása hasonló tendenciát mutat.

A Mg^{2+} /alap/-ATP-áz enzimaktivitás értékek változá-
sa nem ilyen kifejezett.



A m. soleusból preparált SR vezikulák Ca^{2+} /extra/- ATP-áz értékei szintén maximum görbe szerint változtak.

Immobilizálás időtartama		Total (Ca^{2+} + Mg^{2+}) $\mu\text{MPI}/\text{mg protein}/\text{perc}$	Alap(Mg^{2+}) $\mu\text{MPI}/\text{mg protein}/\text{perc}$	Extra(Ca^{2+}) $\mu\text{MPI}/\text{mg protein}/\text{perc}$
kontroll	I.	0,799 \pm 0,05	0,567 \pm 0,09	0,232 \pm 0,03
	II.	1,06 \pm 0,09	0,652 \pm 0,06	0,405 \pm 0,02
	III.	0,935 \pm 0,02	0,540 \pm 0,02	0,395 \pm 0,02
1 hét	I.	1,42 \pm 0,05	0,914 \pm 0,09	0,506 \pm 0,04
	II.	1,81 \pm 0,14	1,34 \pm 0,01	0,470 \pm 0,02
	III.	1,42 \pm 0,04	0,730 \pm 0,02	0,690 \pm 0,05
2 hét	I.	3,50 \pm 0,03	2,54 \pm 0,05	0,960 \pm 0,04
	II.	3,38 \pm 0,02	2,20 \pm 0,01	1,18 \pm 0,01
	III.	3,44 \pm 0,06	2,43 \pm 0,08	1,02 \pm 0,08
4 hét	I.	2,49 \pm 0,18	2,07 \pm 0,12	0,420 \pm 0,01
	II.	2,85 \pm 0,10	2,48 \pm 0,11	0,370 \pm 0,04
	III.	2,72 \pm 0,06	2,17 \pm 0,03	0,550 \pm 0,05
6 hét	I.	2,29 \pm 0,06	1,86 \pm 0,10	0,435 \pm 0,02
	II.	1,29 \pm 0,10	1,05 \pm 0,15	0,237 \pm 0,01

4. sz. táblázat

A m. soleusból preparált SR vezikulák ATP-áz enzimaktivitás értékei

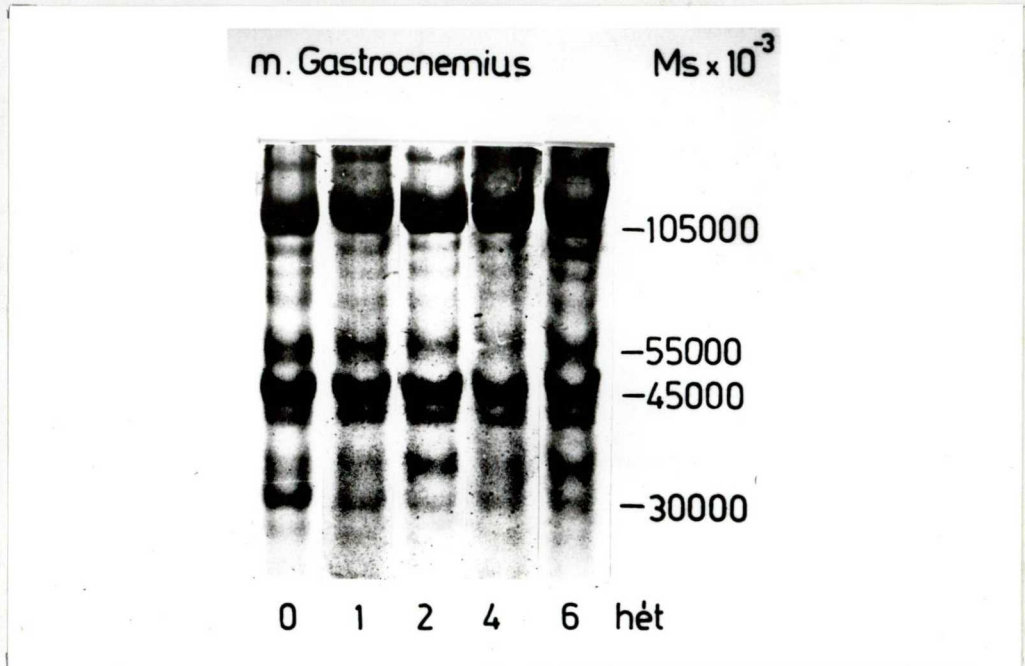
A Ca^{2+} /extra/ ATP-áz enzimaktivitás értékek legmagasabbak két hét immobilizálás után, 3-4x magasabbak mint a kontroll értékek. Hosszantartó kezelés hatására /4-6 hét/ az értékek a kontrollhoz tartanak / $p < 0,05$ a kontroll értékhez viszonyítva/.

A Ca^{2+} - Mg^{2+} -össz/-ATP-áz aktivitás értékek változása is hasonló tendenciát mutat. Négy és hat hét immobilizálás után ezek az értékek csökkennek, de nem érik el a kontroll értékeket.

A Mg^{2+} /alap/-ATP-áz aktivitás értékek szintén két hét immobilizálás után a legmagasabbak. 4-5x magasabbak a kontroll értékeknél. Ezután az aktivitás értékek csökkennek, de nem érik el a kontroll értékeket hat

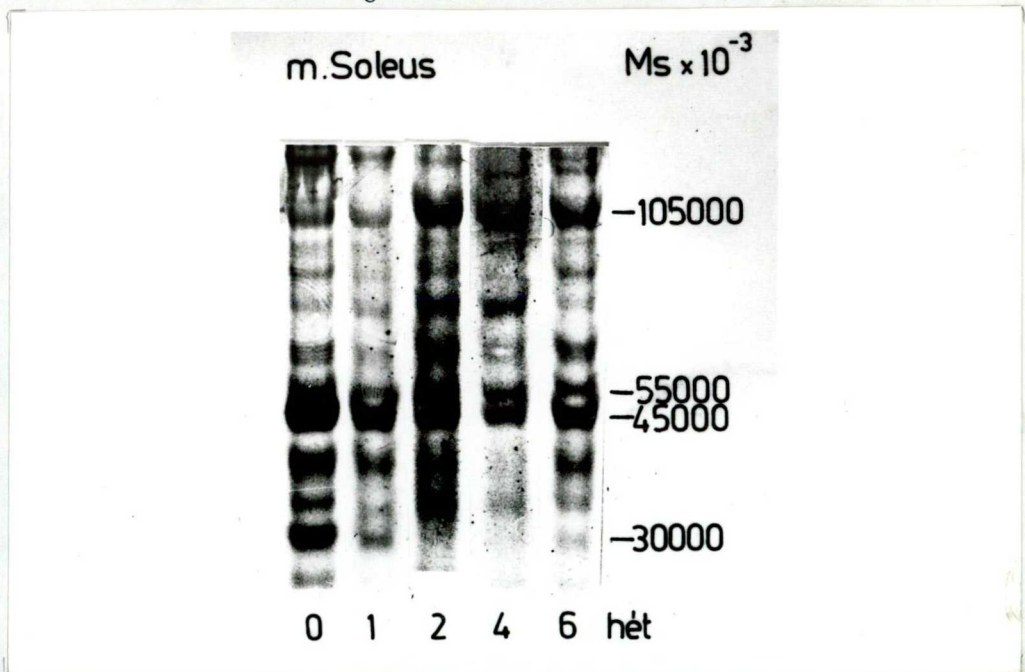
hét immobilizálás után.

A normál és immobilizált izmokból preparált SR vezikulák fehérjeösszetételét 7,5%-os SDS gélelektroforézissel vizsgáltuk. A fehérjeösszetételt a 2. és 3. sz. ábra szemlélteti.



2. sz. ábra

Normál és immobilizált m. gastrocnemiusból preparált SR vezikulák fehérjeösszetétele



3. sz. ábra

Normál és immobilizált m. soleusból preparált SR vezikulák fehérjeösszetétele

Az ábrákon látható, hogy immobilizálás hatására a vezikulák fehérjeösszetételében minőségi változás nem következett be a kontrollhoz viszonyítva. Az egyes fehérjecsúcsok relatív megoszlásában azonban változás történt.

	Immobilizálás időtartama				
	kontroll	1 hét	2 hét	4 hét	6 hét
molsúly					
105000	36	48	46	46	45
55000	19	18	20	20	18
45000	32	23	22	23	23
30000	13	11	12	11	14

5. sz. táblázat

M. gastrocnemiusból preparált SR vezikulák fehérjeösszetételének /4 fő csúcsra számolt/ relatív megoszlása

	Immobilizálás időtartama				
	kontroll	1 hét	2 hét	4 hét	6 hét
molsúly					
105000	40	54	53	52	53
55000	21	20	24	22	21
45000	39	26	25	26	26

6. sz. táblázat

M. gastrocnemiusból preparált SR vezikulák fehérjeösszetételének /3 fő csúcsra számolt/ relatív megoszlása

A relativ fehérje megoszlást az irodalomból ismert négy ill. három fő fehérjecsúcsra vonatkoztattuk.

Ezek a következők: 105 000 daltonos ATP-áz fehérje, az 55 000 és 45 000 daltonos Ca kötő fehérjék és a 30 000 daltonos fehérje.

A m. gastrocnemius SR membrán esetén a relativ fehérjemegoszlást négy fő fehérjecsúcsra számolva a következő eredményeket kaptuk. A Ca²⁺-ATP-áz /105 000 dalton/ fehérje relativ mennyisége egy hét immobilizálás után megnövekszik a kontrollhoz képest, majd hosszan tartó kezelés hatására is alig változik. Ezzel szemben csökken a Ca²⁺ kötésben fontos szerepet játszó 45 000 daltonos calsequestrin relativ mennyisége.

A három fő csúcsra számolt relativ fehérjemegoszlás jellege megegyezik a fentiekkel.

A 7. és 8. sz. táblázat a m. soleusból preparált SR vezikulák fehérjeösszetételének relativ megoszlását szemlélteti. A négy ill. három fő fehérjecsúcsra számolt relativ fehérjemegoszlás alapján a Ca²⁺-ATP-áz fehérje relativ mennyisége növekszik a két hetes immobilizálás időtartamáig, hosszan tartó kezelés hatására /4-6 hét/ közel konstans marad. A 45 000 daltonos calsequestrin relativ mennyisége három ill. négy fő csúcsra számolva pedig csökken.

molsúly	Immobilizálás időtartama				
	kontroll	1 hét	2 hét	4 hét	6 hét
105000	16	20	36	34	34
55000	14	11	17	17	17
45000	39	43	28	30	31
30000	31	26	19	19	18

7. sz. táblázat

M. soleusból preparált SR vezikulák fehérjeösszetételének/négy fő csúcsra számolt/relatív megoszlása

molsúly	Immobilizálás időtartama				
	kontroll	1 hét	2 hét	4 hét	6 hét
105000	23	28	40	33	39
55000	20	14	21	25	23
45000	57	58	39	40	38

8. sz. táblázat

M. soleusból preparált SR vezikulák fehérjeösszetételének/három fő csúcsra számolt/relatív megoszlása

A lipid extraktumból az egyes foszfolipideket két-dimenziós vékonyréteg-kromatográfiával határoztuk meg.

Mindkét izom SR membrán rendszerének lipidjei mind mennyiségben, mind minőségben a nem használat következtében megváltoztak. A változások a két funkcionálisan különböző izomban nem teljesen azonosak.

A változások időbeli lefutása általában maximum ill. minimum görbével jellemezhetők.

Immobilizálás időtartama		Lipid (%)	Fehérje (%)	Foszfolipid (%)
kontroll	I.	30	70	29
	II.	32	68	28
	III.	33	67	29
1 hét	I.	36	64	28
	II.	35	65	28
	III.	34	66	29
2 hét	I.	52	48	29
	II.	50	50	30
	III.	48	52	31
4 hét	I.	55	45	23
	II.	54	46	23
	III.	53	47	23
6 hét	I.	47	53	17
	II.	45	55	16
	III.	46	54	17

9. sz. táblázat

M. gastrocnemius SR-jének szárazanyag tartalomra vonatkoztatott lipid, fehérje és foszfolipid %-os megoszlása

Immobilizálás időtartama		Lipid (%)	Fehérje(%)	Foszfolipid(%)
kontroll	I.	60	40	20
	II.	58	42	22
	III.	57	43	22
1 hét	I.	60	40	21
	II.	61	39	20
	III.	63	37	19
2 hét	I.	71	29	16
	II.	69	31	16
	III.	68	32	17
4 hét	I.	62	38	24
	II.	64	36	22
	III.	63	37	23
6 hét	I.	65	35	34
	II.	63	37	36
	III.	62	38	37

10. sz. táblázat

M. soleus SR-jének szárazanyagtartalomra vonatkoztatott lipid, fehérje és foszfolipid %-os megoszlása

A membrán szárazanyagára vonatkoztatott összlipid-fehérje megoszlás a normál m. gastrocnemius SR-jében /9. sz. táblázat/ 30%; 70%, míg a m. soleus esetében /10.sz. táblázat/ 60; 40%. Immobilizáció hatására mindkét típusú izomban a lipid komponens mennyiségének változása maximumon megy keresztül /2-4 hét között/.

A foszfolipidek relativ mennyisége nem egyformán változik: a m. gastrocnemius SR-jében egy folytonos csökkenés mutatkozik /9. sz. táblázat/, míg a m. soleus esetében egy minimumon /10. sz. táblázat/ keresztül növekszik /hosszabb kezelés hatására/.

A foszfolipid mennyisége összlipidre vonatkoztatva a m. gastrocnemius SR-jében a kezdeti 90%-ról négy hét alatt közel 40%-ra csökken, majd a további változás minimális.

immobilizálás időtartama	szfingomielin	foszfatid szerin	foszfatid inozit	foszfatid sav	lecitin	kefalin	kardiolipin	x	foszfolipid %-a
kontroll	6	10	1,6	0,9	54	12	0,09	1	86
1 hét	0,56	5	6	nem mérhető	48	16	nem mérhető	nem mérhető	76
2 hét	1,9	2	4,5	0,3	41	13	nem mérhető	0,3	63
4 hét	3	4	0,8	nem mérhető	32,5	3	nem mérhető	nem mérhető	44
6 hét	2	3	0,6	1,9	26	5	nem mérhető	nem mérhető	39

11. sz. táblázat

M. gastrocnemius SR-jének foszfolipid %-os megoszlása összlipidre vonatkoztatva

A normál m. soleus SR-jében a foszfolipidek mennyisége 34% és egy minimumon keresztül több mint 50%-ra emelkedik tartós kezelés /6 hét/ hatására.

immobilizálás időtartama	szfingomielin	foszfati-dil szerin	foszfati-dil inozit	foszfati-dil sav	lecitin	kefalin	kardiolipin	x	foszfolipid %-a
kontroll	1,7	2,4	0,06	1,2	21,5	4,3	3,9	1,2	36
1 hét	1,7	2,4	nem mérhető	1,8	19,0	4,0	3,7	nem mérhető	33
2 hét	0,8	2,1	0,11	0,9	13,5	3,2	1,6	0,9	24
4 hét	nem mérhető	3,6	nem mérhető	2,5	20,6	7,3	1,4	1,5	36
6 hét	3,6	3,1	3,7	2,7	31,3	7,2	1,4	1,5	56

12. sz. táblázat

M. soleus SR-jének foszfolipid %-os megoszlása
összlipidre vonatkoztatva

A foszfolipid/membránfehérje arány a m. gastrocnemius SR-jében a kezelés kettő-négy hetes intervallumában maximumon megy keresztül és jelentősen csökken tartós kezelés hatására.

Immobilizálás időtartama		szfingomielin	foszfati- dil szerin	foszfati- dil inozit	foszfati- sav	lecitin	kefalin	kardio- lipin	x	összfosz- folipid (mg)
kontroll	I.	0,030	0,052	0,0084	0,004	0,274	0,062	0,0005	0,005	0,436
	II.	0,032	0,054	0,0080	0,005	0,278	0,060	0,0004	0,005	0,442
	III.	0,029	0,050	0,0081	0,0048	0,270	0,059	0,0006	0,0055	0,427
1 hét	I.	0,0033	0,03	0,04	nem	0,261	0,097	nem	nem	0,431
	II.	0,0026	0,028	0,03	mérhető	0,273	0,088	mérhető	mérhető	0,421
	III.	0,0036	0,03	0,036		0,268	0,090			0,427
2 hét	I.	0,020	0,020	0,047	0,0033	0,412	0,100	nem	0,0033	0,606
	II.	0,017	0,024	0,041	0,0030	0,421	0,160	mérhető	0,0027	0,668
	III.	0,022	0,020	0,050	0,027	0,416	0,136		0,0030	0,643
4 hét	I.	0,037	0,052	0,009	nem	0,382	0,034	nem	nem	0,514
	II.	0,030	0,047	0,010	mérhető	0,374	0,040	mérhető	mérhető	0,501
	III.	0,036	0,046	0,009		0,379	0,042			0,512
6 hét	I.	0,019	0,033	0,006	0,013	0,218	0,042	nem	nem	0,332
	II.	0,022	0,028	0,006	0,019	0,226	0,040	mérhető	mérhető	0,341
	III.	0,017	0,025	0,004	0,017	0,230	0,045			0,338

13. sz. táblázat

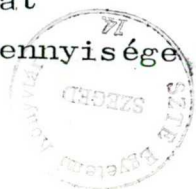
M. gastrocnemius SR-jének foszfolipid mennyisége mg membránfehérjére vonatkoztatva

A m. soleus SR-jében ezen arány fokozatosan emelkedik az egész kezelés folyamán.

Immobilizálás időtartama		szfingomielin	foszfati- dil szerin	foszfati- dil inozit	foszfati- sav	lecitin	kefalin	kardio- lipin	x	összfosz- folipid (mg)
kontroll	I.	0,021	0,033	0,001	0,020	0,297	0,056	0,056	0,020	0,504
	II.	0,026	0,039	0,001	0,014	0,304	0,062	0,059	0,016	0,521
	III.	0,025	0,030	0,0008	0,017	0,302	0,065	0,052	0,017	0,508
1 hét	I.	0,025	0,040	nem	0,030	0,300	0,065	0,060	nem	0,520
	II.	0,029	0,036	mérhető	0,027	0,308	0,061	0,058		0,519
	III.	0,030	0,041		0,032	0,296	0,066	0,062	mérhető	0,528
2 hét	I.	0,020	0,050	0,002	0,020	0,310	0,070	0,040	0,023	0,535
	II.	0,017	0,046	0,004	0,023	0,302	0,075	0,037	0,020	0,524
	III.	0,022	0,051	0,002	0,019	0,310	0,073	0,038	0,019	0,534
4 hét	I.	nem	0,064	nem	0,027	0,351	0,124	0,027	0,027	0,620
	II.	mérhető	0,060	mérhető	0,024	0,346	0,129	0,022	0,029	0,610
	III.		0,061		0,029	0,354	0,123	0,023	0,025	0,616
6 hét	I.	0,067	0,051	0,068	0,051	0,548	0,169	0,042	nem	0,996
	II.	0,061	0,057	0,062	0,050	0,539	0,174	0,034		0,980
	III.	0,062	0,055	0,065	0,048	0,541	0,166	0,044	mérhető	0,981

14. sz. táblázat

M. soleus SR-jének foszfolipid mennyisége mg membránfehérjére vonatkoztatva



A koleszterin/membránfehérje arány a normál m. gastrocnemius SR-jében alacsony érték, mely tartós kezelés hatására 3x-ra növekszik.

Immobilizálás időtartama		koleszterin $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje	%
kontroll	I.	22	100
	II.	20	
	III.	21	
1 hét	I.	34	180
	II.	36	
	III.	38	
2 hét	I.	51,3	264
	II.	52,8	
	III.	54,3	
4 hét	I.	57,4	275
	II.	55,2	
	III.	53,0	
6 hét	I.	62,4	313
	II.	64,1	
	III.	60,7	

15. sz. táblázat

M. gastrocnemius SR-jének koleszterintartalma mg membránfehérjére vonatkoztatva

A normál m. soleus SR-jében relative magas érték /m.gastrocnemiusához viszonyítva/ hosszan tartó immobilizáció hatására 2x-re emelkedik.

Immobilizálás időtartama		koleszterin $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje	%
kontroll	I.	52,6	100
	II.	54,3	
	III.	51,0	
1 hét	I.	41,7	80,4
	II.	44,0	
	III.	41,2	
2 hét	I.	51,3	97,3
	II.	49,6	
	III.	52,7	
4 hét	I.	57,9	109,3
	II.	55,9	
	III.	58,7	
6 hét	I.	93,8	178,1
	II.	92,5	
	III.	94,8	

16. sz. táblázat

M. soleus SR-jének koleszterintartalma mg membránfehérjére vonatkoztatva

A foszfolipidek megoszlásából arra következtethetünk, hogy a /lecitin + kefalín/ arány szárazanyag tartalomra vonatkoztatva m. gastrocnemius SR-jében maximumon keresztül alacsony értékre csökken.

Immobilizálás időtartama	szfingomielin	foszfati-dil szerindil	foszfati-dil inozit	foszfati-dil sav	lecitin	kefalín	kardiolipin	x	foszfolipid %-a
kontroll	2,0	3,4	0,5	0,3	18,2	4,0	0,03	0,3	29
1 hét	0,2	1,8	2,2	nem mérhető	17,1	5,8	nem mérhető	nem mérhető	27
2 hét	0,9	1,0	2,2	0,1	20,7	6,4	nem mérhető	0,1	31,4
4 hét	1,5	2,2	0,4	nem mérhető	17,5	1,7	nem mérhető	nem mérhető	23,3
6 hét	1,0	1,5	0,2	0,8	12,1	2,2	nem mérhető	nem mérhető	18

17. sz. táblázat

M. gastrocnemius SR foszfolipidjeinek %-os megoszlása szárazanyag tartalomra vonatkoztatva

A m. soleus SR-jében minimumon keresztül közel 2x-re emelkedik tartós kezelés hatására /hat hét/.

Immobilizálás időtartama	szfingomielin	foszfati-dil szerindil	foszfati-dil inozit	foszfati-dil sav	lecitin	kefalín	kardiolipin	x	foszfolipid %-a
kontroll	0,9	1,4	0,04	0,6	12,5	2,5	2,3	0,7	21
1 hét	1,0	1,5	nem mérhető	1,1	11,6	2,5	2,3	nem mérhető	20
2 hét	0,6	1,5	0,07	0,6	9,4	2,2	1,1	0,6	16
4 hét	nem mérhető	2,3	nem mérhető	0,9	13,1	4,6	0,9	1,0	23
6 hét	2,2	1,9	2,3	1,76	19,8	6,2	1,4	nem mérhető	36

18. sz. táblázat

M. soleus SR foszfolipidjeinek %-os megoszlása szárazanyag tartalomra vonatkoztatva

A foszfolipideken belül a /lecitin + kefalín/
%-os mennyisége maximum görbe szerint változik mind-
két típusú izom SR-jében.

Immobilizálás időtartama	szfingo- mielin	foszfatidil- szerin	foszfatidil- inozit	foszfatid- sav	lecitin	kefalín	kardio- lipin	x
kontroll	6,9	11,9	1,8	1,03	62,9	13,8	0,1	1,13
1 hét	0,7	6,9	8,3	nem mérhető	62,7	21,5	nem mérhető	nem mérhető
2 hét	3,1	3,3	7,2	0,4	65,2	20,2	nem mérhető	0,46
4 hét	6,6	9,4	1,7	nem mérhető	74,3	7,5	nem mérhető	nem mérhető
6 hét	5,7	8,4	1,5	4,8	66,5	12,5	nem mérhető	nem mérhető

19. sz. táblázat

M. gastrocnemius SR foszfolipidjeinek %-os megoszlása
összfoszfolipidre vonatkoztatva

Immobilizálás időtartama	szfingo- mielin	foszfatidil- szerin	foszfatidil- inozit	foszfatid- sav	lecitin	kefalín	kardio- lipin	x
kontroll	4,6	6,6	0,1	3,3	58,8	11,9	10,8	3,4
1 hét	5,3	7,4	nem mérhető	5,6	57,7	12,2	11,4	nem mérhető
2 hét	3,7	9,2	0,5	3,8	57,8	13,6	7,2	2,0
4 hét	nem mérhető	10,0	nem mérhető	4,3	56,9	20,3	3,9	4,3
6 hét	6,4	5,5	6,5	5,0	54,2	17,2	4,1	nem mérhető

20. sz. táblázat

M. soleus SR foszfolipidjeinek %-os megoszlása össz-
foszfolipidre vonatkoztatva

Összlipidre számítva a m. gastrocnemius SR-jében maximumon keresztül a kontroll érték alá csökken /11. sz. táblázat/, míg a m. soleus SR-jében minimumon keresztül közel 50%-ra emelkedik /12. sz. táblázat/.

Korrelációs számítások alapján a m. gastrocnemius SR-jének Ca^{2+} -ATP-áz aktivitása, valamint a lecitin és kefalin mg membránfehérjére vonatkoztatott mennyisége között korreláció áll fenn / $r = 0,72; 0,8$ /.

A lipidek relativ mennyiségi és minőségi változásait összegezve - a két típusú izom SR-jének egyéb paramétereiben megmutatózó változásaival - arra következtethetünk, hogy az SR - hasonlóan az izomrost más organelumaihoz - a funkcióinak megfelelően változni képes.

A változások az új követelményekhez való alkalmazkodás időszakában jelentősek. Az SR-ben is kialakul a körülményeknek megfelelő új egyensúlyi állapot.

IV. E R E D M É N Y E K É R T É K E L É S E É S Ö S S Z E F O G L A L Á S A

Az Intézetünkben folyó biokémiai, biofizikai és ultrastrukturális kísérletek azt mutatják, hogy immobilizáció hatására a m. gastrocnemius és m. soleus izmokban jelentős változások történnek.

Megállapítást nyert, hogy immobilizáció hatására megnő a latencia idő Δt . Az egyetlen kontrakciós amplitudó a m. gastrocnemiusban nem változik, ezzel szemben a m. soleusban kb. 50%-os csökkenést lehet megfigyelni /A. Török et al. 1980/.

Figyelemre méltó biofizikai eredménynek tűnik a tenzió kifejlődés τ_1 és a relaxációs τ_2 félidők összehasonlításából származó azon megfigyelés, hogy a τ_1 és τ_2 értékek m. soleus esetében immobilizáció hatására a kontroll m. gastrocnemius értékeit közelítik meg.

Ezen kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a különböző funkciójú izmokban bizonyos fokú dedifferenciálódás észlelhető immobilizáció hatására.

A biofizikai jelenségek összefüggésbe hozha-

tók a miofibrilláris fehérjetartalom csökkenésével /Ö. Takács et al. 1977/.

Megállapítást nyert, hogy a m. gastrocnemius miofibrilláris fehérjetartalma 20%-os, míg a m. soleus fehérjetartalma 50%-os csökkenést mutat az immobilizáció előrehaladtával. Immobilizáció hatására az LC-3 homodimer izomiozin változást szenved: a gyors izmokban csökken, míg a lassú izmokban nő a mennyisége. Ez a miozin populáció transzformációját jelenti.

A fenti kísérleti megállapítások jó összhangban vannak az ultrastrukturális megfigyelésekkel, amelyek arra is rámutattak, hogy az izomrostokban, különösen a m. soleus esetében, a membrán rendszerek jelentős elváltozást mutatnak és határozott citoplazmatikus membrán feldúsulás következik be az immobilizáció hatására /M. Mészáros et al. 1979/.

A fentiekben összefoglalt jelenségek mögött - az anyagcserére vonatkozó, elsősorban enzimatikus vizsgálatok szerint - az izomrost anyagcsere-folyamatainak megváltozása húzódik meg.

Megfigyeltük, hogy a különböző izomtípusú rostok anyagcsere karaktere közelit egymáshoz, ami az oxidatív és fermentatív enzimrendszerre is vonatkozik /I. Édes et al. 1980/.

Az anyagcsere változások általában az immobi-

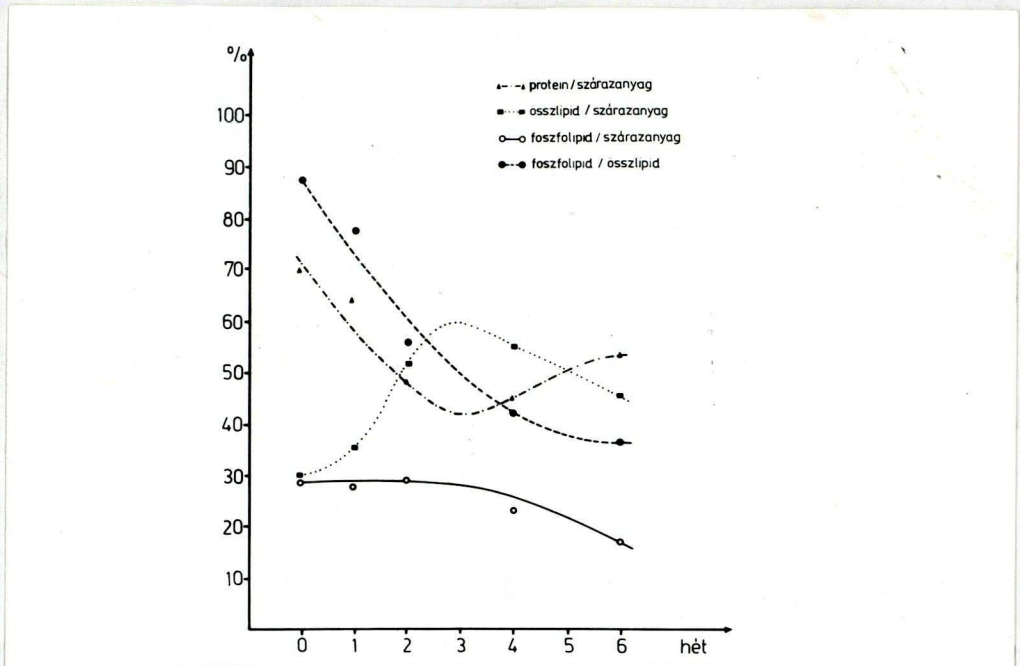
lizáció kezdeti szakaszán felgyorsulnak, majd az izomrost az új funkciónak megfelelő új egyensúlyi állapotba jut. Ezen következtetéseket alátámasztja, hogy a funkcióváltozás kezdeti szakaszában, mind a proteolitikus aktivitás, mind a fehérjeszintézis fokozódik /I. Sohár et al.1980, I.Sziklai et al. 1980./.

Az izomrost organelleim, egyes komponensei kicserélődnek és az új követelménynek megfelelően átrendeződnek.

A szarkoplazmatikus retikulum membránrendszer, amely a kontrakciós mechanizmusnak egyik lényeges része, hasonló elváltozásokon megy keresztül /Jakab et al. 1980/. Ugy látszik, hogy a sejt anyagcsere-folyamatainak átrendeződését követően, mind fehérjéiben mind lipid összetevőiben ugyancsak átrendeződik, mignem egy újabb egyensúlyi helyzetbe kerül.

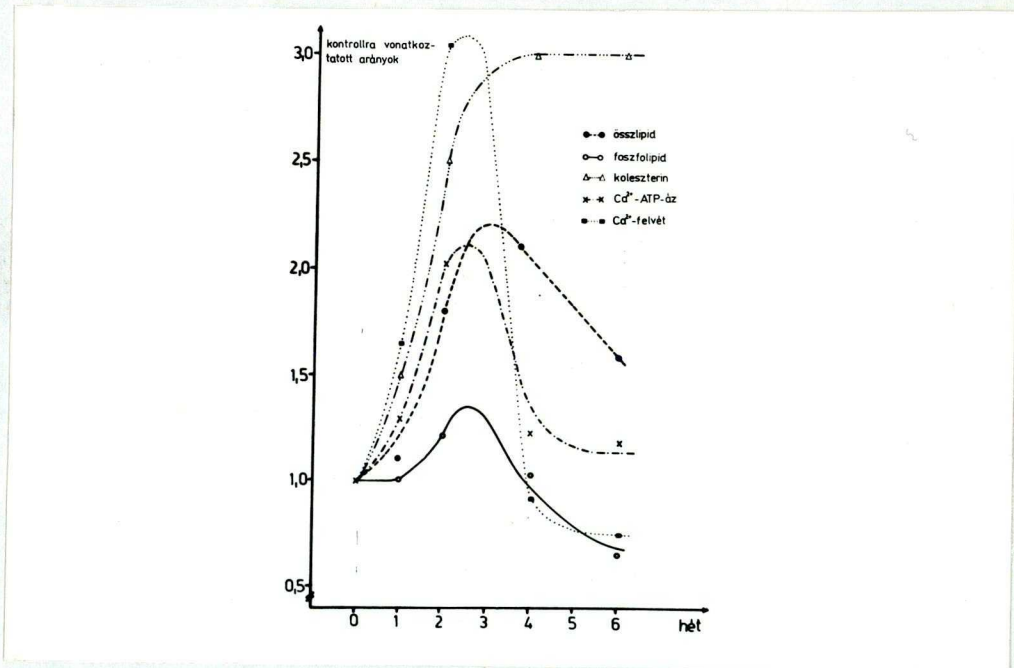
Az SR változásai mindkét típusú izomban, bár más jelleggel, az immobilizáció 2-4 hetében játszódnak le. Ebben az időszakban tapasztalható a legnagyobb változás a fehérje-lipid; fehérje-fosfolipid arányban, valamint a Ca-felvételben és a Ca-pumpa ATP-ázban is.

A változások menetét a 4.5.6.7. sz. összefoglaló ábrák szemléltetik.



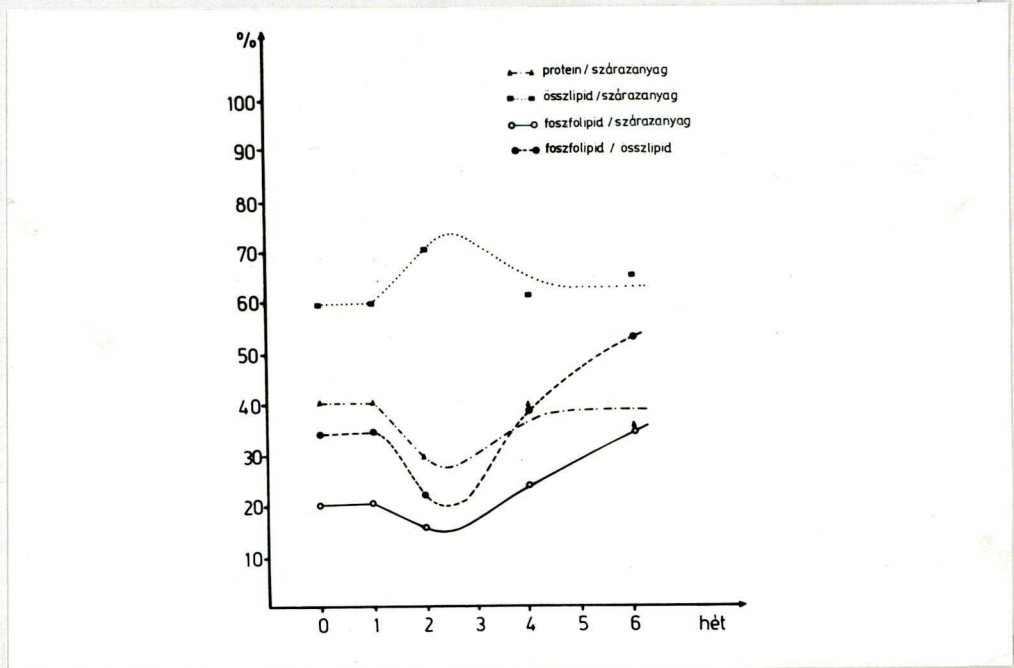
4. sz. ábra

M. gastrocnemius SR-jének szárazanyag tartalomra vonatkoztatott fehérje, összlipid, foszfolipid, valamint a foszfolipidek összlipidre vonatkoztatott %-os megoszlása



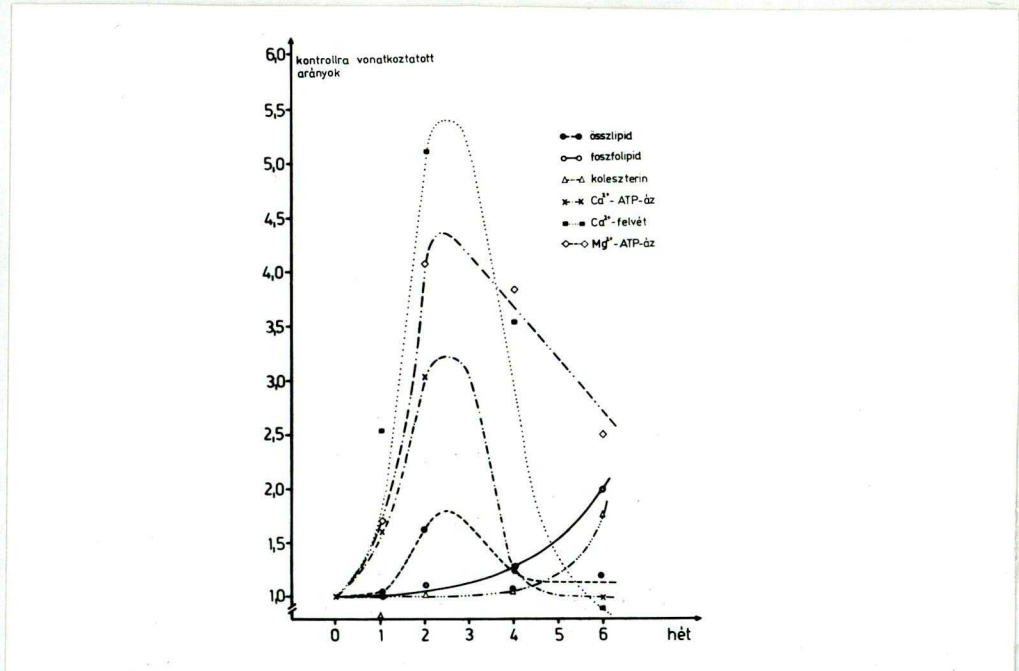
5.sz. ábra

M. gastrocnemius SR-jének összlipid-, foszfolipid-, koleszterintartalmának, Ca²⁺-ATP-áz aktivitásának, Ca-felvételének kontrollra vonatkoztatott arányai



6. sz. ábra

M. soleus SR-jének szárazanyag tartalomra vonatkoztatott fehérje, összlipid, foszfolipid, valamint a foszfolipidek összlipidre vonatkoztatott %-os megoszlása



7. sz. ábra

M. soleus SR-jének összlipid-, foszfolipid-, koleszterintartalmának, Ca²⁺-ATP-áz aktivitásának, Ca-felvételének, Mg²⁺-ATP-áz aktivitásának kontrollra vonatkoztatott arányai

Az SR funkció megváltozásának /a Ca-felvétel és a Ca^{2+} -dependens ATP-áz átmeneti emelkedése/ molekuláris magyarázata egyenlőre tisztázatlan.

Ugy tűnik, hogy a kétféle típusú izomban a változás nem teljesen azonos okokra vezethető vissza. /Ez a tény is arra utal, hogy a funkcionális változás multikauzális./

A m. gastrocnemius SR-ben az ATP-áz aktivitás és Ca-felvétel valószínűleg a megfelelő foszfolipid-fehérje arány kialakulásával értelmezhető, míg a m. soleus SR-ben a lipid minőségi arányok változása okozhatja az aktivitás emelkedést.

Ez utóbbi arra utal, hogy a funkcióért felelős fehérjekonformációt nem csupán a foszfolipidek hanem a membrán fluiditása is befolyásolja.

I R O D A L O M

- Armstrong, C.F. /1964/
Fed. Proc. 23, 887-895
- Baskin, R.J. /1971/
J. Cell Biol. 48, 49-60
- Bálint Miklós /1978/
Az izomműködés molekuláris alapjai
- Buresová, M., Gutmann, E. /1971/
J. Endocr. 50, 643-665
- Campbell, K.P., MacLennan, D.H. /1981/
J. Biol. Chem. 256, 4626-4632
- Chevallier, J., Butow, R.A. /1971/
Biochem. 10, 2733-2737
- Churcaine, A.J., Miller, W.H., Stein, D.B. /1959/
J. Clin. Chem. 5, 609-
- Deamer, D.W., Baskin, R.J. /1969/
J. Cell Biol. 42, 296-307
- Degani, C., Boyer, P. /1973/
J. Biol. Chem. 248, 8222-
- Dodge, J.T. /1963/
Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-

- Drabikowski, W., Sarzala, M.G., Wroniszewska, A.,
Lagwinska, E., Dzzewiecka, B. /1972/
Biochim. Biophys. Acta 274, 158-
- Eibl, H. /1969/
Anal. Biochem. 30, 51-55
- Édes, I., Sohár, I., Mazareán, H., Takács, Ö.,
Guba, F. /1980/
The Physiologist 23, 103-104
- Fiehn, W., Peter, J.B., Mead, J.F., Gan-Elepano, M.
/1971/
J. Biol. Chem. 246, 5617-
- Folch, J. /1957/
J. Biol. Chem. 226, 497-
- Green, N. M., Allen, G., Hebdon, G.M. /1980/
Ann. NY. Acad. Sci. 358, 149-158
- Guba, F. /1980/
Adv. Physiol. Sci. 24, 1-16
- Guba, F., Mészáros, M.G., Takács, Ö. /1977/
Acta biol. med. germ. 36, 1605-1619
- Hasselbach, W., Makinose, M. /1961/
Biochem. Z. 333, 518-
- Hasselbach, W., Migala, A. /1975/
Z. Naturforsch. Teil C30, 681-683
- Hesketh, T.R., Smith, G.A., Houslay, M.D., McGill, K.A.,
Birdsall, N.J.M., Metcalte, J.C. and Warren, G.B. /1976/
Biochem. 15, 4145-4151

- Hidalgo, C., Ikemoto, N. /1977/
J. Biol. Chem. 252, 8446-8454
- Ikemoto, N., Bhatnagar, G.M., Gergely, J. /1971/
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1510-1517
- Ikemoto, N. /közlés alatt/
Structure and function of the calcium pump
protein of sarcoplasmic reticulum
- Ikemoto, N. /1975/
J. Biol. Chem. 250, 7219-7224
- Ikemoto, N., Bhatnagar, G.M., Nagy, B., Gergely, J.
/1972/
J. Biol. Chem. 247, 7835-7837
- Ikemoto, N. /1974/
J. Biol. Chem. 249, 2357-2365
- Inesi, G., Ebashi, S., Watanabe, S. /1964/
Am. J. Physiol. 207, 1339-1344
- Inesi, G. /1972/
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1, 191-209
- Inesi, G., Scales, D. /1974/
Biochem. 13, 3298-3306
- Inesi, G. /1981/
Cell. and Muscle Motility 1, 63-97
- Jakab, Gy., Gajdos, L., Guba, F. /1980/
The Physiologist 23, 95-96

- Kahovcova, J., Odavic, R. /1969/
J. Chromatogr. 40, 90-96
- Katz, A.M. /1970/
Biochim. Biophys. Acta 205, 473-490
- Le Maire, M., Moller, J.V., Tanford, C. /1976/
Biochem. 15, 2336-2342
- Lowry, O.H. /1978/
Anal. Biochem. 85, 295-300
- MacLennan, D.H. /1970/
J. Biol. Chem. 245, 4508-
- MacLennan, D.H., Wong, P.T.S. /1971/
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1231-1235
- MacLennan, D.H., Holland, P.C. /1975/
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 4, 377-404
- MacLennan, D.H., Campbell, K.P. /1979/
Trends Biochem. Sci. 4, 148-151
- Madeira, V.M.C. /1980/
Cienc. Biol. /Portugal/ 5, 245-272
- Martonosi, A. /1964/
Fed. Proc. 23, 913-921
- Martonosi, A., Halpin, R.A. /1971/
Arch. Biochem. Biophys. 144, 66-
- Martonosi, A. /1971/
Biomembranes 1, 191-256
- Matsui, Schwartz /1966/
Biochim. Biophys. Acta 128, 380-

- McFarland, B.H., Inesi, G. /1971/
Arch. Biochem. Biophys. 145, 456-
- Meissner, G., Fleischer, S. /1971/
Biochim. Biophys. Acta 241, 356-378
- Meissner, G., Fleischer, S. /1972/
Biochim. Biophys. Acta 255, 19-33
- Meissner, G. /1973/
Biochim. Biophys. Acta 298, 907-926
- Mészáros, M. /1979/
Acta biol. Acad. Sci. Hung. 30, 1-
- Ostwald, T., MacLennan, D.H. /1974/
J. Biol. Chem. 249, 974-979
- Packer, L., Mehard, C.W., Meissner, G., Zahler, W.L.,
Fleischer, S. /1974/
Biochim. Biophys. Acta 363, 159-181
- Pick, U., Racker, E. /1979/
Biochem. 18, 108-113
- Poster, K., Palade, G.E. /1957/
J. Biophys. Biochem. Cyt. 3, 269-299
- Rouser, G., Siakotos, A.N., Fleischer, S. /1966/
Lipids 1, 85-86
- Sarzala, M.G., Pilarska, M., Zubrzycka, E.,
Michalak, M. /1975/
Eur. J. Biochem. 57, 25-34
- Sarzala, M.G., Michalak, M. /1978/
Biochim. Biophys. Acta 513, 221-235

- Scales, D., Inesi, G. /1976/
Biophys. J. 16, 735-751
- Singer, S.J., Nicholson, G.L. /1972/
Science 175, 723-
- Sohár, I., Takács, Ö., Guba, F. /1977/
Acta biol.med.germ. 36, 1621-1624
- Sohár, I., Nagy, I., Takács, Ö., Kovács, Zs.,
Guba, F. /1980/
Adv. Physiol. Sci. 24, 213-220
- Sréter, F.A. /1975/
J. Gen. Physiol. 66, 811-
- Stewart, P.S., MacLennan, D.H. /1976/
J. Biol. Chem. 251, 712-719
- Sziklai, I., Takács, Ö., Kiss, Zs., Guba, F. /1980/
The Physiologist 23, 101-102
- Tada, M., Yamamoto, T., Tonomura, Y. /1978/
Physiol. Review 58
- Takács, Ö., Sohár, I., Pelle, T., Guba, F.,
Szilágyi, T. /1977/
Acta biol. Acad. Sci. Hung. 28, 213-219
- Török, A., Sziklai, I., Takács, Ö., Guba, F. /1980/
The Physiologist 23, 99-100
- Yamada, S., Ikemoto, M. /1980/
J. Biol. Chem. 255, 3108-3119

Zlatkis, A.B.Zak, Boyle, A.J. /1963/

J. Lab. Clin. Med. 41, 486-

Zubrzycka-Gaarn, E., Sarzala, M.G. /1980/

Plasticity of Muscle ed. D. Pette,

pp. 219-223

K Ö S Z Ö N E T

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Guba Ferenc egyetemi tanárnak, a Szegedi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézet igazgatójának, hogy disszertációm elkészítését lehetővé tette.

A kísérletes munka, a disszertáció írása során nyújtott tanácsai mind szakmai, mind emberi vonatkozásban igen értékesek, előremutatóak voltak.

Ezúton köszönöm meg Dr. Jakab Györgyi tudományos munkatársnak lelkiismeretes, odaadó támogatását, hasznos szakmai tanácsait, melyek végigkísérték munkámat, s melyek hozzásegítettek a disszertáció megírásához.

Köszönetet mondok Lajtos Tivadarnénak, aki a disszertáció táblázatait, grafikonjait rajzolta, s gondos munkájával segített a kísérletek lebonyolításában is.

Végezetül köszönetet mondok Dr. Nagy Antalénak az elektronmikroszkópos munkák kivitelezéséért, Molnár Herminának, aki a disszertáció fődokumentációját készítette és Daróczy Gabriellának a disszertáció gépelésében végzett lelkiismeretes munkájáért.

