

**Die invloed van toksiene van die skerpioenfamilies
Buthidae en Scorpionidae op die ioonkanale van
die rothart.**

deur

Casper Johannes Badenhorst

B.Sc., B.Sc. Honns.

Verhandeling ingedien ter gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad

Magister Scientiae (Fisiologie)

POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR

CHRISTELIKE HOËR ONDERWYS

STUDIELEIER : Prof. J.J. van der Walt

HULPLEIER : Prof. F. Verdonck

POTCHEFSTROOM

1997

OPSOMMING

Uit kliniese simptome wat waargeneem is in 'n aantal gevallestudies oor 'n paar jaar, blyk dit dat die gif van skerpioene wat aan die Buthidae familie behoort, baie meer potent is as gif van skerpioene van die Scorpionidae familie. Daar is vermoed dat die verskille in toksiteit tussen die heelgiwwe van die Buthidae en die Scorpionidae families verklaar kan word na aanleiding van die teenwoordigheid van verskillende aktiewe chemiese komponente in die heelgiwwe wat inwerk op verskillende fisiologiese meganismes. Die groter toksisiteit van die gif van die genus *Parabuthus* is waarskynlik as gevolg van 'n spesifieke komponent wat glad nie of slegs in 'n klein mate teenwoordig is by *Opisthophthalmus*.

Die verskillende aktiewe fraksies wat voorkom in die heलगif van die spesie *Parabuthus villosus* (van die Buthidae familie) en *Opisthophthalmus carinatus* (van die Scorpionidae familie) is geïdentifiseer deur gebruik te maak van gelfiltrasie chromatografie. Die invloed van die twee spesies se heelgiwwe asook die invloed van die verskillende fraksies van die heelgiwwe op ioonkanaalaktiwiteit, in die besonder Na^+ -kanale en agtergrondioonstrome van rot ventrikulêre miosiete, is bestudeer deur gebruik te maak van spanningsklemming met 'n enkel elektrode in 'n heelsingstelling.

Die heलगif van die spesie *P. villosus* asook sommige fraksies van die heलगif veroorsaak duidelike vertraging van die inaktiveringsfase van Na^+ -kanale en gee aanleiding tot onvolledige inaktivering van ioonstrome, tipiese α -toksien effekte. Na blootstelling van miosiete aan die heलगif van *O. carinatus* word 'n groot verskuiwing van die ioonstroom by 'n houpotensiaal van -100mV in 'n inwaartse rigting waargeneem. Fraksie 15 van die heलगif van *O. carinatus* is die enigste geïdentifiseerde aktiewe fraksie wat dieselfde tipe effek vertoon. Die geïnduseerde vergrote ioonstrome ontstaan waarskynlik as 'n gevolg van porieë wat gevorm word in die selmembrane van miosiete en waardeur non-selektiewe ioonvloei plaasvind. Hierdie waarneembare effekte weerspieël eienskappe wat ooreenstem met sekere ionoforiese effekte.

Fraksie 11 en 20 van die heलगif van *O. carinatus* vertoon duidelike α -toksien effekte, maar hierdie effekte word oorskadu in die heलगif deur die effekte wat veroorsaak word deur fraksie 15. Duidelike verskille is identifiseerbaar in die samestelling en effekte van die twee spesies se heelgiwwe. Hierdie verskille hou moontlik verband met verskille in gedrags-en voedingspatrone asook ander faktore wat aanleiding gegee het tot filogenetiese seleksie van die spesies. Aanduidings van sekere ooreenkomste wat mag bestaan tussen die chemiese strukture van die verskillende heelgiwwe en fraksies is

egter ook teénwoordig. Hoewel plaaslik beskikbare antivenien geproduseer word van gif van die spesie *Parabuthus transvaalicus*, is gevind dat hierdie antivenien ook op enkelmiosiet vlak effektief is vir die onderdrukking van α -toksien effekte wat veroorsaak word deur fraksies van die heelgif van *O. carinatus*. Dit dui op ooreenkomste wat mag bestaan tussen die chemiese struktuur van fraksies van die gif van verskillende skerpioenfamilies en dat sekere dele van die polipeptiedes van die verskillende fraksies van die verskillende spesies en families dieselfde is.

SUMMARY

From observed clinical symptoms in several case studies over a few years it seems that the venom of scorpions from the Buthidae family are more potent than venom of scorpions from the Scorpionidae family. It was commonly thought that the differences in toxicity between the venoms of these two families could be explained due to the presence of different active chemical components in the whole venoms that influence different physiological mechanisms. The larger toxicity of the genus *Parabuthus* may be due to the presence of a specific component or fraction that is only present in smaller quantities or not present at all in the venom of *Opithoptalmus*. Differences in toxicity between the families may this be due to the activity of fraction 17.

The active fractions of the venoms of *Parabuthus villosus* and *Opisthoptalmus carinatus* were isolated by gelfiltration chromatography. The effects of the whole venoms and the different active fractions of the whole venoms on sodium channel activity and background currents of rat ventricular myocytes were studied by making use of voltage clamping with a single electrode in a whole cell setup.

The whole venom of *P. villosus* as well as most of the active fractions from the venom prolongs the time duration of the inactivation phase of sodium channels dramatically and gives rise to incomplete inactivation of the sodium currents, typical α -toxin effects. After myocytes were treated with the venom of *O. carinatus* the ion currents at a holding potential of -100mV were shifted in an inward direction. Fraction 15 of the venom of *O. carinatus* was the only identified fraction to cause similar effects as those that were observed with the whole venom. This perceptible shift of the ion currents is most probable the result of the forming of pores in the myocyte membranes through which non-selective ion flow occurs. These effects display characteristics that are partly similar to those of certain ionoforic effects.

Fractions 11 and 20 of *O. carinatus* give rise to typical α -toxin effects when myocytes are treated with these fractions. These effects were however outclassed in the whole venom by the effects of fraction 15. Several differences in the composition and effects of the venoms of the two different species were identified. The presence of these differences are related to the differences in feeding behavior and other factors that contribute to the phylogenetic selection of the species and can be traced to the differences in toxicity between the scorpion species and families.

The antivenin currently available is produced from the venom of specie, *Parabuthus transvaalicus*. This study showed that this antivenin is effective for the suppression of

the α -toxin effects on myocyte level caused by fraction 11 and 20 of the venom of *O. carinatus*. This signifies certain similarities that may exist between the chemical structures of different fractions of the venoms of different scorpion families and that certain parts of the polypeptide structures of the different fractions of different scorpion species and families are identical.

INHOUDSOPGAWE

OPSOMMING.....	2-3
SUMMARY.....	4-5
LYS VAN TABELLE.....	8
LYS VAN FIGURE.....	9-10

HOOFSTUK 1: INLEIDING

1.1 DOELSTELLINGS.....	11
1.2 HIPOTESE.....	11-12

HOOFSTUK 2: LITERATUURSTUDIE

2.1 SIMPTOME VAN SKERPioen VERGIFTIGING.....	13-14
2.2 NATRIUMKANALE	
2.2.1 KANAALKINETIKA.....	15-17
2.2.2 SELEKTIEWITEIT.....	17-18
2.2.3 BLOKKERING EN MODULERING VAN NATRIUM KANALE.....	18
2.3 SAMESTELLING EN FUNKSIES VAN SKERPioenGIF	
2.3.1 SAMESTELLING.....	19-21
2.3.2 BIOLOGIESE FUNKSIES VAN SKERPioenTOKSIENES...	21-24

HOOFSTUK 3: EKSPERIMENTELE METODE

3.1 ENSIEMATIESE ISOLASIE VAN ROT-VENTRIKULÊRE MIOSIETE.....	25
3.2 OPLOSSINGS	
3.2.1 SELISSOLASIE-OPLOSSINGS.....	25-26
3.2.2 BADOLOSSINGS.....	26

3.2.3	PIPETOPLOSSING.....	26-27
3.2.4	HEELGIF EN TOKSIENFRAKSIES.....	27
3.3	REGISTRASIE-TEGNIK.....	28

HOOFSTUK 4: RESULTATE

4.1	ALGEMENE INLEIDING.....	29-30
4.2	VERGELYKING VAN GELPROFIELE.....	30-31
4.3	SKERPION HEELGIF	
4.3.1	PARABUTHUS VILLOSUS.....	31-32
4.3.2	OPISTHOPHTALMUS CARINATUS.....	32-37
4.4	AKTIWITEIT VAN GELFRAKSIES	
4.4.1	FRAKSIE 15 VAN O. CARINATUS.....	37-38
4.4.2	FRAKSIE 11 EN 20 VAN O. CARINATUS.....	39-40
4.4.3	AKTIEWE FRAKSIES VAN P. VILLOSUS.....	41
4.5	SPANNINGSAFHANGKLIKHEID VAN INAKTIVERING MET FRAKSIES 11 EN 20 VAN O. CARINATUS.....	41-42
4.6	ANTIVENIEN.....	42-43

HOOFSTUK 5: BESPREKING

BIBLIOGRAFIE.....	47-50
BEDANKINGS.....	51
ADDENDUM.....	52-65

LYS VAN TABELLE

BLASDY

TABEL 3.1 Selisolasië-oplossings gebruik in die uitvoer van die eksperimente

26

TABEL 3.2 Badoplossings gebruik in die uitvoer van die eksperimente

26

TABEL 3.3 Pipetoplossings gebruik in die uitvoer van die eksperimente

27

LYS VAN FIGURE

BLADSY

FIGUUR 2.1	'n Voorstelling van die beweging van die aktiverings(m)- en inaktiverings(h)- hekke van 'n Na^+ -kanaal soos voorgestel deur Hodgkin en Huxley	16
FIGUUR 4.1	Gelfiltrasie chromatogramme van die heelgiwwe van die skerpioenspesies <i>O. carinatus</i> (Scorpionidae-familie) en <i>P. villosus</i> (Buthidae-familie). Die verskillende absorpsiepieke dui verskillende chemiese komponente aan	30
FIGUUR 4.2	Die effek van die heelgif van <i>Parabuthus villosus</i> op 'n Na^+ -kanaal. Die houpotensiaal (V_h) = -100mV en die toetspotensiaal (V_t) = -40mV	31
FIGUUR 4.3	Die effek van die heelgif van <i>O. carinatus</i> op Na^+ -kanale en agtergrondstrome	33
FIGUUR 4.4	(a) Toename van die inwaartse ioonstroom (by -40mV) by 'n rotmiosiet na blootstelling aan $50\mu\text{l}$ van die heelgif van <i>O. carinatus</i> en (b) afname van die geïnduseerde inwaartse ioonstroom nadat blootstelling aan die heelgif opgevolg is deur 'n uitwasperiode	34
FIGUUR 4.5	Die effek van die heelgif van <i>O. carinatus</i> op ioonstrome deur die selmembraan by verskillende membraanpotensiale	35
FIGUUR 4.6	Geïnduseerde lekstrome by verskillende membraanpotensiale	36

FIGUUR 4.7	Die stroom-spanningsverhouding vir die heelgif geïnduseerde stroom by verskillende episodes	36
FIGUUR 4.8	Die effek van fraksie 15 van die heelgif van <i>O. carinatus</i> op membraanstrome by verskillende membraanpotensiale	38
FIGUUR 4.9	Die effek van (a) fraksie 11 en (b) fraksie 20 van die heelgif van <i>O. carinatus</i> op Na ⁺ -kanale	40
FIGUUR 4.10	Die effek van fraksies 11 en 20 van die heelgif van <i>O. carinatus</i> op Na ⁺ -kanaal inaktivering of beskikbaarheid	42
FIGUUR 4.11	Die effek van (a) fraksie 11 en (b) fraksie 20 van die heelgif van <i>O. carinatus</i> en antivenien	43

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Uit kliniese simptome wat waargeneem is in 'n aantal gevallestudies oor 'n periode van tyd, blyk dit dat die gif van skerpioene wat aan die Buthidae familie behoort, baie meer potent is as gif van skerpioene van die Scorpionidae familie. Dit is van wetenskaplike en kliniese belang om te weet of die verskille in toksisiteit bestaan as gevolg van die teenwoordigheid van spesifieke chemiese komponente in die gif en of dit eerder is as gevolg van verskille in konsentrasies van komponente wat teenwoordig is in beide families se gif. In die studie is 'n vergelyking getref tussen die effekte van die heलगif van die spesie *Parabuthus villosus* (van die Buthidae familie) en die heलगif van die spesie *Opisthophthalmus carinatus* (van die Scorpionidae familie) op miokardiale miosiete wat uit rothart geïsoleer is. Die doel van die addendum (Bl.52-65) is om ook insae te gee in data van aanvullende eksperimente wat gedoen is om die waargenome effekte te bevestig.

1.1 DOELSTELLINGS

Die primêre doelstellings van hierdie studie was die volgende:

- Die vasstelling van die verskille tussen die gif van *Parabuthus villosus* en *Opisthophthalmus carinatus* en wat moontlik die verskille tussen die Buthidae en Scorpionidae families sal weergee.
- Die bestudering van die heलगif van beide spesies. Dit kan van nut wees vir verdere suiwering.
- Die bepaling van wat die fisiologiese meganismes op sellulêre vlak van beide die spesies se heलगif is, asook die identifisering van die aktiewe fraksies van die heलगiwwe.
- Die ondersoek na die spesifiteit, op sellulêre vlak, van plaaslik geproduseerde antivenien ten opsigte van die twee families.

1.2 HIPOTESE

As hipotese word gestel dat die groot verskil in die toksisiteit tussen die heelgiwwe van die Buthidae en die Scorpionidae families verklaar kan word na aanleiding van die teenwoordigheid van verskillende aktiewe chemiese komponente in die verskillende heelgiwwe en van die inwerking daarvan op verskillende fisiologiese meganismes. Dit is in teenstelling met 'n verklaring van die verskille in toksisiteit as gevolg van konsentrasieverskille van komponente wat in die heelgiwwe van beide families voorkom.

HOOFSTUK 2

LITERATUURSTUDIE

Vanaf die vroegste tye was giftige diere, insluitende skerpioene, 'n bedreiging vir die mens. Histories was daar altyd belangstelling in skerpioene, wat veral oorsprong gevind het in die gesondheidsrisiko wat hulle vir die mens ingehou het. Die chemiese karakter en fisiologiese effekte van die verskillende toksienes wat teenwoordig is in die giwwe is eers onlangs as interessante bronne van wetenskaplike belang bestudeer. Die neurotoksienes in skerpioengif is polipeptiede en verteenwoordig van die mees potente giwwe bekend aan die mens. Die huidige belangstelling in skerpioengiwwes het ontwikkel met die beskikbaarstelling van tegnieke vir die isolering en karakterisering van die individuele neurotoksienes in die gif. Studies rakende die chemiese aard van die toksienes en hul interaksie met reseptore op teikenselle word reeds vir 'n aantal jare deur verskeie groepe gedoen. 'n Nuwe belangstellingsveld rakende die spesifieke molekulêre teikens van skerpioengiwwes, die proteïene van ionkanale van eksiteerbare selle, ontloktans wêreldwye belangstelling.

Toepassings van navorsing op skerpioengiwwes is van geneeskundige belang op twee vlakke: eerstens die ontwikkeling van antiveniens wat die gesondheidsrisiko aansienlik kan verlaag en pyn en ongerief verminder en tweedens die ontwikkeling van nuwe tipes geneesmiddels uit die chemiese strukture van komponente wat uit heelgifs geïsoleer is en waarvan 'n groot aantal fisiologies aktief is.

2.1 SIMPTOME VAN SKERPIOENVERGIFTIGING

Hoewel ernstige skerpioenvergiftiging nie so algemeen in Suid-Afrika is soos in sekere dele van Noord-Afrika, die Midde-Ooste, Indië en Amerika nie, is skerpioensteke tog van kliniese belang in Suider-Afrika aangesien 'n enkele steek van verskeie van die plaaslike skerpioenspesies potensieel dodelik kan wees. In Suid-Afrika kom die meeste skerpioensteke in die somermaande voor, met 'n piek periode wat strek oor Januarie en Februarie. 'n Onmiddellike lokale intense pyn is die mees prominente simptome van enige skerpioensteek. Sistemiese simptome ontwikkel binne vier ure na 'n skerpioensteek en word gekarakteriseer deur algemene verlamming, spierpyne en krampe. 'n Toename in liggaamstemperatuur en bloeddruk is ook algemene verskynsels by die pasiënte. Die spektrum en die graad van simptome en tekens van vergiftiging word bepaal deur verskeie faktore soos die skerpioenspesie wat betrokke is, die liggaamsmassa van die slagoffer, die totale volume gif wat ingespuut is en die fisiese gesondheid van die pasiënt (Müller, 1993).

Statistieke van skerpioensteke in die onderskeie provinsies van Suider-Afrika is of glad nie beskikbaar nie, of onvolledig. Hoewel die meeste skerpioensteke slegs lokale pyn induseer tesame met 'n effense lokale inflammatoriese reaksie, is daar ook ernstiger gevalle waar 'n enkele steek aanleiding gegee het tot die dood van individue.

Twee skerpioen families kom voor in Suider-Afrika, naamlik die Buthidae en die Scorpionidae families. Die gevaarlikste en medies belangrikste spesie behoort tot die Buthidae familie. Die familie word relatief maklik onderskei van die Scorpionidae familie deur hul kenmerkende dik sterte en smal knypers teenoor die groot, sterk knypers en dun sterte van spesies van die Scorpionidae familie.

Die Buthidae-familie word verteenwoordig deur vyf genusse waarvan Parabuthus, Buthotus en Uroplectus die belangrikste is. Parabuthus is die grootste (50-140mm lank) en vanuit medici se oogpunt, die belangrikste en gevaarlikste genus. Die genus is saamgestel uit ongeveer 20 spesies en word onderskei van ander skerpioene deur die teenwoordigheid van stimulatoriese granules op die dorsale oppervlakte van die eerste twee "stert"-segmente (Lamoral, 1979). Die medium grootte Buthotus genus (30-60mm lank) is beperk tot Namakwaland en die Noordelike Provinsie. Uroplectus, die kleinste en minder giftige een van die drie genus tipes kom wyd verspreid regoor Suider-Afrika voor (Newlands, 1978).

2.2 NATRIUMKANALE

Natriumkanale is van die mees algemene teikens van skerpioentoksienes. Impulsgeleiding in meeste dele van die hart is afhanklik en word onderhou deur 'n kortstondige toename in die membrane se permeabiliteit vir onder andere Natrium (Na^+)-ione. Die gesamentlike toepassing van elektrofisiologiese en molekulêre biologiese tegnieke toon dat die membraanpermeabiliteit vir Na^+ afhanklik is van spesifieke proteïene wat ioonselektiewe kanale in die membrane vorm. Natriumvloei deur die selmembraan geskied deur een van 'n groep van integrale membraanproteïene, naamlik die spanningsafhanklike Na^+ -kanaal. 'n Enkele Na^+ -kanaal bestaan uit 'n glikoproteïen met 'n molekulêre gewig van omtrent 300 000. Op 'n enkele selmembraan word ongeveer 1-50 Na^+ -kanale / μm^2 aangetref.

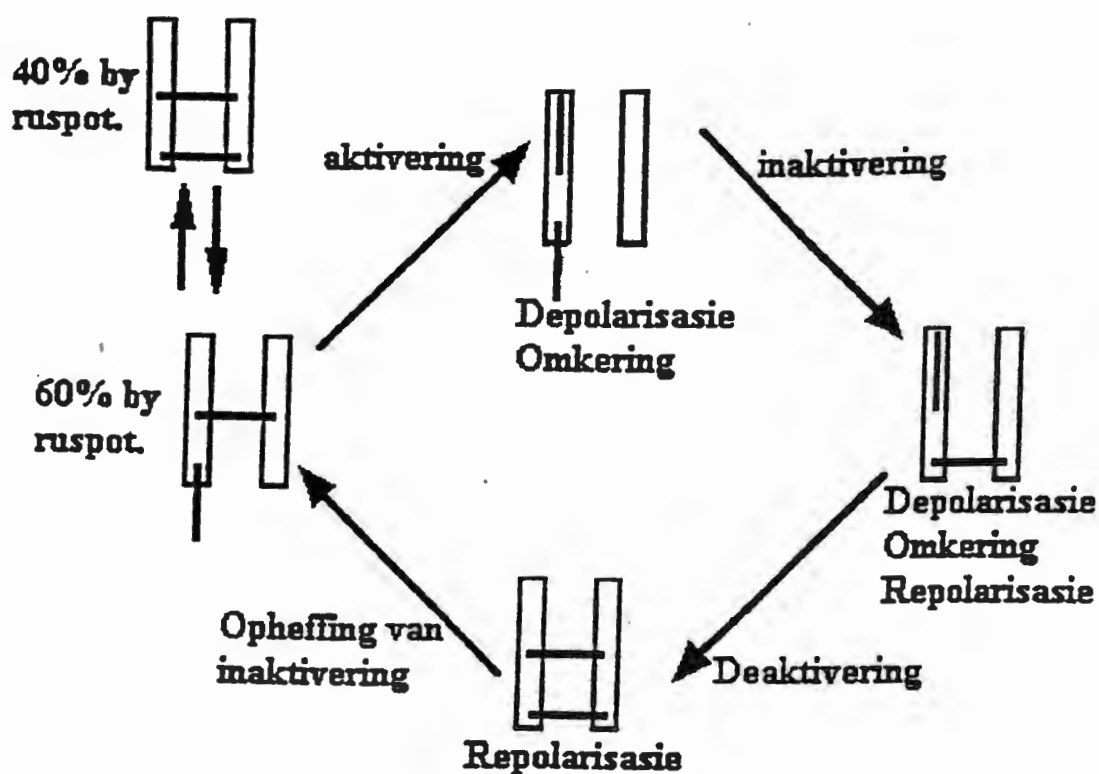
Gedurende die afgelope dekade is 'n aantal tegnieke bekend gestel wat kwantitatiewe studies op kardiaal Na^+ -kanaal funksies moontlik maak. Die nuwe benadering sluit onder meer in : (a) die bereiding van kalsiumweerstandbiedende miosiete deur Powell en Twist (1976) en (b) die ontwikkeling van die tegniek van "patch"-spanningsklemming deur Neher (Neher et al., 1978).

Die toepassing van molekulêre biologiese tegnieke vir die klonering van kanaalproteïene bied die moontlikheid dat hierdie klone ingebou kan word in liggaamselle bv. die oösiere van *Xenopus laevis*. Met monoklonale ioonstrome kan die struktuur en samestelling van die kardiaale Na^+ - en ander kanale bestudeer word. Dit bied die vooruitsig om die struktuur van die kanaal direk te kan verbind met die kanaalse funksie (Grant, 1991).

2.2.1 Kanaalkinetika

As die membraanpotensiaal van 'n sel eenvormig gedepolariseer word, kan 'n kortstondige toename in Na^+ -permeabiliteit waargeneem word. Die inwaartse Na^+ -stroom is die resultaat van die oopmaak van duisende Na^+ -kanale. Elke individuele kanaal maak vir minder as 1 ms oop en laat 'n stroom van $\pm 1\text{-}2\text{ pA}$ deur. Die waardes korreleer met die invloei van miljoene Na^+ -ione in die sel deur 'n enkele oop kanaal. Analisering van Na^+ -kanaalfunksies berus op die bestudering van die oop- en toemaakkinetika van die kanale.

Hodgkin en Huxley (1952) het 'n model ontwikkel wat die kortstondige toename in membraanpermeabiliteit vir natrium tydens 'n aksiepotensiaal beskryf. Volgens die klassieke model word ioonkonduktansie deur 'n kanaal deur twee "hekke" beheer, 'n sogenaamde aktiverings- of m-hek en 'n inaktiverings- of h-hek. Figuur 2.1 is 'n voorstelling van die hekke en hul posisies. In 'n toestand van rus is die aktiverings (m) hek in 'n toe posisie, en die inaktiverings (h) hek in 'n oop posisie. Depolarisering van die selmembraan gee aanleiding daartoe dat die m-hek sal oopmaak. Die gesamentlike oop konfigurasies van beide die m- en h-hekke maak die vinnige invloei van Na^+ -ione deur die kanaal in die rigting van hul elektro-chemiese gradiënt in die sel moontlik. Dit gee aanleiding tot verdere depolarisering van die selmembraan en die toename in Na^+ -permeabiliteit word regeneratief. Na verloop van tyd ('n paar ms) beweeg die h-hek na 'n toeposisie en veroorsaak 'n gepaardgaande afname in Na^+ -permeabiliteit. Wanneer die h-hekke toe is, kan die membraanpermeabiliteit nie verhoog tydens depolarisasie nie, en die membraan word as refraktêr beskryf. Repolarisering na meer negatiewe potensiale moet eers plaasvind en 'n sekere tyd verloop, alvorens die membraanpermeabiliteit vir Natrium weer tydens depolarisering kan toeneem. Tydens die fase van repolarisering beweeg die m-hek weer na 'n toe posisie en die h-hek na 'n oop posisie en die selmembraan verkeer weer in 'n rustoestand. Die kanaal is dan weer vir aktivering beskikbaar.



Figuur 2.1 'n Voorstelling van die beweging van die aktiverings (m)- en inaktiverings (h)- hekke van 'n Na^+ -kanaal soos voorgestel deur Hodgkin en Huxley.

In die Hodgkin en Huxleymodel staan die proses wat lei tot 'n verhoging in Na^+ -permeabiliteit bekend as aktivering. Dit is 'n vinnige proses en word gereflekteer in die fase van toename van die Na^+ -stroom. Die aktiveringsfase van die heelselstroom ontstaan omdat die kanale ná 'n skielike depolarisasie, nie onmiddellik oopmaak nie. Daar is 'n latensie (of wagtyd) ("first latensie"). Die waarskynlikheid dat 'n kanaal oopmaak, neem toe direk na depolarisasie, bereik 'n maksimum en neem dan weer af. Die stadiger inaktiveringsproses, wat 'n resultaat is van die toemaak van kanale (h-hekke), word op sy beurt gereflekteer in die fase van afname van die Na^+ -stroom. Na^+ -kanale kan eenkeer, of in sarsies, oopmaak.

Die afname in heelselstroom vir Na^+ vanaf die maksimum inwaartse piek na nul, word, in teenstelling met strome deur Ca^{2+} -kanale, deur twee meganismes verklaar. Die een meganisme is inaktivering deur die toemaak van die h-hekke soos in die model van Hodgkin en Huxley. Die ander meganisme is die van vertraagde aktivering. Die tempo van afname in die inwaartse stroom neem toe soos wat membraandepolarisering

verhoog. Oorspronklik is vermoed dat die toename in die tempo van afname in die stroom spanningsafhanklike inaktivering verteenwoordig. Enkelkanaal analyses stel egter 'n meer komplekse proses voor. By potensiale in die omgewing van die eksitasie drempelwaarde is die aktiveringsproses stadig en die afname van die Na^+ -stroom reflekteer vertraagde aktivering. Sommige kanale maak vir die eerste keer oop as die gemiddelde stroom besig is om af te neem. Die heropening van kanale is gereeld. By meer gedepolariseerde potensiale, byvoorbeeld by -40mV , is die aktiveringsproses baie vinnig en die gepaardgaande latensie periodes kort. In hierdie geval maak kanale tydens depolarisering net eenkeer oop en die tempo van die afname van die Na^+ -stroom reflekteer inaktivering. Stadige aktivering bepaal dus die tempo van stroomafname by drempelwaarde potensiale, teenoor kanaalinaktivering wat die tempo van stroomafname bepaal by sterk gedepolariseerde potensiale.

Hoewel die hoof toename in membraanpermeabiliteit vir Na^+ -ione voorkom tydens die inisiële periode van depolarisering, is die duur van die plato van die aksiepotensiaal ook afhanlik van Natrium, dit wil sê daar moet 'n verdere "stadige" komponent van die Na^+ -stroom wees wat tydens die plato van die aksiepotensiaal aktief is. Spanningsklemming in multisellulêre preparate toon dat hierdie "stadige" komponent van die inwaartse Na^+ -stroom voorkom by potensiale waarby kanale geaktiveer is, maar waar inaktivering van die kanaal terselfdertyd onvolledig is. Die resultaat van die "venster" van oorvleueling van aktivering en inaktivering is 'n volgehoue inwaartse Na^+ -stroom (Grant, 1991).

2.2.2 Selektiwiteit

Die Na^+ -kanaal proteïene moet die vermoë besit om vinnig 'n masiewe vloei van Na^+ -ione deur te laat, maar moet terselfdertyd die invloei van ander ione, veral K^+ -ione, verhoed. Dit beteken dat die kanale baie selektief moet wees. Kanaalselektiwiteit word verklaar deurdat ione tydens deurbeweging aan reseptore binne die kanaal bind (Schmidt en Thews, 1989:32). Onder fisiologiese toestande is die Na^+ -kanaal selektief vir Natrium en word die kanaal meestal beset deur een of meer Na^+ -ione.

Aangesien Na^+ met hoë affiniteit aan die kanaal bind, word ander divalente en monovalente katione deur elektriese ladings afgestoot. Anione word deur vaste negatiewe ladings by die kanaal ingange weggehou van die kanaal.

2.2.3 Blokkering en Modulering van Natriumkanale

Effekte van chemiese komponente, natuurlik of sinteties, op Na^+ -kanale word hoofsaaklik ingedeel in kanaalblokkering en kanaalmodulering. Laasgenoemde sal 'n verskuiwing in die spanningsafhanklike eienskappe van die kanaal insluit. Blokkering van Na^+ -kanale word aan die hand van twee meganismes omskryf.

Die eerste meganisme beskryf die binding van 'n chemiese komponent in die kanaal opening self wat gevolglik die vloei van ione deur die kanaal blokkeer, soortgelyk aan die kurk op 'n bottel. Aktiveringsblokkering van kanale geskied tydens die eksitasie van selle omdat die bindingsplekke tydens depolarisasie 'n groter affiniteit vir die toksien het as tydens die rustoestand ('n gemoduleerde reseptor). 'n Alternatiewe hipotese is dat die reseptor 'n vaste affiniteit het, onafhanklik van die toestand van die kanaal, maar dat dit tydens die aktiewe toestand meer toeganklik is vir die toksien as gevolg van 'n allosteriese verandering van die kanaalproteïene met depolarisasie ("guarded" reseptor, Grant, 1991). Op dieselfde manier kan blokkering in die rustoestand of geïnaktiveerde toestand by voorkeur plaasvind na gelang van die struktuur van die reseptor en ligand.

Onder die natuurlike toksienes is daar sekeres wat nie kanale blokkeer vir spesifieke ione nie, maar wat die kanaalkinetika moduleer. Die kinetika van Na^+ -kanale word meestal op twee moontlike maniere gemoduleer:

- Vertraging van inaktivering deur 'n afname in die tempokonstante van inaktivering (h-hekke).
- Verskuiwing van die spanningsafhanklikheid van aktivering na meer negatiewe potensiale (m-hekke).

Die wyses van modulering van Na^+ -kanale word dus weerspeël in die verskillende effekte van skerpioengiwwe. Sommige toksienes vertraag naamlik die inaktivering van Na^+ -kanale, α -toksienes, en sommige verskuif die spanningsafhanklikheid van aktivering na meer negatiewe potensiale, β -toksienes (Yatani et al., 1988; Kirsch et al., 1989).

2.3 SAMESTELLING EN FUNKSIES VAN SKERPPIOENGIF

Skerpioene spuit hul gif in hul prooi of vyand deur 'n angel wat gelokaliseer is op die punt van die telson. Die vesikel gedeelte van die telson bevat twee gifkliere, waarvan elkeen aan weerskante van die punt van die angel met 'n buis open. Tydens die steekaksie trek spiere, wat aan weerskante van die gifkliere geleë is en aan die eksoskelet vasgeheg is, saam, en die gif word in die slagoffer of prooi ingespuut. Sekere *Parabutus* spesies besit groter gifkliere as ander skerpioene. Daar word beweer dat sommige skerpioene met groot gifkliere gif spontaan uitspuut of sprei indien hulle onverwags gesteur word (Müller, 1993:407).

Skerpioengiwe is apokriene sekresies van komplekse, wateroplosbare bestandele. Skerpioengif is 'n samestelling van verskeie tipes lae molekulêre gewig proteïene (neurotoksienes), mukus (5-10%), soute en 'n verskeidenheid van ander organiese komponente soos nukleotiedes en aminosure (Simard en Watt, 1990).

2.3.1 Samestelling

Die aminosuur samestelling van 'n groot aantal skerpioentoksienes is reeds bekend. Die aminosuur samestelling van die toksienes verskil van die aminosuur samestelling van ander polipeptiedes in die sin dat skerpioentoksienes wat op die Na^+ -kanale werk agt sisteïnresidue bevat met vier disulfiedbrûe per molekule. Dit is 'n ongewone hoeveelheid sisteïnresidue vir enkelketting globulêre proteïene met sulke lae molekulêre gewigte. Groot hoeveelhede glisien, tirosien, dikarboksielaminosure (en hul amides) en lisien is ook teenwoordig in skerpioentoksienes. Methionien en histidien (in 'n mindere mate) is afwesig in die meeste skerpioentoksienes. Onserkerheid heers nog oor die samestelling van toksienes in verskillende spesies se gif (Müller, 1993:407; Simard en Watt, 1990).

Skerpioene gebruik hul gif hoofsaaklik vir die immobilisering van prooi en vir selfbeskerming teen predatore. Die twee uiteenlopende funksies skep gunstige omstandighede vir die ontwikkeling van unieke toksienes in elke individuele spesie se gif wat verband hou met die tipe prooi wat deur die betrokke spesie verkies word. Verskeie skerpioengiwe (in teenstelling met spinnekop- en slanggif) vertoon min en in baie gevalle, geen ensiemaktiwiteit nie (Simard en Watt, 1990). Komponente wat wel aanwesig is in sekere skerpioengiwe sluit seretonien en faktore wat ensieminhibeerders is, in. Seretonien dra klaarblyklik nie by tot die toksisiteit van die gif nie, maar eerder tot die gepaardgaande pyn en inflamatoriese reaksie van 'n skerpioensteek (Ismail, 1995).

Die gif van 'n enkele skerpioen is 'n mengsel van baie verskillende substansie, insluitende 'n groot aantal (meer as 20) verskillende lae molekulêre gewig polipeptiede. Baie van die klein polipeptiede vertoon neurotoksiese aktiwiteite in 'n verskeidenheid van gasheerspesies. Volgens die meeste literatuur kan hierdie neurotoksienes hoofsaaklik verdeel word in twee groepe wat dikwels gesamentlik voorkom in die gif van 'n spesifieke spesie. Die eerste groep vorm slegs 'n klein persentasie (0,01% - 0,5%) van die heegif en staan algemeen bekend as K^+ -kanaal toksienes. Die tweede geïdentifiseerde groep toksienes beslaan gewoonlik 'n groter persentasie van die heegif en word geklassifiseer as Na^+ -kanaal toksienes (Miller, 1995:5).

Uit 'n elektrofisiologiese oogpunt werk die Na^+ - en K^+ -kanaal toksienes saam, met 'n gevolglike depolariserende effek op selmembrane. Die hoof biologiese aksie van Na^+ -kanaal toksienes is waarskynlik om Na^+ -kanale oop te hou terwyl K^+ -kanaal toksienes heel waarskynlik die repolariserende K^+ -strome blokkeer (Miller, 1995:5). Gesamentlik sal dit aanleiding gee tot volgehoue ontladings en depolarisering van neurone wat normale aktiwiteit sal ontwig. Na^+ -kanaal toksienes funksioneer hoofsaaklik deur te bind aan Na^+ -kanale wat in 'n oop toestand verkeer, en stabiliseer sodoende die oop toestand. Die toksienes is dus gebruiksafhanklik in hul aksies en vereis 'n selmembraan om eers te depolariseer voordat binding kan plaasvind (Catterall, 1977; Catterall, 1980). K^+ -kanaal toksienes, daarteenoor, kan bind aan K^+ -kanale in die oop- of toe-toestand (Miller, 1995:6).

Die verskillende Na^+ -kanaaltoksienes wat in die heegif van skerpioene voorkom bestaan meestal uit 60-70 aminosure en bevat vier disulfied brûe en het 'n molekulêre gewig van ongeveer 7000 (Blumenthal, 1995:393). Hierdie proteïene is enkelkettings en word kruis verbind deur die vier disulfiedbrûe wat intak moet wees om die toksien (proteïen) biologies aktief te maak (Meves et al., 1986).

Die drie dimensionele strukture van 'n aantal Na^+ -kanaaltoksienes (insluitende α - en β -toksienes) is reeds bekend. Soos verwag kan word, na aanleiding van die groot aantal kruisverbindings in die struktuur van hierdie proteïene, besit beide klasse toksienes digte kerne van sekondêre strukture wat verbind word met twee van die vier disulfiedbrûe. Die kern is saamgestel uit drie stringe antiparallelle β -plate (residue 1-4, 37-41 en 46-50) en 'n kort string α -heliks (residue 23-32). Bo en behalwe verskeie boë wat strek vanuit hierdie kerngebied is 'n prominente verskynsel by die struktuur van beide toksienegroepe, die teenwoordigheid van 'n relatiewe nie-polêre oppervlakte wat 'n aantal aromatiese residue bevat (Blumenthal, 1995).

Verskeie ooreenkomste word aangetref tussen die voorafgaande Na^+ -kanaaltoksienes en die struktuurbeskrywing van 'n tipiese K^+ -kanaaltoksien deur Miller (1995:5-10).

Hierdie toksienes bestaan uit 37-39 aminosure, vorm drie disulfiedbrûe en het 'n molekulêre gewig van ongeveer 3500. Volgens Miller vertoon die meeste K^+ -kanaal toksienes byna identiese polipeptiedbasisse wat bestaan uit twee of drie draaie α -helikse en wat verbind word met 'n β -plaat (bestaande uit drie anti-parallelle stringe) deur disulfiedbrûe. Die drie disulfiedbrûe onderhou die peptied se struktuur en vorm die volume van hierdie globulêre proteïene. Alle ander sykettings van die molekule is blootgestel aan die oppervlakte en projekteer binne die vloeistofoplossing (Miller et al., 1995: 5-7).

2.3.2 Biologiese funksies van skerpioentoksienes

Skerpioentoksienes se biologiese funksies is spesifiek gerig op hul hoofteikens, eksiteerbare selle. Die molekulêre teiken van hierdie toksienes is spanningsafhanklike Na^+ - en K^+ -kanale. Navorsingsresultate van die effekte van skerpioentoksienes op Na^+ -kanale verdeel dit in drie klasse. Die eerste klas, naamlik α -toksienes, bestaan hoofsaaklik uit effekte op die proses van Na^+ -stroom inaktivering en kom meestal voor by die toksienes van sogenaamde ou wêreld skerpioene. Die tweede klas, naamlik β -toksienes, beïnvloed aktivering van die Na^+ -stroom met minimale effekte op die inaktiveringsproses en kom hoofsaaklik voor by die toksienes van sogenaamde nuwe wêreld skerpioene. By die derde klas word slegs 'n afname in die inwaartse Na^+ - of uitwaartse K^+ -strome waargeneem (Simart en Watt, 1990).

Vanuit die heilgif van die spesie *Centruroides sculpturatus* het Watt en kollegas (Watt et al., 1978) met behulp van gelchromatografie verskeie fraksies geïsoleer, naamlik toksien I, III, IV, V en variënte 1, 2 en 3. Die verskillende fraksies se effekte op die Na^+ -strome in Knope van Ranvier verskil dramaties van mekaar (Meves et al., 1986). In Knope wat blootgestel is aan toksien I, III of IV word 'n sterk positiewe depolarisasie na +38 mV opgevolg deur 'n transiënte verskuiwing in die dalende been van die stroom-spanningskurwe (I-V) vir Na^+ na meer negatiewe membraanpotensiale (tot -50 mV), die β -effek wat ook waarneembaar is by die heilgif van die spesie (Cahalan, 1975). Toksienes I, III en IV vertoon min tot geen effekte op die inaktiveringstempo van die Na^+ -kanale nie. Toksien V en die variante, in teenstelling met die bogenoemde, gee aanleiding tot uitgesproke vertraging van inaktivering. Selfs met uitermatige hoë konsentrasies van die fraksies vind daar geen verskuiwing in die I-V-kurve plaas nie. Al die toksienfraksies en variante het aanleiding gegee tot onvolledige inaktivering van Na^+ -permeabiliteit (Hu et al., 1983).

Toksien V van die skerpioen spesie *Centruroides sculpturatus* vertoon tipiese effekte van die α -toksienes. Die kenmerkende effek van α -toksienes, die vertraging van

inaktivering, is waarneembaar tydens 'n eksperiment waar 'n Knoop van Ranvier blootgestel is aan 3,3 mg/ml van Toksien V van *C. sculpturatus* (Meves et al., 1986).

Die tipe effek is die eerste keer waargeneem by die heelgif van *Leiurus quinquestriatus*, maar is intussen ook waargeneem by verskeie ander skerpioentoksienes soos byvoorbeeld M₇ en 2001 van *Buthus eupeus*, V en XII van *Buthus Tamulus* en V en variant 13 van *C. sculpturatus* (Meves et al., 1986; 113-117; Cahalan, 1974:511-523). Benewens vertraging in die inaktiveringsproses deur α -toksienes, is inaktivering meestal onvolledig, met die gevolg dat daar 'n noemenswaardige inwaartse stroom aan die einde van 'n depolariserende puls oorbly.

Die waargenome effekte van α -toksienes, en dus binding aan die reseptore, is volgens sommige outeurs spanningsafhanklik omdat die effekte afneem met depolarisering van selmembrane (Simard en Watt, 1990 : 428-433). Kirsch en medewerkers vind egter met TsIV-5 van *Titius serrulatus* op neuroblastomaselle geen spanningsafhanklikheid nie (Kirsch et al., 1989). Uit die meeste eksperimente kom dit ook duidelik na tevore dat die piek van die inwaartse Na⁺-stroom en die aktiveringskinetika meestal nie beïnvloed word deur die α -toksienes nie. Wat β -toksienes betref, word die effekte bevorder deur depolarisasie (Simard en Watt, 1990).

β -toksienes beïnvloed Na⁺-strome in selmembrane op 'n totale ander wyse. Hierdie groep toksienes het verkleining van Na⁺-strome tot gevolg en verskuif meestal die spanningsafhanklikheid van aktivering na meer negatiewe potensiale ná toediening van kondisionerende depolariserings pre-pulse (Bauer et al., 1992). In eksperimente wat uitgevoer is deur Hu en kollegas (Hu et. al., 1984) waarin Knope van Ranvier blootgestel is aan verskeie β -toksienes wat geïsoleer is vanuit die heelgif van die skerpioen spesie *C. sculpturatus*, het Na⁺-strome deur die selmembrane met die helfte verklein en het die I_{Na}(E) en P_{Na}(E) kurwes na meer positiewe potensiale verskuif. Indien die toetspuls egter voorafgegaan word deur 'n sterk depolariserende kondisioneringspuls na + 38 mV, word Na⁺-strome waargeneem by meer negatiewe potensiale as by die kontrole of toksienbehandelde toetsregistrasiës in die afwesigheid van 'n kondisioneringspuls. Die kondisioneringspuls het dus 'n uitgesproke effek op die I_{Na}(E)- en P_{Na}(E)- kurwes van die toksien III (*C. Sculpturatus*) - blootgestelde Knoop en die dalende been van die E_{Na}(E)- kurwe word met -57mV verskuif, dit wil sê die Na⁺-kanaal aktiveer by baie meer negatiewe membraanpotensiale. Die grootte van die verskuiwing is afhanlik van verskeie faktore insluitende die tydsduur tussen die kondisionerings- en die toetspulse, die sterkte van die kondisioneringspuls en die toksienkonsentrasie.

Die verskuiwing van die aktiveringskurwe deur die kondisioneringspuls in die teenwoordigheid van 'n β -toksien, word weerspieël deur 'n groot inwaartse stroom wat

waargeneem word met repolarisasie na -72 mV, 'n membraanpotensiaal waarby onder normale toestande, die aktiveringsdrempel nie oorskrei is nie. Die stroom ontstaan sodra inaktivering opgehef word (repolarisasie vanaf $+38$ mV na -72 mV) en die kanale se h-hekke oopmaak.

Die stroom neem dan stadig af soos die aktiveringskurwe stadig terug verskuif na die normale waarde en die m-hekke toemaak (Meves et al., 1986).

In teenstelling met α -toksienes het toksien IV van *C.sculpturatus*, 'n β -toksien, geen effek op die tydsduur van die inaktiveringsprosesse van die Na^+ -kanale nie. Die spanningsafhanklikheid van inaktivering word na blootstelling van die Na^+ -kanale aan β -toksienes, net soos die spanningsafhanklikheid van aktivering, na meer negatiewe potensiale verskuif (Yatani et al., 1988). By α -toksienes word 'n geringe verskuiwing na negatiewe potensiale waargeneem vir die inaktiveringskurwe en word 'n opvallende voet in die omgewing van -40 mV waargeneem wat daarop dui dat inaktivering onvolledig is (Kirsch et al., 1989). Negatiewe verskuiwings van inaktiveringskurwes dui daarop dat minder kanale by gedepolariseerde potensiale beskikbaar sal wees.

Op enkelkanaalvlak word die effek van α -toksienes verklaar deur 'n model waar die oorgang van die toe(c)- of oop(o)-toestand na die geïnaktiveerde(i)-toestand geïnhibeer word. Dit gee aanleiding tot verlengde ooptye, meer sarsies en langer wagtye voor die kanale oopmaak. Hierdie veranderinge is potensiaalafhanklik (Kirsch et al., 1989). Wat β -toksiene betref, word die oorgang van 'n toe-toestand (c) na 'n oop-toestand (o) geïnhibeer. Dit verleng wagtye, verleng die ooptye en veroorsaak 'n afname in die aantal kere wat die kanaal oopmaak (Yatani et al., 1988).

Die derde klas effekte van skerpioen toksienes is 'n afname van ioonstrome, hetsy Na^+ - of K^+ -strome, met geen veranderinge in die kinetika of spanningsafhanklikheid van aktivering of inaktivering nie. Min is bekend oor die onderliggende meganismes hierby betrokke (Simard en Watt, 1990).

Die effekte van skerpioentoksienes is tot nou toe hoofsaaklik beskryf vir senuwee- en skeletspierselle met weinig eksperimentele werk op soogdier hartweefsel. In soogdier harte bind die " γ " toksien van die skerpioen spesie *Tityus serrulatus* (Ts- γ) met hoë affiniteit aan Na^+ -kanale (Lombet, 1984). Tot dusver is daar geen aanduidings in die literatuur dat β -toksiene in hartselle, na 'n vooraf depolarisasie na $+38$ mV, 'n groot verskuiwing van die aktiveringskurwe na negatiewe potensiale kan induseer, soos in die geval van senuweeselle, nie. Daar is wel aangetoon dat klein Na^+ -strome by meer negatiewe potensiale ontstaan as in die kontrole, en dat dit aanleiding gee tot oorkruising ("cross-over") op die stroom-spanningsverhouding (Yatani et al., 1988). In

teenstelling met skerpioengiwwes, is baie eksperimentele werk met Anthopleurin A (Ap-A), 'n toksien wat geïsoleer is vanuit die heelgif van die see anemoon *Anemone xanthogrammica*, wat ook bind op bindingsplek 3 aan die ekstrasellulêre oppervlakte van die spanningsafhanklike Na^+ -kanale soos die geval is vir α -toksienes op hartselle gedoen. Dit veroorsaak ook 'n merkwaardige vertraging van die inaktivering van Na^+ -kanale van kardiaal weefsel (Hanck en Sheets, 1995).

Navorsing deur Jover en kollegas (Jover et al., 1980) op die spesifieke binding van skerpioentoksienes aan eksiteerbare membrane, het die bestaan van twee klasse bindingsplekke bewys. Die twee klasse word onderskeidelik beskryf as α en β bindingsplekke. Toksienes wat bind aan α -bindingsplekke induseer 'n vertraging van Na^+ -stroominaktivering, terwyl toksienes wat bind aan β -bindingsplekke 'n effek het op die spanningsafhanklike aktivering van inwaartse Na^+ -strome (Bauer et al., 1992 : 581-588). Die klassifikasie van toksienes wat gebaseer is op elektrofisiologiese effekte, stem dus ooreen met die klassifikasie van toksienes na aanleiding van die toksienes se bindingsposisies op selmembrane en ionkanale.

Die meeste navorsing dui daarop dat skerpioentoksienes wat spesifiek 'n invloed uitoefen op K^+ -kanale, die kanale sal blokkeer. Tydens die blokkeringsproses sal 'n enkele toksien molekule bind met 'n spesifieke bindingsplek op die eksterne gedeelte van die K^+ -kanaal en gevolglik verhoed dat enige K^+ -ione deur die kanaal kan beweeg (Miller, 1995:5-7). Die toksienes verskil dus van toksienes wat hoofsaaklik Na^+ -kanale sal affekteer in die lig daarvan dat die toksienes K^+ -kanale sal blokkeer in teenstelling met toksienes wat Na^+ -kanale sal affekteer deur die kanale se oop- en toemaakkinetika te moduleer.

HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTELE METODE

3.1 ENSIEMATIESE ISOLASIE VAN ROT-VENTRIKULÊRE MIOSIETE

Ventrikulêre miosiete word ensiematies geïsoleer vanuit Sprague Dawley rotharte met behulp van die Langendorff-perfusietegniek soos gebruik deur Mitra en Morad (Mitra en Morad, 1985). Na servikale dislokasie en die deursny van die karotisarteries, word die hart vinnig uit die borsholte verwyder en in 'n koue disseksieoplossing geplaas.

Die bereidingsmetode vir rot-ventrikulêre miosiete is kortliks soos volg:

- Nadat 'n kanule in die aorta geplaas is, word die hartjie vir 5 minute geperfuseer met Tyrode by 37°C en 100% O₂;
- Perfuseer met 'n kalsiumvrye oplossing vir 5 minute;
- Die hartjie word nou geperfuseer, vir 15-20 minute, met 'n 40ml kalsiumvrye oplossing waarin twee ensieme (Collaginase II en Protease XIV) vooraf opgelos is;
- Na blootstelling aan die ensieme word die hartjie vir 5 minute met 'n lae, 0,18 mM, CaCl₂ - oplossing geperfuseer;
- Die atria en ventrikels word nou van mekaar losgesny. Die ventrikels word in klein stukkies gesny en in 0,18 mM CaCl₂ - oplossing geskud om die miosiete los te kry;
- Die selle word vir 10-20 minute by 37°C gelaat om af te sak in die oplossing;
- Die supernatant word met behulp van 'n pasteurpipet afgesuig en die selle word in 'n normale Tyrode-oplossing gehersuspendeer.

3.2 OPLOSSINGS

3.2.1 Selissolasie - oplossings

In die onderstaande tabel word die samestelling van die verskillende oplossings wat gebruik is tydens selissolasie aangetoon:

TABEL 3.1 Selissolasie oplossings gebruik in die uitvoer van die eksperimente

SOUTE	OPLOSSINGS (mM)	
	Ca-VRYE - OPLOSSING	0,18 Ca - OPLOSSING
CaCl ₂	0	0,18
KCl	5,4	5,4
NaCl	130	130
KH ₂ PO ₄	1,2	1,2
MgSO ₄	1,2	1,2
HEPES	6	6
pH	7,2 met NaOH (1N)	7,2 met NaOH (1N)

3.2.2 Badoplossings

In die onderstaande tabel word die samestelling van die verskillende ekstrasellulêre badoplossings wat gebruik is aangetoon:

TABEL 3.2 Badoplossings gebruik in die uitvoer van die eksperimente

SOUTE	EKSTRASELLULÊRE OPLOSSINGS (mM)	
	TYRODE	SESIUM TYRODE
NaCl	137,0	20,0
MgCl ₂	0,5	1,4
Hepes	11,6	11,6
KCl	5,4	5,4
CaCl ₂	1,8	0,9
CsCl	0	117,0
Glukose	10,0	10,0
pH	7,2 met NaOH (1N)	7,2 met NaOH (1N)

3.2.3 Pipet-oplossing

In die onderstaande tabel word die samestelling van die intrasellulêre pipetoplossing wat gebruik is, aangetoon:

TABEL 3.3 Pipet-oplossing gebruik in die uitvoer van die eksperimente

SOUTE	OPLOSSINGS (mM)
	PIPET-OPLOSSING II (Cs TYRODE)
CsCl	125,0
MgCl ₂	5,0
EGTA	15,0
HEPES	10,0
TEA-Cl	20,0
Na ₂ ATP	5,0
pH	7,2 met NaOH (1N)

Samestelling van die disseksie - oplossing:

- 100ml Tyrode
- 0,1611 gram KCl
- 0,9 gram Glukose
- 0,1ml van 5000 E/ml heparien

Ensieme wat gebruik is tydens selissolasie:

- 6,0 mg/40ml Collaginasie II (Sigma)
- 4,5 mg/40ml Protease XIV (Sigma)

3.2.4 Heelgif en Toksienfraksies

Gif van die skerpioenspesies *Partabuthus villosus* (Buthidae-familie) en *Opisthophtalmus carinatus* (Scorpionide-familie) is verkry deur elektriese stimulasie van lewendige skerpioene. Die heelgif is gevriesdroog nadat dit vooraf in vloeibare stikstof geplaas is. In die eksperimente waar daar van heelgif gebruik gemaak is, is die gif 250 keer verdun met sesium-Tyrode voordat dit in die bad geplaas is. Beide spesies se heelgiwwe is geskei in die verskillende komponente (fraksies) waaruit dit saamgestel is in die laboratorium van Prof. J. Tytgat van die K U van Leuven, België, deur gebruik te maak van gelchromatografie. Die individuele fraksies is opgelos in 1,0 ml sesium-Tyrode en gevries by -70°C.

3.3 REGISTRASIE TEGNIEK

Alle eksperimente is uitgevoer met spanningsklemming in 'n heelselopstelling soos beskryf deur Hamill et al., 1981. Spanningsklemming is met 'n Dagan¹-versterker gedoen. Die suigpipette van boorsilikaatglas is met behulp van 'n Narashige model PP83 pipettrekker gemaak, waarna die pipette met hitte gepoleer is. Die weerstandswaardes vir suigpipette het gevarieer tussen 2-4 mega Ohm. Met gewone Tyrode as ekstrasellulêre oplossing in 'n statiese bad, is eers 'n giga Ohm-seël gemaak waarna die membraan deurgesuig en interne dialise vir 5 minute toegelaat is. Opeenvolgens is dan vir 5 minute lank geperfuseer met Cesium-Tyrode vir die instelling van 'n ekstrasellulêre oplossing met 'n lae natrium konsentrasie (20 mM). Na vyf minute is die perfusie gestaak en die bad staties gelaat vir die res van die eksperiment. Die ioonstrome is geregistreer met behulp van die Clampex-program² en 'n 486 PC-rekenaar. Heelgif en toksienfraksies is direk by die statiese bad oplossings gevoeg met behulp van 'n mikropipet tydens die uitvoering van die eksperimente. Toksien is in die lae natriumoplossing opgelos sodat byvoeging in die bad nie gelei het tot konsentrasieveranderings nie.

¹ Dagan, Model 8800 Total clamp

² Labmaster TM 40 version 5.5.1.

HOOFTUK 4

RESULTATE

4.1 ALGEMENE INLEIDING

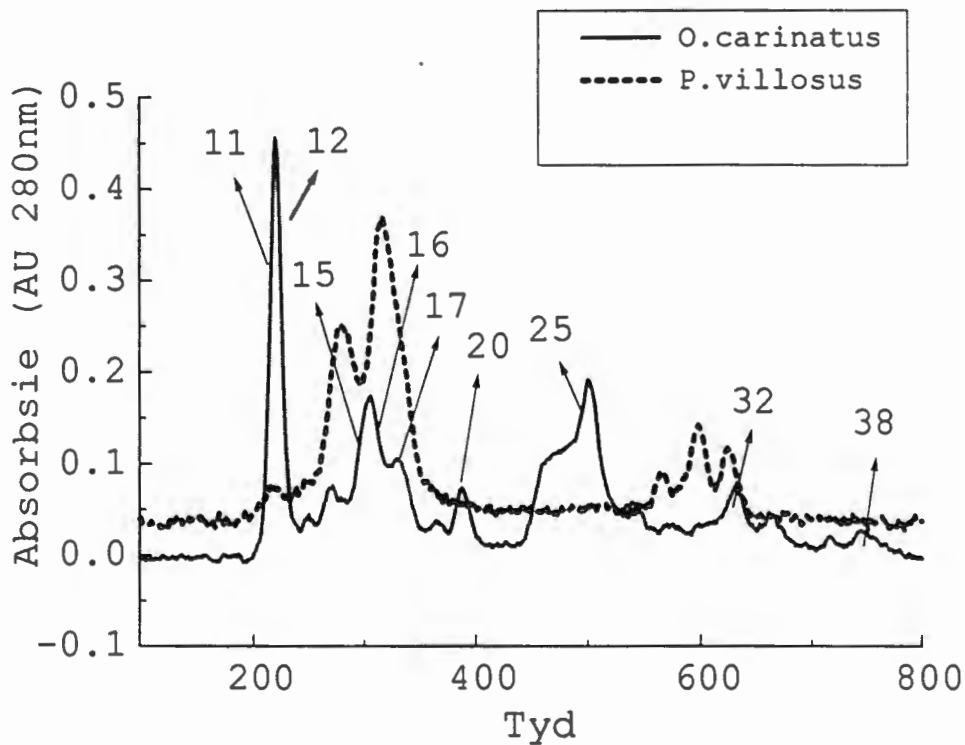
Dit kan aanvaar word dat die effekte van die heelgif van 'n spesifieke skerpioenspesie herlei kan word na spesifieke aktiewe fraksies wat teenwoordig is in die heelgif van die betrokke spesie. Aangesien daar 'n 20-tal Parabuthus spesie is, en selfs veel meer van Opisthophthalmus, is daar hoofsaaklik gekonsentreer op die effekte van die heelgif van twee spesies, *O. carinatus* en *P. villosus*, asook die effekte van verskillende aktiewe fraksies van die heelgiwwe op ioonkanale in die membrane van miosiete van rothart. Die keuse van hierdie twee skerpioenspesies om met mekaar te vergelyk is gemaak omdat daar geen eksperimentele data beskikbaar was vir hulle, in teenstelling met *P. transvaalicus* en *P. granilatus* waarvoor 'n volledige analise van aktiwiteit van gelchromatografie skeidings reeds beskikbaar was.

Uit die literatuur kan afgelei word dat toksienes van die meeste skerpioenspesies 'n invloed het op Na^+ -kanale en dat die effekte van die toksienes op Na^+ -kanale deur die meeste literatuur in hoofsaaklik twee groepe verdeel word, naamlik α - en β -effekte, waar α -toksienes die inaktivering van Na^+ -kanale vertraag en ook aanleiding daartoe gee dat inaktivering meestal onvolledig is. β -toksienes veroorsaak 'n transiënte verskuiwing in die spanningsafhanglikheid van die aktivering van die Na^+ -stroom, wat deur voorafgaande depolarisasie geïnduseer word, en verklein die amplitude van die Na^+ -stroom aansienlik. Die verskuiwing in spanningsafhanglikheid van die aktivering van Na^+ -kanale is van so 'n aard dat inwaartse Na^+ -strome waargeneem sal word by meer negatiewe membraanpotensiale as die waarby inwaartse Na^+ -strome normaalweg voorkom.

Sommige skerpioenspesies se heelgiwwe, asook sommige aktiewe toksienfraksies van die heelgiwwe, beïnvloed ook ander selmembraankanale, soos bv. K^+ en Ca^{++} -kanale (Miller et al., 1995). Aangesien die meeste eksperimentele resultate van skerpioentoksienes verkry is met senuwee preparate en aangesien daar belangrike verskille van skeletspier- en hartspierweefsel is ten opsigte van die effekte wat waargeneem is met senuweeweefsel, was dit vir hierdie projek nodig om krities na al die eksperimentele resultate te kyk. Hoewel daar hoofsaaklik gekyk is na α - en β -effekte op die Na^+ -kanale, is dit belangrik om nie die moontlikheid uit te sluit dat benewens α - en β -modulering van die Na^+ -kanaal kinetika, meer ingrypende veranderinge in die kanaalproteïene ook kan plaasvind. Dit kan geskied deur die inwerking van die

toksienes op die chemiese bande van die proteïene wat aanleiding kan gee tot addisionele effekte na blootstelling aan sekere toksienfraksies. As eerste benadering is Tetrodotoksien (TTX) gebruik om die klassieke toksien geïnduseerde veranderinge in Na^+ -strome te blokkeer. Hierdeur is gepoog om vas te stel of moontlike konformasieveranderinge van die kanaalproteïene plaasgevind het wat weerspieël sal word deur affiniteitsveranderinge van die binding van TTX met die reseptore van die ionkanale en om vas te stel of daar addisionele effekte is wat superponeer op α - en moontlik β -effekte.

4.2 VERGELYKING VAN GELPROFIELE



Figuur 4.1 Gelfiltrasi chromatogramme van die heelgiwwe van die skerpioenspesies *O. carinatus* (Scorpionidae-familie) en *P. villosus* (Buthidae-familie). Die verskillende absorpsiepieke dui verskillende chemiese komponente aan.

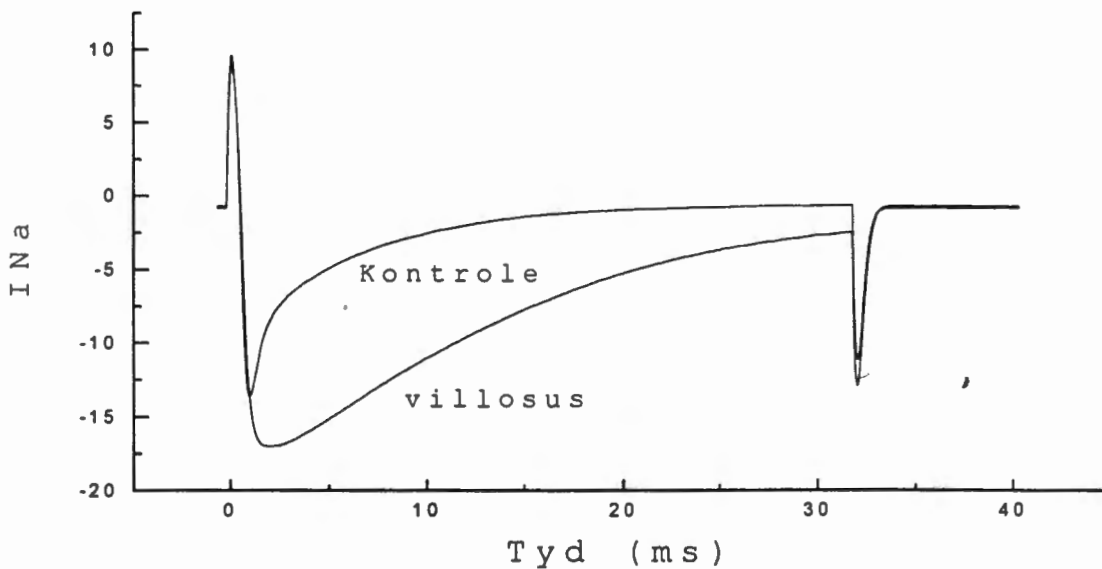
Na aanleiding van figuur 4.1 is dit duidelik dat verskillende komponente teenwoordig is in die heelgiwwe van die twee spesies. Na 200 minute is 'n groot piek waarneembaar op die chromatogram van *O. carinatus*. Hierdie piek verteenwoordig fraksie 11 van die heelgif. Slegs 'n klein piek is hier teenwoordig by die heelgif van *P. villosus*. By beide spesies verskyn groot pieke na 300 minute. Die pieke verteenwoordig fraksies 15, 16 en 17. Na 400 minute kom fraksie 20 ter voorskyn by *O. carinatus* terwyl hierdie fraksie afwesig is by die heelgif van *P. villosus*. Tussen 400 en 700 minute is daar verskeie pieke waarneembaar by die heelgif van *O. carinatus*. Die heelgif van *P. villosus* vertoon

slegs 3 komponente by 600 minute. Na 700 minute is twee klein pieke waarneembaar by die gif van *O. carinatus*, terwyl pieke na 700 minute totaal afwesig is by die heelgif van *P. villosus*. Wat die gelfiltrasie chromatogramme van die heelgif van verskillende spesies van die Parabuthus-familie betref, verskil *P. villosus*, *P. transvaalicus* en *P. granilatus* van mekaar in die voorkoms van drie groepe van pieke, waar *P. villosus* net groep 1 en 2 bevat (Debont et al., 1997). *O. carinatus* verskil van die Parabuthus-familie deurdat dit pieke bevat tussen 350 en 550 minute wat nie by Parabuthus voorkom nie. Pieke wat eerste elueer uit die chromatografiekolom bevat molekules met die grootste molekulêre gewigte. Pieke 11 en 12, wat prominent aanwesig is by *O. carinatus*, is vanweë die partikelgrootte van die kolom nie geskei nie, maar bevat 'n aantal molekules met groot molekulêre gewigte.

4.3 SKERPIONHEELGIF

4.3.1 *Parabuthus villosus*

Met al die Parabuthus spesies wat plaaslik bestudeer is, is uitgesproke effekte van die heelgif waargeneem. Binne enkele minute nadat die heelgif by die bad-oplossing gevoeg is, het die selle in die bad begin hiperkontrakteer.

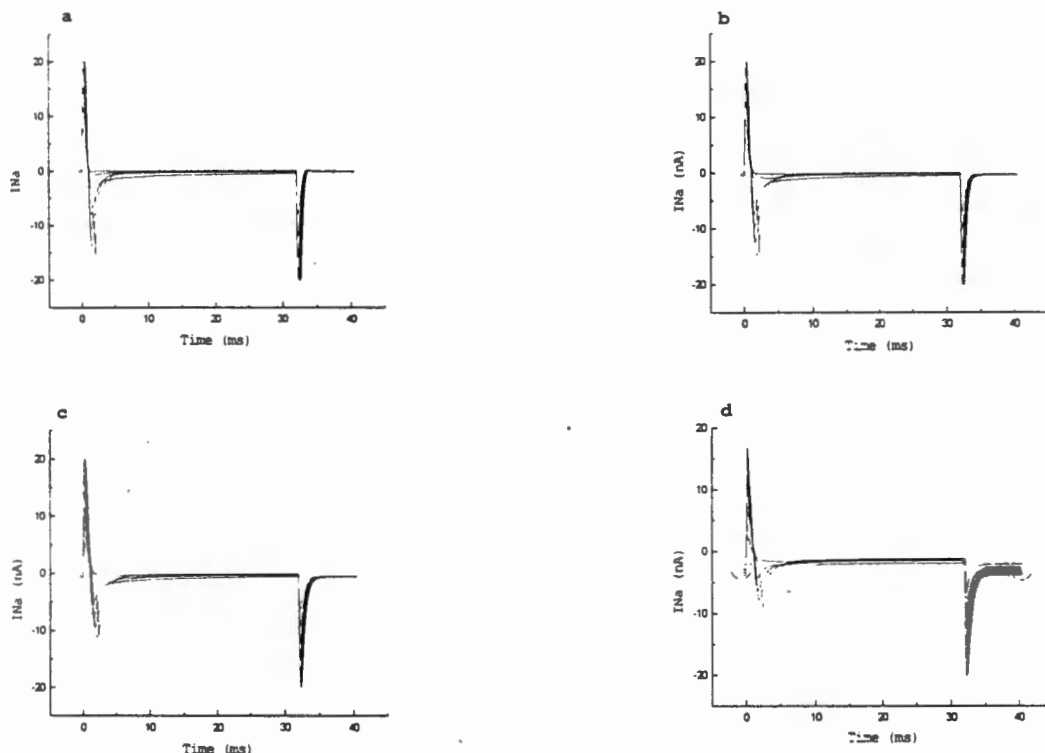


Figuur 4.2 Die effek van die heelgif van *Parabuthus villosus* op 'n Na^+ -kanaal. Die houpotensiaal (V_h) = -100mV en die toetspotensiaal (V_t) = -40mV. Die effek verskyn binne 1 minuut na blootstelling. Die gif van een skerpioen is opgelos in 1ml H_2O . Van die oplossing is 'n 1:1000 verdunning gemaak in die perfusieoplossing en dit is oor die selle gesuperfuseer.

Figuur 4.2 weerspieël tipiese α -toksien effekte waartydens daar 'n duidelike vertraging van aktivering plaasvind en die stroom nie volledig geïnaktiveer word nie. By alle *Parabuthus*-spesies wat bestudeer is het die heeligif die tempo van inaktivering van Na^+ -kanale laat afneem. In hierdie eksperiment het die Na^+ -stroom vergroot na die byvoeging van die toksien. Die registrasietyd wat verloop het tussen die kontrole registrasie en die eerste waarneembare effek was ongeveer 15 sekondes. Soortgelyke effekte is ook by drie ander selle waargeneem.

4.3.2 *Opisthophtalmus carinatus*

In teenstelling met die effekte wat verkry is met die heeligif van *P. villosus* is geen uitgesproke veranderinge waargeneem op inaktivering van Na^+ -strome van miosiete na blootstelling aan dieselfde konsentrasies heeligif van *O. carinatus* (fig 4.3 a-c) nie. Indien hoër konsentrasies van die heeligif van *O. carinatus* gebruik is, het die selle byna oombliklik na toediening in hiperkontraktuur gegaan. Na ongeveer 6 minute van blootstelling aan 'n lae konsentrasie van die heeligif was daar 'n groot verskuiwing van die stroom in 'n inwaartse rigting by 'n houpotensiaal van -100mV (fig. 4.3 d, sirkels). Hierdie effek, wat by agt verskillende selle waargeneem is, het progressief en vinnig toegeneem. Aanvanlik was dit moeilik om te onderskei of dit die seël van die pipet met die selmembraan is wat verswak, en of dit lekstrome is wat in die membraan ontstaan het. Die reproduseerbaarheid van die verskynsel dui egter op 'n toksieneffek.

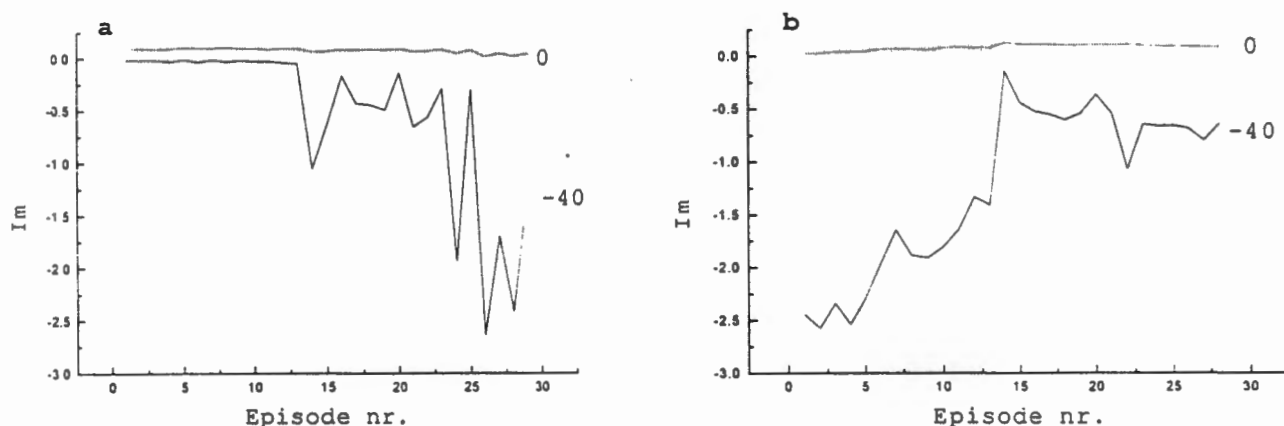


Figuur 4.3 Die effek van die heelfgif van *O. carinatus* op Na^+ -kanale en agtergrondstrome. Badvolume = $500\mu\text{l}$. Die houpotensiaal was -100mV met toetspotensiale van -80mV tot $+20\text{mV}$ in stappe van 10mV .
 (a) Kontrole (b) 1min 30sek in $10\mu\text{l}$ gif ('n totale verdunning van 1:5000)
 (c) 1min 30sek nadat die volume gif verhoog is tot $30\mu\text{l}$ (d) 9min in die gif en 2min 30sek nadat die volume gif verhoog is tot $50\mu\text{l}$ (1:1000 verdunning).

Figuur 4.3 toon resultate wat verkry is in 'n tipiese eksperiment met heelfgif van *O. carinatus*. Met $10\mu\text{l}$ gifoplossing is geen effek waarneembaar nie (b), terwyl met $30\mu\text{l}$ gif daar 'n geringe afname in Na^+ -strome waargeneem is, maar met geen effek op inaktivering nie. Na 9 minute in die teenwoordigheid van $50\mu\text{l}$ gif, word 'n inwaartse verskuiwing in strome waargeneem by die houpotensiaal wat beteken dat of die seëlweerstand afgeneem het of dat membraanlekstrome ontstaan het. Geen effek op inaktivering is waargeneem nie.

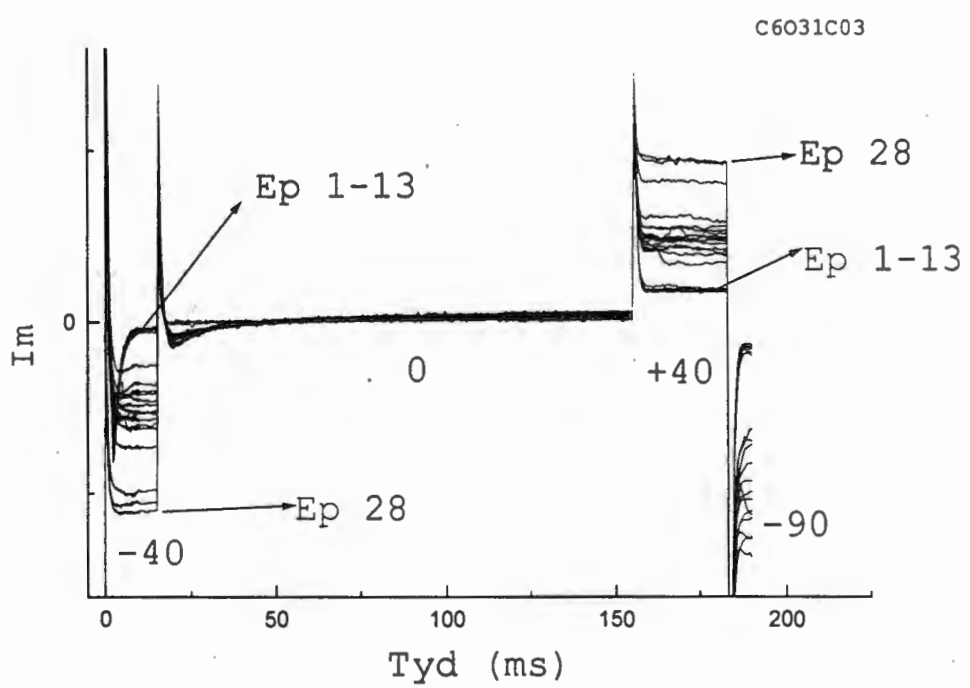
Om vas te stel of die effek van die toksien ontstaan as gevolg van lekstrome of as gevolg van die seël wat beskadig word, is 'n eksperiment uitgevoer waar die groot inwaartse stroom, wat ontstaan na blootstelling aan die heelfgif, opgevolg is deur 'n uitwasperiode. Tydens episodes 1-13 is geen effekte waarneembaar nie (fig 4.4 a). By episode 14, met 'n toetspotensiaal van -40mV , ontstaan 'n inwaartse stroom. Die effek is nie

waarneembaar by 'n toetspotensiaal van 0mV nie. Die vergrote inwaartse stroom wissel met daaropenvolgende episodes en neem progressief toe. Indien die toksien uitgewas word voor die sel in hiperkontraktuur gaan, neem hierdie stroom weer af hoewel dit nie volledig herstel nie (fig 4.4 b). Die feit dat die effek van die toksien afneem tydens die uitwasperiode is 'n aanduiding van 'n omkeerbare proses wat daarop dui dat dit nie die seël is wat beskadig word nie. Die inwaartse stroom wat ontstaan kan dus toegeskryf word aan heelgif wat lekstrome deur die selmembraan induseer.



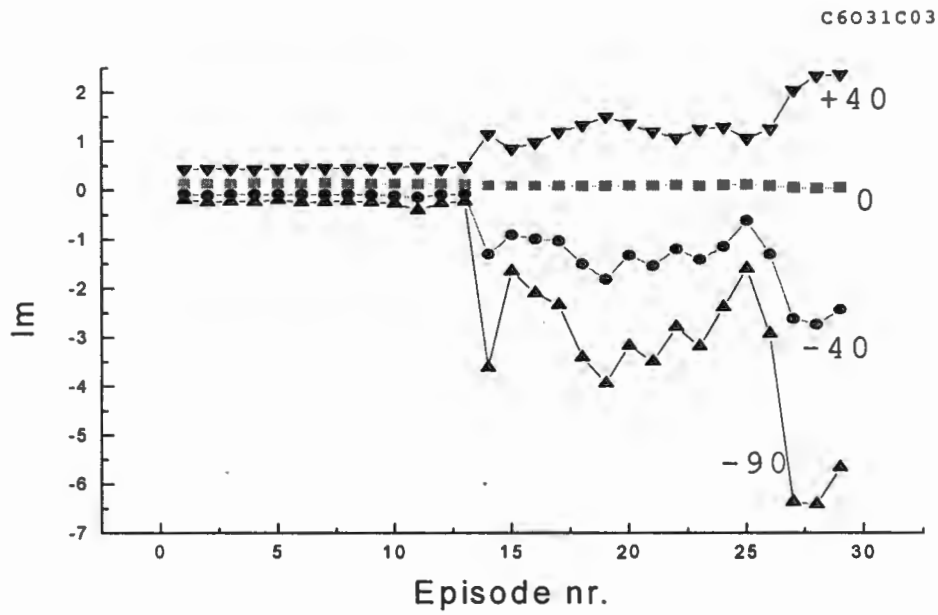
Figuur 4.4 (a) Toename van die inwaartse ionstroom (by -40mV) by 'n rotmiosisiet na blootstelling aan 50 μ l van die heelgif van *O. carinatus*, en (b), afname van die geïnduseerde inwaartse ionstroom nadat blootstelling aan die heelgif opgevolg is deur 'n uitwasperiode. Die spanningsprotokol was 'n houpotensiaal van -70mV, gevolg deur toetspotensiale na -40mV (15msek) en dan na 0mV (150msek).

Om meer te wete te kom oor die geïnduseerde lekstrome is die spannings-afhangklikheid van die stroom ondersoek deur spanningsklemming op vyf verskillende vlakke van membraanpotensiaal te doen. Episodes 1-13 van figuur 4.5 toon die spanningsafhanklike Na^+ -stroom tydens die kontrole registrasies met depolarisasie van -70mV tot -40mV en 'n Ca^{2+} -stroom met depolarisasie na 0mV. By episode 14 ontstaan die lekstroom skielik. Die Na^+ -stroom verdwyn terwyl die Ca^{2+} -stroom vir 'n tyd lank onveranderd bly. Die mees opvallendste waarnemings is die groot toename in die inwaartse stroom by -40mV, die toename in die uitwaartse stroom by +40mV met geen waarneembare stroom veranderinge by 0mV nie. Dit dui op 'n omkering van die stroom by ongeveer 0mV.

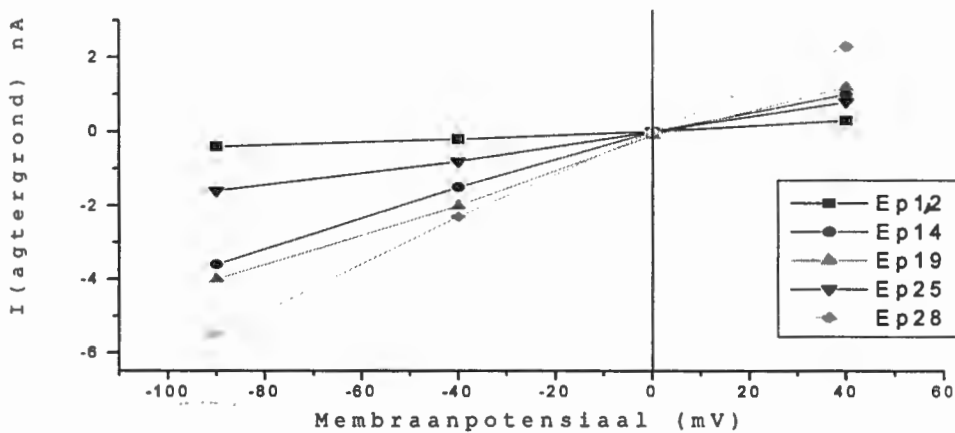


Figuur 4.5 Die effek van die heelgif van *O. carinatus* op ionstrome deur die selmembraam by verskillende membraanpotensiale. Van 'n houpotensiaal van -70mV is spanningsklemming toegepas by -40mV, 0mV, +40mV en -90mV. Hierdie protokol is elke 10 sekondes herhaal. Episodes 1 tot 4 was in die kontrole medium. By episode 5 is 20 μ l van die heelgif ('n totale verdunning van 1:2500) by die medium gevoeg en by episode 14 is 'n skielike verandering in die agtergrondstrome waargeneem.

Om die geïnduseerde ionstrome kwantitatief te ontleed, is die strome op elke potensiaalvlak vir elke episode van figuur 4.5 gemeet en in figuur 4.6 uitgesit. Figuur 4.6 toon aan dat die volgehoue inwaartse en uitwaartse ionstrome wat voorkom by -40mV en +40mV na blootstelling van die miosiete aan die heelgif van *O. carinatus* spieëlbeelde van mekaar is. Bogenoemde is 'n duidelike aanduiding dat daar nou geen normale inwaartse gelykrichting van die ionstrome meer plaasvind nie. Die positiewe stroom by +40mV is ongeveer gelyk aan die negatiewe stroom by -40mV wat dui op 'n liniêre stroom-spanningsverhouding. Na blootstelling aan die heelgif het selmembraan konduktansie dus baie toegeneem. Die toename is heelwaarskynlik non-selektief vir alle ione aangesien die omkeringspotensiaal in die omgewing van 0mV is.



Figuur 4.6 Geïnduseerde lekstrome by verskillende membraanpotensiale. Eksperimentele waardes is verkry uit figuur 4.5. Die stroom by -40mV is 'n spieëlbeeld van die by $+40\text{mV}$. Dit is 'n aanduiding is dat die membraanstrome 'n liniêre verband met mekaar het, met 'n omkeringspotensiaal van omtrent 0mV .



Figuur 4.7 Die stroom-spanningsverhouding vir die heelgifeïnduseerde stroom by verskillende episodes. Eksperimentele data is dieselfde as vir fig 4.5.

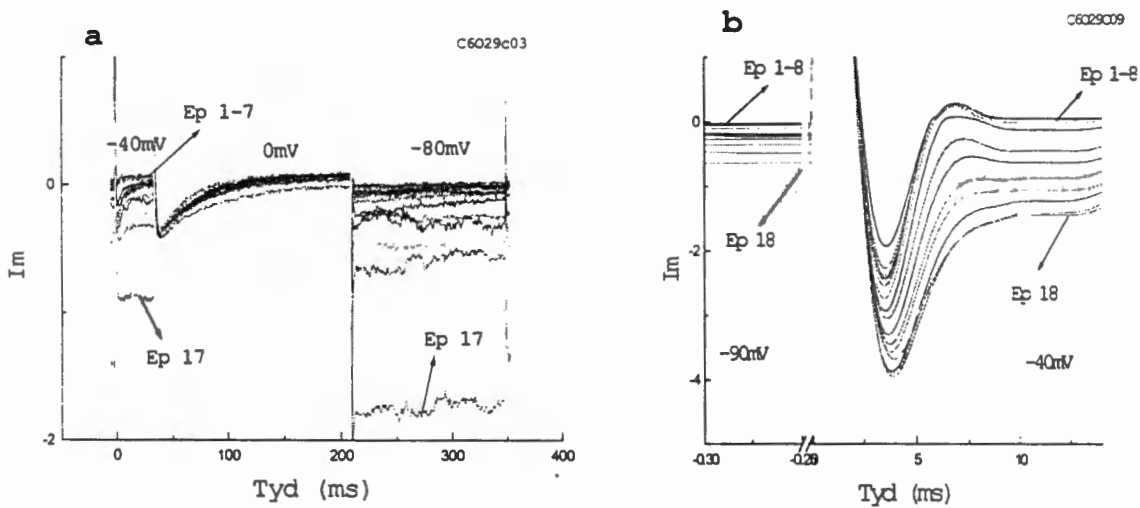
Uit fig. 4.7 is dit duidelik dat die heelgif van *O. carinatus* die konduktansie van die selmembraan drasties laat toeneem, dat 'n liniêre stroom-spanningsverhouding verkry word en dat die omkeringspotensiaal ongeveer by 0 mV is.

Dat cesium hoofsaaklik die ladingsdraer is vir die uitwaartse stroom volg uit die samestelling van die pipetoplossing waar cesium die belangrikste katioon is (tabel 3.3). Ook ekstrasellulêr is daar baie cesium (tabel 3.2) wat die inwaartse stroom tot gevolg sal kan hê en 'n ewewigspotensiaal na aan 0 mV, wat ooreenstem met die omkeringspotensiaal wat waargeneem is. 'n Bydrae deur ander katione tot die lekstroom kan nie uitgesluit word nie, alhoewel dit duidelik is dat dit nie hoofsaaklik 'n natrium- of kalsiumstroom kan wees nie. Beide sou 'n groot positiewe omkeringspotensiaal tot gevolg hê.

4.4 AKTIWITEIT VAN GELFRAKSIES

4.4.1 Fraksie 15 van *O. carinatus*

Met heelgif is geen α -toksien effekte waargeneem by *O. carinatus* nie. Dit was belangrik om vas te stel of daar enige komponente in die heelgif teenwoordig is wat wel α -toksien effekte sal veroorsaak, maar wat nie waarneembaar is nie as gevolg van die veel groter en meer prominente lekstroomeffek. Verder is vermoed dat daar in die heeltoksien 'n spesifieke fraksie teenwoordig moet wees wat verantwoordelik is vir die indusering van die lekstroom en was dit belangrik om die spesifieke fraksie te identifiseer. Verskeie van die fraksies van die heelgif is getoets en slegs fraksie 15, wat na 288 minute uit gelchromatografie verkry word, het die tipiese effek vertoon.



Figuur 4.8 Die effek van fraksie 15 van die heelgif van *O. carinatus* op membraanstrome by verskillende membraanpotensiale. (a) Vanaf 'n houpotensiaal van -70mV is spanningsklemming gedoen by -40mV, 0mV, en -80mV. Die protokol is elke 10 sekondes herhaal. By 'n 0mV potensiaal is Ca^{2+} -strome geregistreer (met 0,9mM Ca in die badoplossing). Episode 1-4 was in die kontrole oplossing. By episode 5 is 50 μl ('n totale verdunning van 1:60) van fraksie 15 by die badoplossing gevoeg en by episode 7 het die stroom by al die potensiale, behalwe by 0mV, skielik verander na 'n inwaartse rigting. (b) Vanaf 'n houpotensiaal van -90mV is spanningsklemming gedoen by -40mV en 'n inwaartse Na^{+} -stroom is geregistreer (met 20mM Na in die badoplossing). Episode 1-4 was in die kontrole oplossing. By episode 5 is 20 μl van fraksie 15 bygevoeg en by episode 8 het die agtergrond strome begin verander na 'n inwaartse rigting toe.

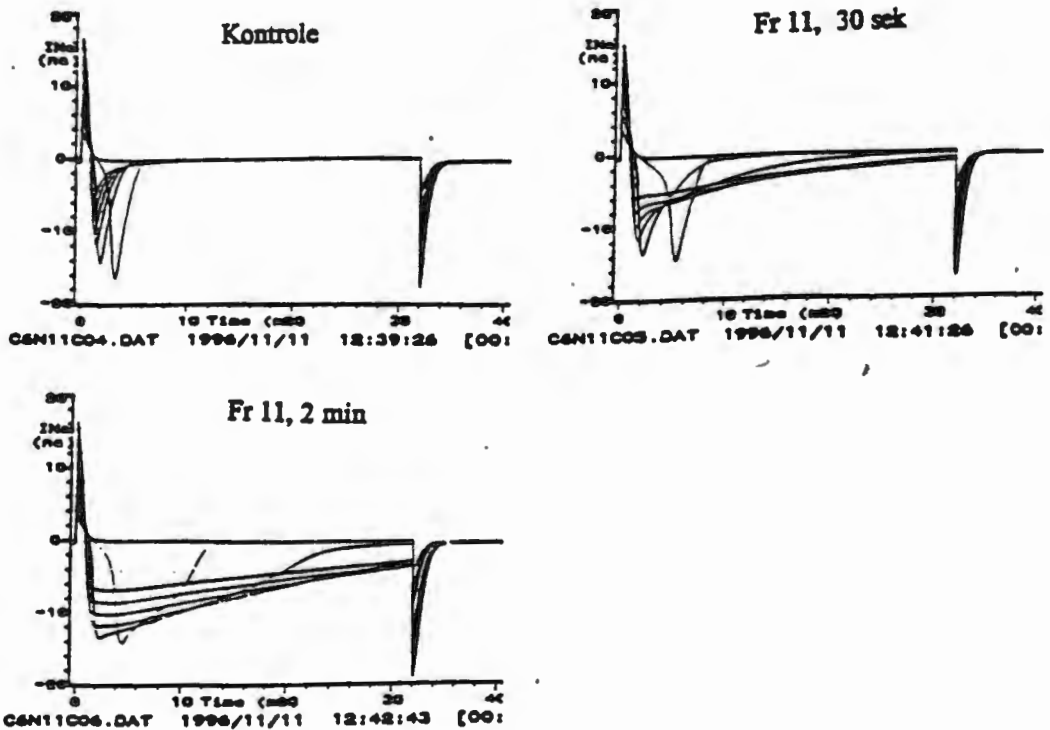
Uit fig 4.8 (a) is dit duidelik dat fraksie 15 die van heelgif van *O. carinatus* die aktiewe komponent bevat wat verantwoordelik is vir die indusering van lekstrome. By 'n houpotensiaal van -70mV word geen Na^{+} -stroom geregistreer nie aangesien die meeste Na^{+} -kanale geïnaktiveerd was. 'n Belangrike waarneming is dat die Ca^{2+} -stroom by 0mV nie verander het na die ontstaan van die lekstroom nie, wat daarop dui dat hierdie tipe kalsiumkanaal nie betrokke is by die lek nie. In 'n volgende eksperiment by 'n houpotensiaal van -90mV, is daar wel 'n Na^{+} -stroom geregistreer (fig 4.8 (b)). Hier het die ontstaan van die lekstroom 'n parallelle inwaartse verskuiwing sonder verkleining van die Na^{+} -stroom veroorsaak. Die lekstroom wat ontstaan het dus geen invloed op die tyd afhanklike Ca^{2+} (I_L) of Na^{+} -strome nie. As 'n seël beskadig word, is daar gewoonlik 'n baie vinnige afname en agteruitgang van die L-tipe Ca^{2+} -stroom, wat nie hier waargeneem word nie. Hoewel 'n effek op die kaliumkanale nie uitgesluit kan word met

die resultate van hierdie projek nie, word vermoed dat die invloed van fraksie 15 porieë-vorming in selmembrane is.

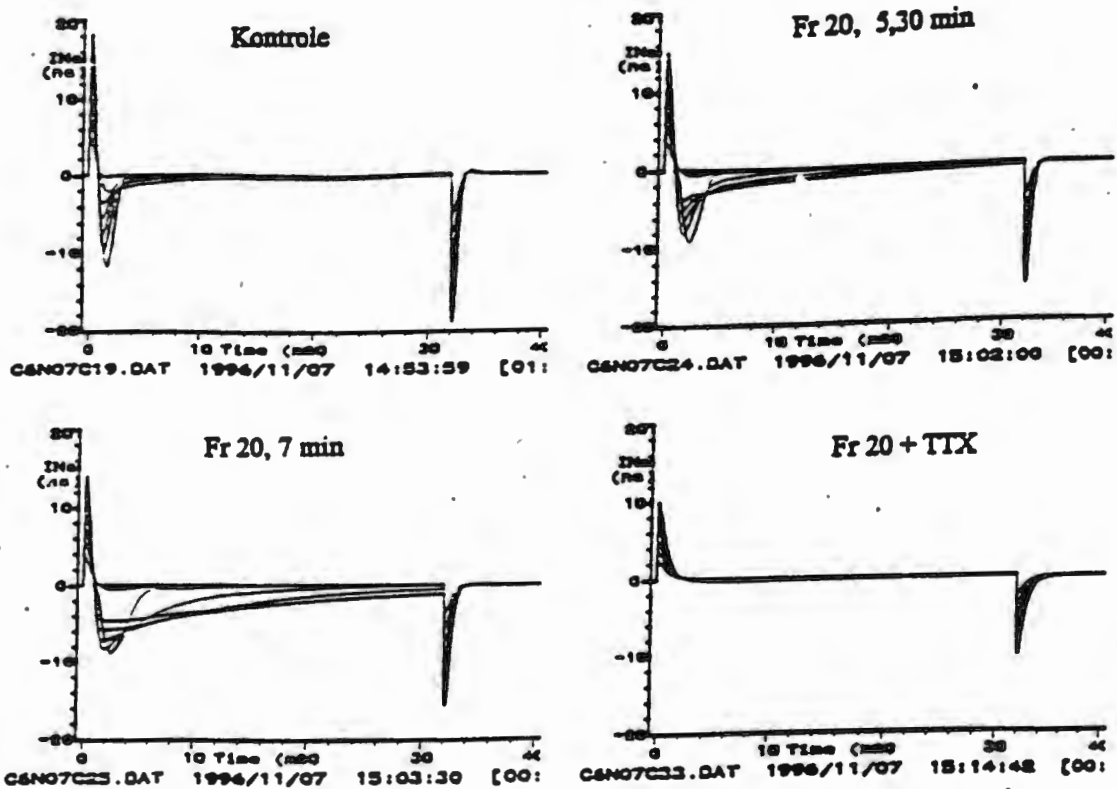
4.4.2 Fraksies 11 en 20 van *O. carinatus*

Tydens die eksperimente van hierdie projek het fraksies 8, 12, 16, 22, 24, 25, 32 en 38 van die heelgif van *O. carinatus* min tot geen invloed op Na^+ -kanale en gepaardgaande Na^+ -strome gehad nie (Addendum). Sommige van hierdie fraksies het wel soms geringe invloede gehad op inaktivering van Na^+ -strome. Uit 'n groot aantal opnames het dit duidelik geword dat kontaminasie van die perfusie bad 'n riële probleem is. Vir die doel van hierdie projek is daar dus net gekonsentreer op die fraksies wat uitgesproke effekte het. Fraksies 11 en 20 van die heelgif van *O. carinatus* was baie aktief op Na^+ -kanale en uitgesproke effekte op Na^+ -kanaal aktiwiteite is waargeneem na blootstelling van miosiete aan hierdie fraksies.

(a)



(b)



Figuur 4.9 Die effek van (a) fraksie 11 en (b) fraksie 20 van die heelgif van *O. carinatus* op Na^+ -kanale. In beide gevalle is die effekte verkry met relatiewe lae fraksie konsentrasies en verskyn binne 1 minuut na blootstelling. Elkeen van die fraksies is opgelos in 1ml H_2O . Van die oplossing is 'n 1:1000 verdunning gemaak. In geval van fraksie 11 is 100 μl van die oplossing by die badoplossing gevoeg en van fraksie 20 is 150 μl van die oplossing by die badoplossing gevoeg.

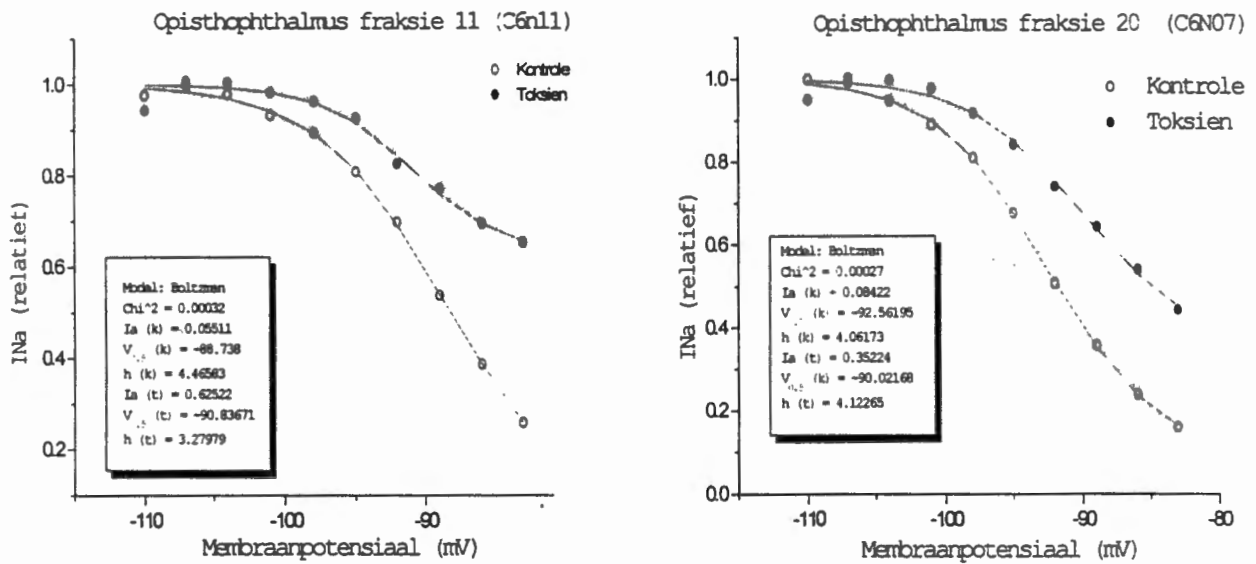
Uit die bostaande figuur (fig 4.9 (a) en (b)) is dit duidelik dat die inaktiveringsfase van die inwaartse Na^+ -stroom vertraag word na blootstelling van die miosiete aan fraksies 11 en 20 van die heelgif. Hierdie waargenome vertraging van die inaktiveringsfase stem ooreen met tipiese α -toksien effekte soos wat in die meeste literatuurbronne beskryf word. Beide fraksies kan dus geklassifiseer word as α -toksienes.

4.4.3 Aktiewe fraksies van *P. villosus*

Vir hierdie projek is slegs eksperimentele werk gedoen met heelgif van *P. villosus*. Uit eksperimentele werk van J.L. du Plessis (ongepubliseerd) is dit bekend dat fraksies 11, 12, 15 en 17 van die heelgif van *P. villosus* aktief is en inaktivering van Na^+ -kanale beïnvloed. 'n Belangrike verskil tussen die twee skerpioene van die twee families wat bestudeer is, is dat fraksie 17 van die heelgif van *P. villosus* die inaktiveringsfase van Na^+ -kanale, terwyl geen aktiwiteit waargeneem word by fraksie 17 van *O. carinatus* nie. Fraksie 17 van die heelgiwwe van al die *Parabuthus* spesies wat tot dusvêr bestudeer is, vertraag die inaktiveringsfase van Na^+ -kanale (Debont et al., 1997). Fraksie 11 van die heelgif van beide *P. villosus* en *O. carinatus* vertoon aktiwiteit terwyl fraksie 20 slegs aktief is by die heelgif van *O. carinatus*.

4.5 SPANNINGSAFHANGKLIKHEID VAN INAKTIVERING MET FRAKSIES 11 EN 20 VAN *O. CARINATUS*

Die beskikbaarheid van spanningsbeheerde ionkanale neem af met depolarisasie en word deur 'n omgekeerde s-vormige verband beskryf. Vir fraksie 11 verskuif die middelpunt van die h-kurwe van -88.7 mV na -90.8 mV en vir fraksie 20 van -92.5 mV na -90.0 mV, terwyl die helling van die kurwes (h) nie veel verander nie (fig. 4.10). Hierdie verskuiwings is relatief klein en stem ooreen met klein verskuiwings wat vir α -toksienes in ander weefselstipes gevind word. Dit is in teenstelling met groot verskuiwings vir β -toksienes (Meves, 1986; Bauer, 1992). 'n Ander belangrike verskil is dat beide fraksies 11 en 20 onvolledige inaktivering tot gevolg het (I_a nie = 0). Vir fraksie 11 inaktiveer ongeveer 60 % van die kanale nie met depolarisasie nie ($I_a = 0.62$, fig. 4.10). Onvolledige inaktivering met α -toksienes is ook geynd deur Meves op Knope van Ranvier (Meves et al., 1983), Bauer op bynierselle (Bauer et al., 1992) en Hanck vir Ap-A toksien van see anemoon op kardiaale Purkinje selle (Hanck en Sheets, 1995).



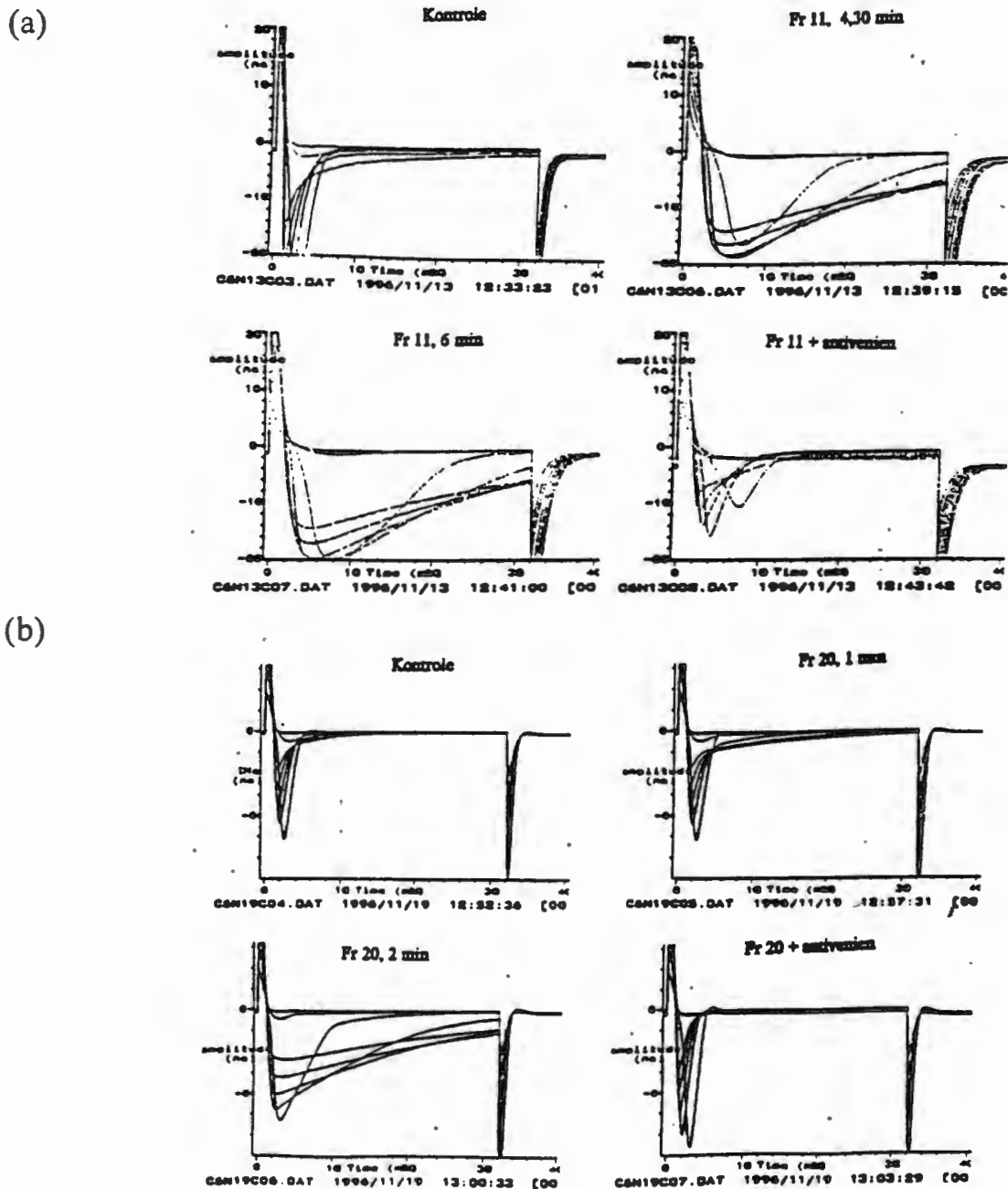
Figuur 4.10 Die effek van fraksies 11 en 20 van die heelgif van *O. carinatus* op Na^+ -kanaal inaktivering of beskikbaarheid. Eksperimentele waardes is verkry uit figuur 4.9.

Groot ooreenkomste bestaan tussen die effekte van fraksies 11 en 20 van die heelgif van *O. carinatus* en toksien Ap-A van die see-anemoon spesie *Anemone xanthogrammica* waar laasgenoemde ook vertraagde inaktivering van die Na^+ -strome in hartweefsel tot gevolg het en waar daar nie groot veranderinge in die helling van beskikbaarheidskurwes waarneembaar is nie (Hanck en Sheets, 1995). Groot verskille bestaan tussen die effekte op hartweefsel en die effekte op ander weefsel tipes, veral senuwee. Aangesien baie min effekte van skerpioentoksienes op hartweefsel bestudeer is, terwyl baie studies met see-anemone op hartweefsel gedoen is, is dit sinvol om skerpioentoksienes waar moontlik ook met Ap-A te vergelyk, veral ook aangesien dat beide op bindingsposisie 3 van die natriumkanal bind.

4.6 ANTIVENIEN

Antivenien wat plaaslik beskikbaar is, word geproduseer van die heelgif van die spesie *Parabuthus transvaalicus*. Hierdie spesie behoort tot die Buthidae-familie en gevolglik ontstaan die vraag of die teengif ook effektief sal wees vir gif van skerpioene van die Scorpionidae-familie. Fraksies 11 en 20 van die heelgif van *O. carinatus* (van die Scorpionidae-familie) vertoon die tipiese effek van die vertraging van inaktivering van Na^+ -kanale soos wat waargeneem word by verskeie fraksies van die gif van *Parabuthus* spesies. Daar is vir beide fraksies 11 en 20 van *O. carinatus* gevind dat, op die vlak van

enkelselmiosiete, die antivenien net so doeltreffend is om die vertraging van inaktivering van die Na^+ -stroom op te hef as wat gevind is vir skerpioenspesies van die *Parabuthus*-genus (fig. 4.11). Die onderdrukking van hierdie α -toksien effek van beide fraksies 11 en 20 nadat die antivenien toegedien is by die badoplossing dui op homologie van die chemiese struktuur van die antigenies-aktiewe komponent van die twee verskillende families.



Figuur 4.11 Die effek van (a) fraksie 11 en (b) fraksie 20 van die heelgif van *O. carinatus* en antivenien. Binne enkele minute na toediening van die fraksies word 'n duidelike vertraging van inaktivering waargeneem by beide fraksies. Hierdie α -toksien effek word onderdruk sodra antivenien by die badoplossings gevoeg word.

HOOFSTUK 5

BESPREKING

Min eksperimentele werk is met skerpioentoksienes op kardiaale weefsel gedoen. Die meeste navorsingsprojekte in verband met die effekte van skerpioentoksienes is uitgevoer deur gebruik te maak van senuweeselpreparate. Wat α -toksienes betref, vergelyk die resultate wat verkry is met hierdie projek goed met resultate van navorsing wat hoofsaaklik gebruik gemaak het van senuweeselpreparate. As die resultate verder ook vergelyk word met navorsingsresultate wat verkry is deur miokardiale miosiete bloot te stel aan Anthopleurin-A-toksien van die see anemoon *Anemone xanthogrammica*, wat op dieselfde reseptor bind as α -skerpioentoksienes, kan aanvaar word dat miokardiale miosiete 'n goeie en 'n toepaslike model is om die effekte van skerpioenheelgiwwe en fraksies van die heelgiwwe te bestudeer.

Die hipotese wat gestel is dat die verskil in die toksisiteit tussen die twee spesies uit die verskillende skerpioenfamilies, *P. villosus* en *O. carinatus*, toegskryf kan word aan die teenwoordigheid van verskillende chemiese komponente in die aktiewe fraksies uit die heelgiwwe, is bevestig. Aktiewe fraksies wat deur du Plessis (du Plessis, ongepubliseerd) by die heelgif van *P. villosus* geïdentifiseer is, was fraksies nommers 11, 12, 15 en 17, en by die heelgif van *O. carinatus*, is daar met hierdie projek fraksies nommers 11, 15 en 20 aktief gevind. Dit dui meer op verskille as op ooreenkomste, want fraksie 15 het verskillende fisiologiese effekte tot gevolg terwyl fraksies 11 moeilik met mekaar vergelyk kan word omdat dit saamgestel is uit 'n aantal groot molekules met groot molekulêre gewigte.

Gelprofile van die heelgiwwe van skerpioene wat van mekaar verskil ten opsigte van grootte, ouderdom, geslag, fisiese toestand en habitat, is vir drie spesies van die genus *Parabuthus* van die familie Buthidae met mekaar vergelyk. Daar is aangetoon dat die gelprofile van die gif van skerpioene van dieselfde spesie identies aan mekaar is met ooreenstemmende aktiewe pieke maar, dat dit verskil tussen spesies binne dieselfde genus, elke spesie het sy eie gifvingerafdruk (Debont, aanvaar vir publisering). Daar kan dus aanvaar word dat daar waarskynlik op grond van toksiensamestelling ook tussen verskillende families onderskei kan word. Indien *O. carinatus* en *P. villosus* tipiese voorbeelde is van die families Scorpionidae en Buthidae, is die afwesigheid van die aktiewe piek 17 (wat die belangrikste piek by die genus *Parabuthus* is) by die heelgif van *O. carinatus*, waarskynlik die belangrikste verskil tussen die twee families.

Piek 17 is moontlik ook die rede waarom die Buthidae meer toksies is as Scorpionidae. 'n Ander belangrike verskil is die tipe aktiwiteit van piek 15 van *O. carinatus* wat glad nie, of tot 'n baie mindere mate, teenwoordig is by die *Parabuthus* spesies.

Die heelfgif asook die aktiewe fraksies van die heelfgif van die spesie *P. villosus* veroorsaak binne enkele minute van blootstelling uitgesproke effekte by miosiete aan die toksienes. Hierdie effekte word gekenmerk deur 'n afname in die tempo van inaktivering van Na^+ -kanale asook onvolledige inaktivering van die ioonstroom, die tipiese α -toksieneffekte. In al die eksperimente is die effekte met relatiewe lae gifkonsentrasies verkry en het dit binne een minuut ná blootstelling, te voorskyn gekom. In teenstelling hiermee was geen α -toksieneffekte waarneembaar by Na^+ -kanale van miosiete ná blootstelling aan die heelfgif van *O. carinatus* in dieselfde konsentrasies nie. Indien hoër konsentrasies van die heelfgif van *O. carinatus* gebruik is, het die selle binne enkele minute na toediening, in hiperkontraktuur gegaan, met die enigste waarneembare effek 'n groot verskuiwing van die ioonstroom in 'n inwaartse rigting by 'n houpotensiaal van -100mV . Dit wil sê, 'n lekstroom ontstaan. Hierdie effek het progressief vinnig toegeneem totdat die selle in hiperkontraktuur gegaan het.

Daar is aangetoon dat die indusering van die lekstroom omkeerbaar is en nie ontstaan omdat die seël van die pipet met die selmembraan verswak nie. Uit kwantitatiewe ontledings van hierdie ioonstrome is gevind dat die volgehoue inwaartse en uitwaartse ioonstrome wat voorkom by -40mV en $+40\text{mV}$ na blootstelling van miosiete aan die heelfgif van *O. carinatus*, spieëlbeelde van mekaar is. Dit dui daarop dat geen normale inwaartse gelykripping van ioonstrome plaasvind nie. Die positiewe stroom by $+40\text{mV}$ is ongeveer gelyk aan die negatiewe stroom by -40mV , wat dui op 'n liniêre stroom-spanningsverhouding. Blootstelling aan die heelfgif van *O. carinatus* gee waarskynlik aanleiding tot porieë vorming in miosiet selmembrane met gevolglike, toename in selmembraankonduktansie. Die toename is waarskynlik non-selektief vir alle ione aangesien die omkeringspotensiaal in die omgewing van 0mV is.

Kardiale miosiete is ook blootgestel aan die verskillende aktiewe fraksies van die heelfgif van *O. carinatus* met die doel om vas te stel watter fraksie(s) verantwoordelik is vir die porievormende-effek van die heelfgif. Van al die fraksies wat getoets is, het slegs fraksie 15 hierdie tipiese effek vertoon.

Fraksies 11 en 20 van die heelfgif van *O. carinatus* vertoon uitgesproke effekte deur Na^+ -kanaal inaktivering te vertraag en onvolledige inaktivering van die ioonstrome te veroorsaak. Die gepaardgaande onvolledige inaktivering word weerspieël in 'n

afname van die helling van die spanningsafhanklikheid van inaktivering asook die volgehoue stroom wat by gedepolariseerde membraanpotensiale vloei. Hierdie effekte is tipiese α -toksien effekte soos wat dit in die literatuur beskryf word. Opeenvolgende blootstelling van miosiete aan TTX, na die verskyning van die α -toksien effekte, gee aanleiding tot die tipies verwagte blokkerings-effek van Na^+ -kanale. Hierdie verskynsel is 'n aanduiding dat die toksien fraksie nie die kanale se proteïenkonformasie nie, maar eerder die oop- en toemaak kinetika van die kanale beïnvloed.

Hierdie α -toksienes is dus ook teenwoordig in die heelgif van *O. carinatus*, maar die effekte daarvan word oorskadu deur die porievormende-effek van fraksie 15 sodat die sel hiperkontrakteer voordat vertraging in inaktivering waargeneem kan word.

Verskeie fraksies, in beide spesies se heelgiwwe, se posisies op die gelprofiel stem ooreen, terwyl ander fraksies slegs op die gelprofiel van 'n sekere spesie se heelgif aangetref word. Die feit dat die posisies van sekere fraksies ooreenstem, is nie noodwendig 'n aanduiding dat die samestelling en die effekte van die fraksies identies is nie. Fraksie 15 van *P. villosus* en *O. carinatus* is so'n voorbeeld.

Plaaslik geproduseerde antivenien, wat berei word uit die heelgif van die spesie *P. transvaalicus* van die Buthidae-familie, is effektief op enkelselmiosietvlak vir die onderdrukking van α -toksien effekte wat deur die fraksies van die heelgif van *O. carinatus* veroorsaak word. Na toediening van die antivenien by die badoplossing van blootgestelde miosiete is die α -toksien effekte duidelik onderdruk. Dit dui op 'n verband wat mag bestaan tussen die chemiese struktuur van fraksies van verskillende skerpioenfamilies deurdat sekere dele van die polipeptiedes van die verskillende fraksies van verskillende spesies en families dieselfde is.

Samevattend kan dus gestel word dat sekere strukture van die gif van verskillende skerpioenspesies en families, ooreenstem. Die resultate van hierdie projek toon aan dat verskille in die toksiteit tussen die heelgiwwe van die Buthidae en die Scorpionidae skerpioenfamilies, toegeskryf kan word aan die teenwoordigheid van verskillende aktiewe chemiese komponente in die verskillende heelgiwwe, wat inwerk op verskillende fisiologiese meganismes.

BIBLIOGRAFIE

- BAUER, C.K., KRYLOV, B., ZHOU, P. & SCHWARZ, J.R.** 1992. Effects of *Buthus Martensii* (Karsch) scorpion venom on sodium currents in rat anterior pituitary (GH₃/B₆) cells. *Toxicon*: 30:581-589.
- BERGMAN, N.J.** 1997. Scorpion sting in Zimbabwe. *South African Medical Journal*, 87: 163-167.
- BLUMENTHAL, K.** 1995. Ion channels as targets for toxins. (In: *Cell Physiology Source Book*. Sperelakis, N. ed.. Academic Press, New York. pp. 389-403.
- BÖHLE, T. & BENDORF, K.** 1995. Voltage-dependent properties of three different gating modes in single cardiac Na⁺-channels. *Biophysical Journal*, 69: 873-882.
- CAHALAN, M.D.** 1975. Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *Journal of Physiology*, 244: 511-534.
- CARBONE, E., WANKE, E., PRESTIPINO, G., POSSANI, L.D., & MAELICKE, A.** 1982. Selective blockage of voltage-dependent K⁺-channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, 296: 90-91.
- DEBONT, T., SWERTS, A., VAN DER WALT, J.J., MULLER, G.J., VERDONCK, F., DAENENS, P. & TYTGAT, J.** Comparison and characterization of the venoms of three *Parabuthus* scorpion species occurring in Southern Africa. Aanvaar vir publiseren in *Toxicon*, 1997.
- CATTERALL, W.A.** 1977. Activation of the action potential Na-ionophore by neurotoxins : An allosteric model. *Journal of Biological Chemistry*, 252: 8669-8676.
- CATTERALL, W.A.** 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20: 15-43.

GRANT, A.O. 1991. The electrophysiology of the cardiac sodium channel. *TCM*, 1,8: 321-330.

HANCK, D.A. & SHEETS, M.F. 1995. Modification of inactivation of cardiac sodium channels : Ionic current studies with Anthopleurin-A toxin. *The Journal of General Physiology*, 106: 601-616.

HILLE, B. 1977. Local anesthetics : hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug receptor reaction. *Journal of General Physiology*, 69: 497-515.

HILLE, B. 1991. Mechanism of block, structure and function and Modifiers of gating. In: Ionic channels of excitable membranes. Second Edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts, USA. pp.390-455.

HU, S.L., MEVES, H., RUBLY, N. & WATT, D.D. 1983. A Quantitative study of the action of Centruroides Sculpturatus Toxins III and IV on the Na Currents of the Node of Ranvier. *Pflügers Archive*, 307: 90-99.

ISMAIL, M. 1995. The Scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, 33: 825-858.

JOVER, E.F., COURAUD, F. & ROCHAT, H. 1980. Two types of Scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites in rat brain synaptasomes. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 95: 1607-1614.

KANEDA, M., OYAMA, Y., IKEMOTO, Y. & AKAIKE, N. 1989. Scorpion toxin prolongs an inactivation phase of the voltage-dependent sodium current in rat isolated single hippocampal neurons. *Brain Research*, 487: 192-195.

KIRSCH, G.E., SKATTEBOL, A., POSSANI, L.D. & BROWN, A.M. 1989. Modification of Na channel gating by an α -scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *Journal of General Physiology*, 93: 67-82.

KOPPENHÖFER, E. & SCHMIDT, H. 1968. Incomplete sodium inactification in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. *Experientia*, 24: 41-42.

LAMORAL, B.H. 1979. The scorpions of Namibia (Arachnida : Scorpionida) *Annual Natal Museum*, 23: 497-784.

MEVES, H., RUBLY, N. & WATT, D.D. 1982. Effect of toxins isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus* on the Na currents of the Node of Ranvier. *Pflüger Archive*, 393: 56-62.

- MEVES, H., SIMARD, J.M. & WATT, D.D.** 1986. Interactions of Scorpion toxins with the sodium channel. *Annals of the New York Academy of Science*, 479: 113-129.
- MILLER, C.** 1995. The charybdotoxin family of K^+ -channel-blocking peptides. *Neuron*, 15: 5-10.
- MITRA, R. & MORAD, M.** 1985. A uniform method for dissociation of myocytes from the heart and stomachs of vertebrata. *American Journal of Physiology*, 105: H1056-H1060.
- MÜLLER, G.J.** 1993. Scorpionism in South Africa : a report on 42 serious scorpion envenomations. *South Africa Medical Journal*, 83: 405-411.
- NARAHASHI, T., SHAPIRO, B.I., BEGUCHI, T., SCUKA, M. & WANG, C.M.** 1972. Effects of scorpion venom on squid axon membranes. *American Journal of Physiology*, 222: 850-857.
- NEHER, E., SAKMANN, B. & STEINBACH, J.H.** 1978. The extracellular patch clamp : a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflüger Archive*, 375: 219-228.
- NEWLANDS, G.** 1978. Review of Southern African scorpions and scorpionism. *South Africa Medical Journal*, 54: 613-615.
- POWELL, T. & TWIST, V.W.** 1976. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 72: 327-333.
- SCHMIDT, R.F. & THEWS, G.** 1989. Information Transfer by Electrical Excitation. In Human physiology. Second Edition. Springer-Verlag Berlin. Universitätsdruckerei. Würzburg, Germany. pp 19-32.
- SIMARD, J.M. & WATT, D.D.** 1990. Venoms and toxins In Polis, G.A. The biology of Scorpions. New York : Stanford University Press. pp 414-444.
- STRICHARTZ, G.R. & WANG, G.K.** 1986. Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion α -toxins coupled to Na channel inactivation in amphibian myelinated nerves. *The Journal of General Physiology*, 88: 413-434.

WATT, D.D., SIMARD, J.M., BABIN, D.R. & MLEJNEK, R.U. 1978. Physiological characterization of toxins isolated from scorpion venom *In* Rosenberg, P. Toxins : animal, plant and microbial. New York : Pergamon Press. pp 284-307.

WATT, D.D. & SIMARD, J.M. 1984. Neurotoxin proteins in scorpion venom. *Journal of Toxicology. Toxin Review*, 3: 181-221.

YATANI, A., KIRSCH, G.E., POSSANI, L.D. & BROWN, A.M. 1988. Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *American Journal of Physiology*, 254: H443-H451.

BEDANKINGS

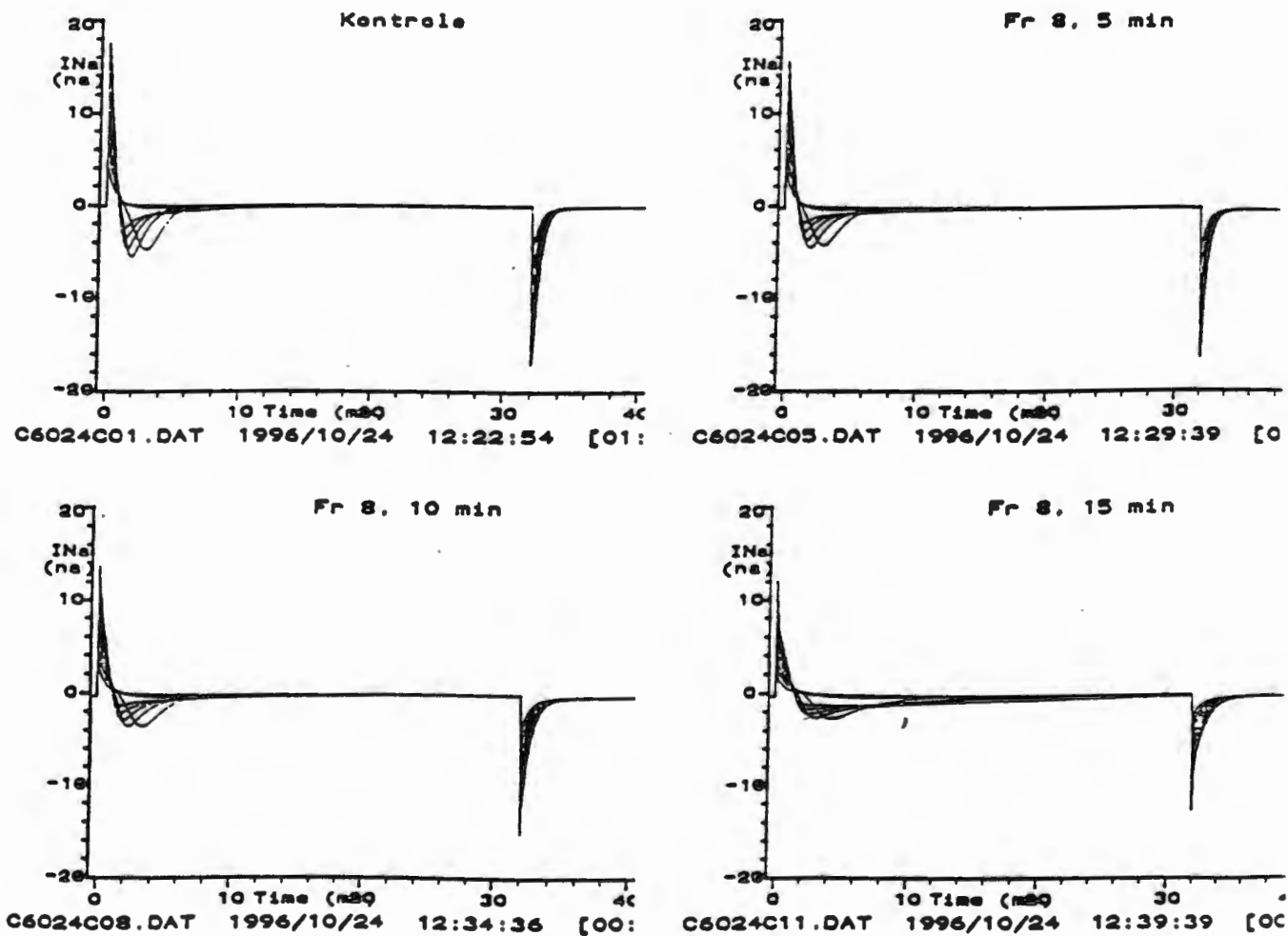
Graag wil ek my opregte dank betuig teenoor die volgende :

- My Skepper en Verlosser vir lewe, gesondheid, krag en genade. *Ek is tot alles instaat in Hom wat vir my krag gee.*
- My ouers, vir die vertroue wat hulle nog altyd in my gehad het en al die liefde en ondersteuning vanaf hulle kant.
- Chelize, vir jou ondersteuning, motivering en liefde.
- Prof. J.J. van der Walt vir hulp, leiding en kennis wat u sonder voorbehoud tot my beskikking gestel het. U leiding was 'n voorreg wat aan my gegun is.
- Prof. F. Verdonck en Dr. J. Tytgat vir u besonderse bydraes en skeiding van die heelgiwwe.
- Mev.C. Fourie vir die aanmaak van die oplossings en bereiding van miosiete.
- Die personeel van die Departement Fisiologie van die PU vir CHO.
- Die personeel van die Beroepshigiëne Departement en Kliniek van Columbus Stainless Steel.

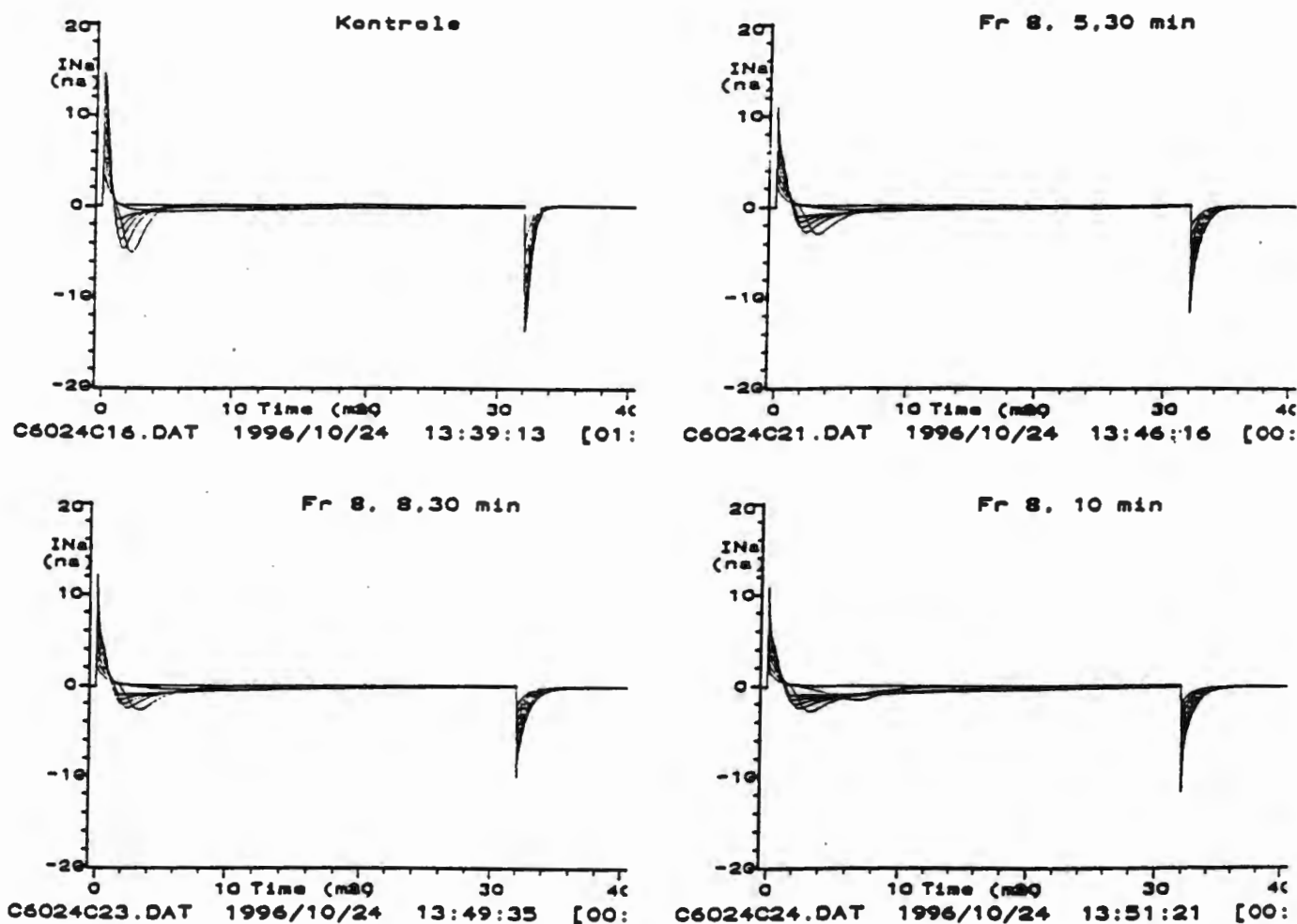
ADDENDUM

Eksperimentele resultate van die effekte van verskillende fraksies van die heelgif van *Opisthoptalmus carinatus* op die Na^+ -kanale van rotventrikulêre miosiete.

1. Fraksie 08 van *O. carinatus*.

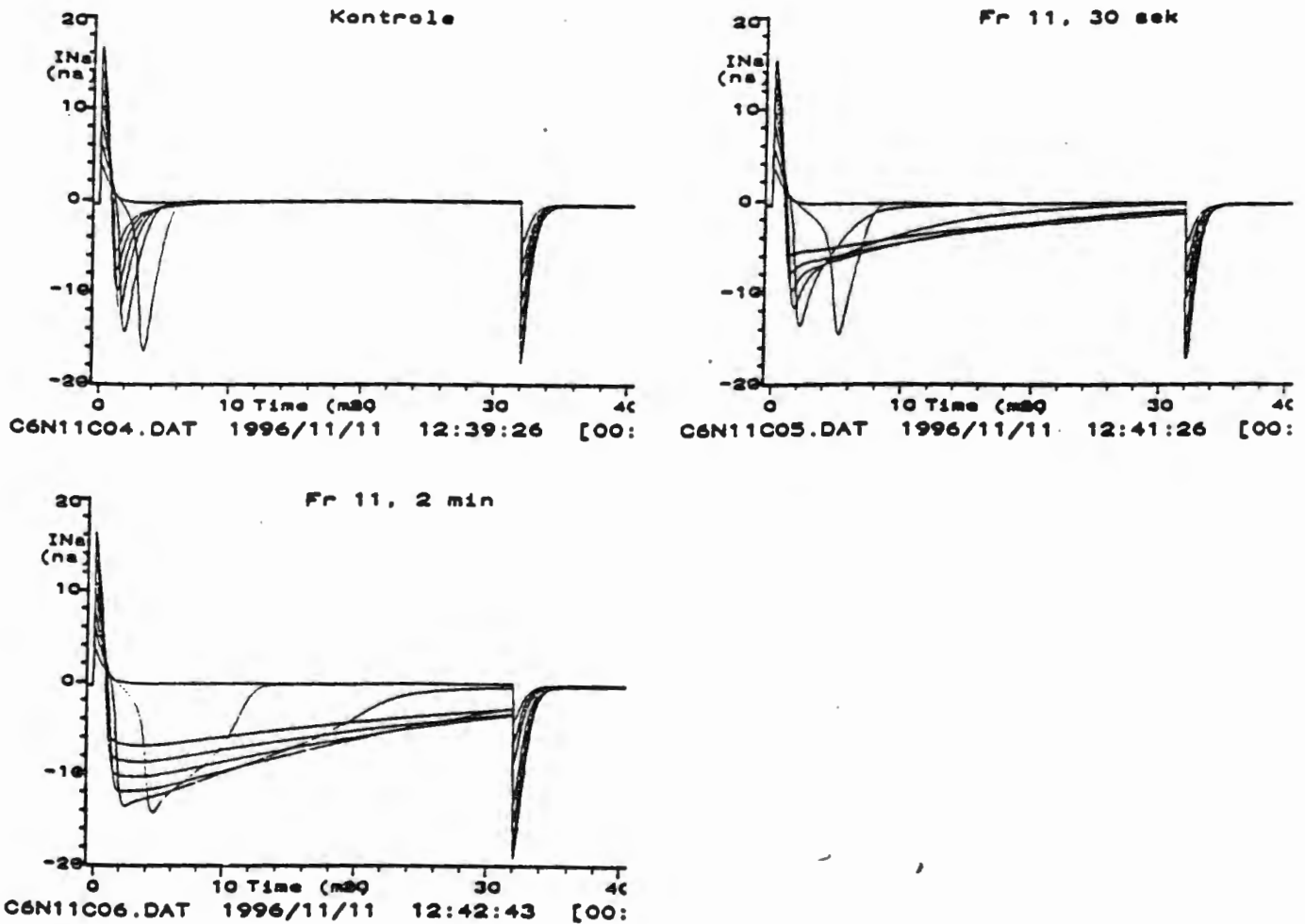


Figuur 1. Na 10 minute van blootstelling van miosiete aan fraksie 8 van die heelgif van *O. carinatus* is geen effekte op die Na^+ -kanaal waarneembaar nie. Die waarneembare veranderinge by die registrasie na 15 minute is toeskryfbaar aan die agteruitgang van die pipet-membraan seël.

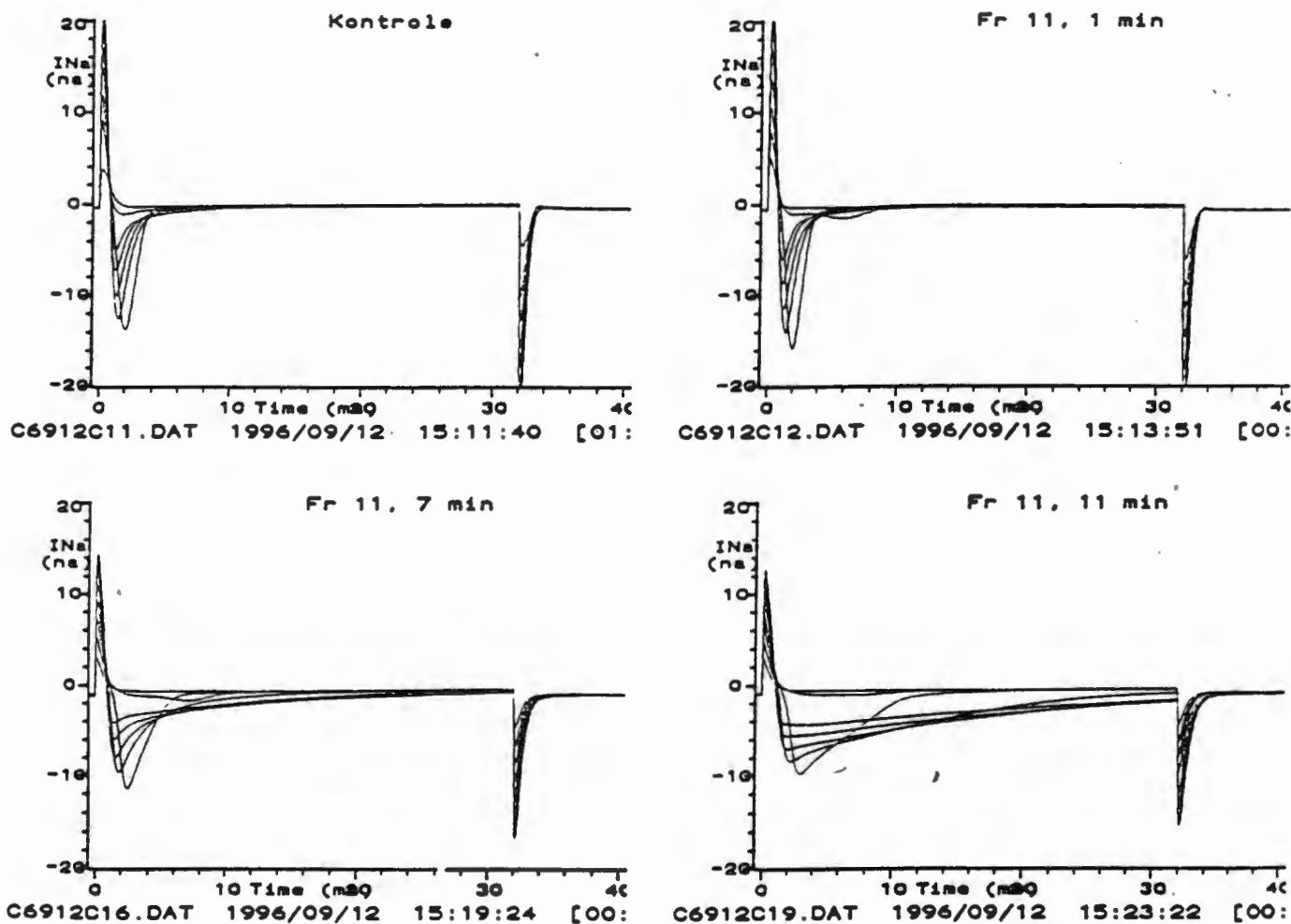


Figuur 2. Geen veranderinge in die Na^+ -stroom wat toegeskryf kan word aan die effek van fraksie 8 van die heelgif van *O. carinatus* is waarneembaar in hierdie registrasies nie. Waarneembare veranderinge kan toegeskryf word aan die agteruitgang van die pipet-membraan seël.

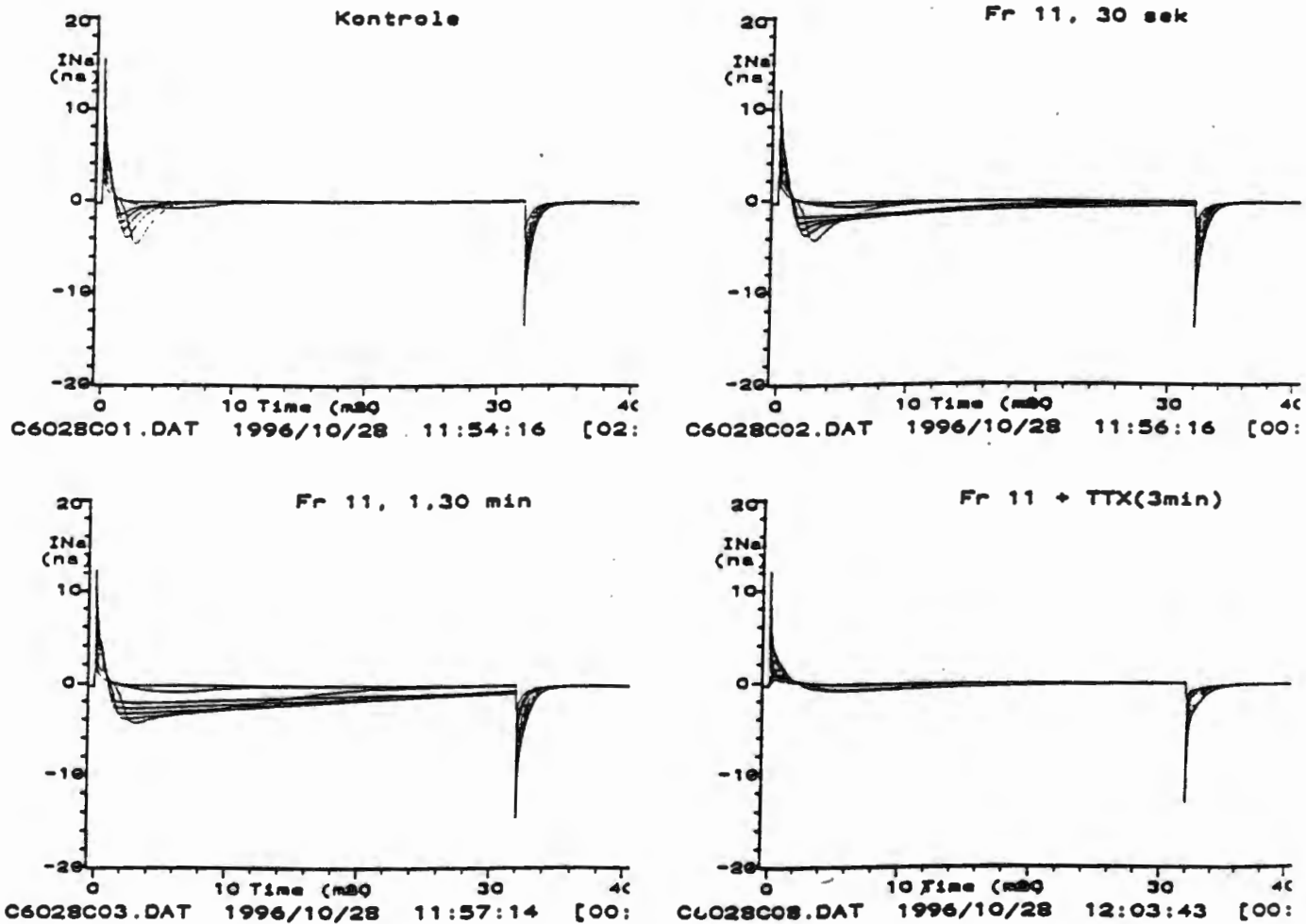
2. Fraksie 11 van *O. carinatus*.



Figuur 3. Binne 30 sekondes van blootstelling aan fraksie 11 van die heelgif van *O. carinatus* is 'n duidelike vertraging van inaktivering van die Na^+ -stroom waarneembaar. Hierdie effek neem toe met 'n verloop van tyd en is verkry met relatiewe lae toksien konsentrasies. Hierdie vertraging van inaktivering en onvolledige inaktivering van die Na^+ -stroom weerspieël tipiese α -toksien effekte.

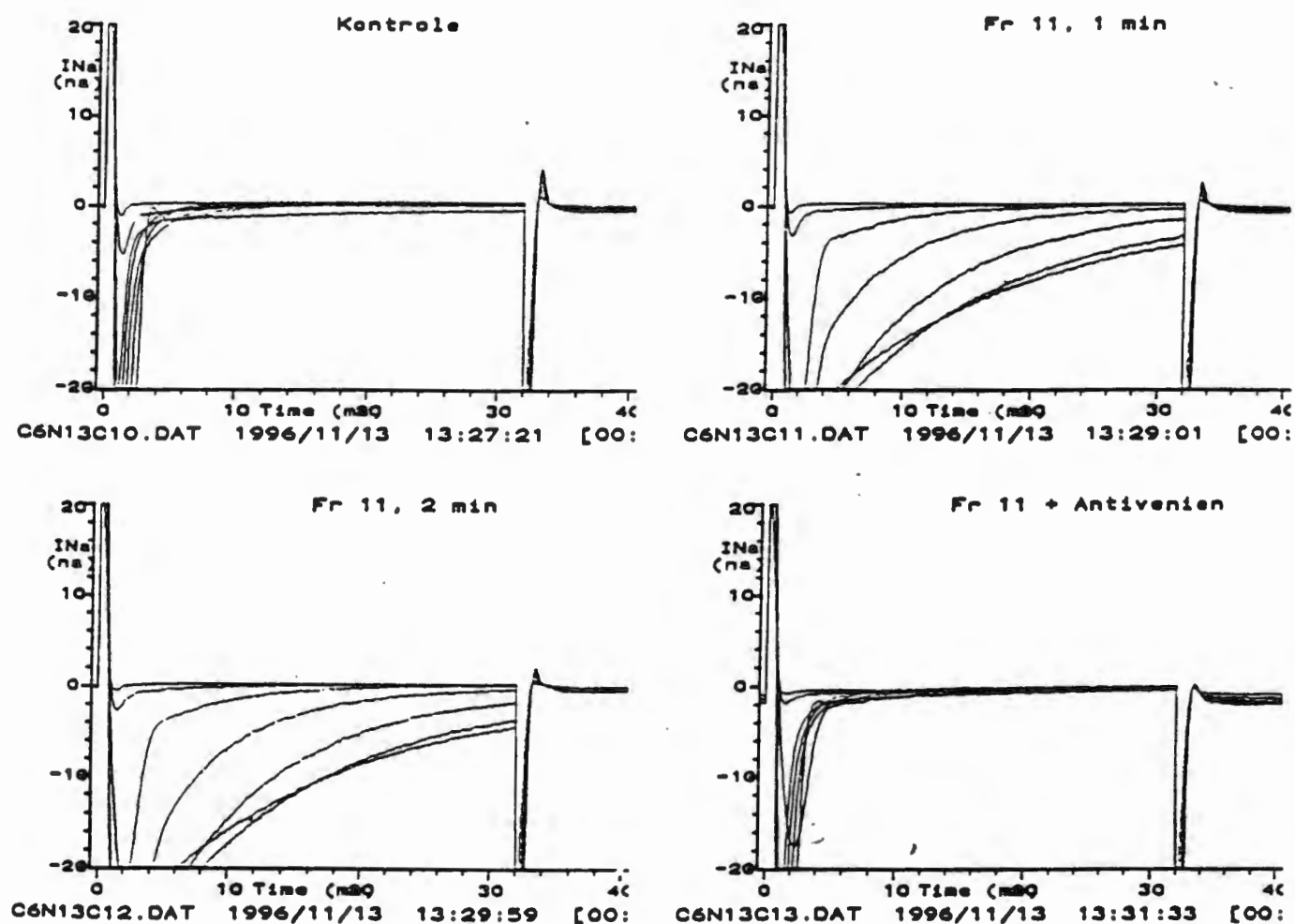


Figuur 4: By laer konsentrasies van fraksie 11 van die heegif van *O. carinatus* neem dit langer vir die α -toksien effekte om tot voorskyn te kom. Na 11 minute is duidelike vertraging van die inaktiveringsfase van die Na^+ -stroom asook onvolledige inaktivering van die stroom wel waarneembaar.



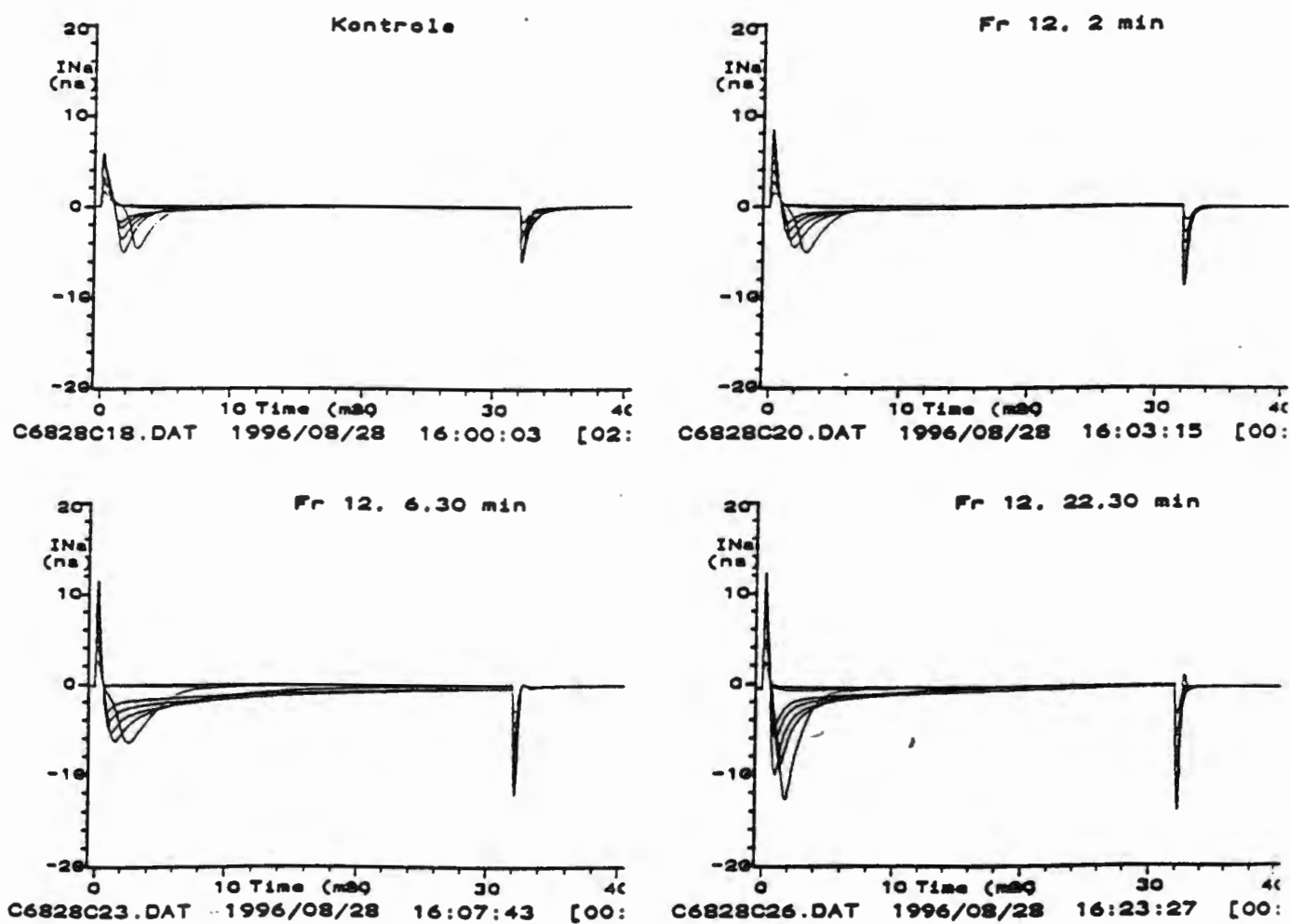
Figuur 5. Blootstelling van miosiete aan fraksie 11 van die heegif van *O. carinatus* veroorsaak effekte wat ooreenstem met α -toksien effekte. Opvolgende blootstelling van die Na^+ -kanale aan TTX veroorsaak die tipiese verwagte blokkeringseffek wat 'n aanduiding is dat die toksien nie die kanaal se proteïen samestelling sal beïnvloed nie maar eerder die oop- en toemaak kinetika van die kanaal.

3. Fraksie 11 van *O. carinatus* en antivenien.



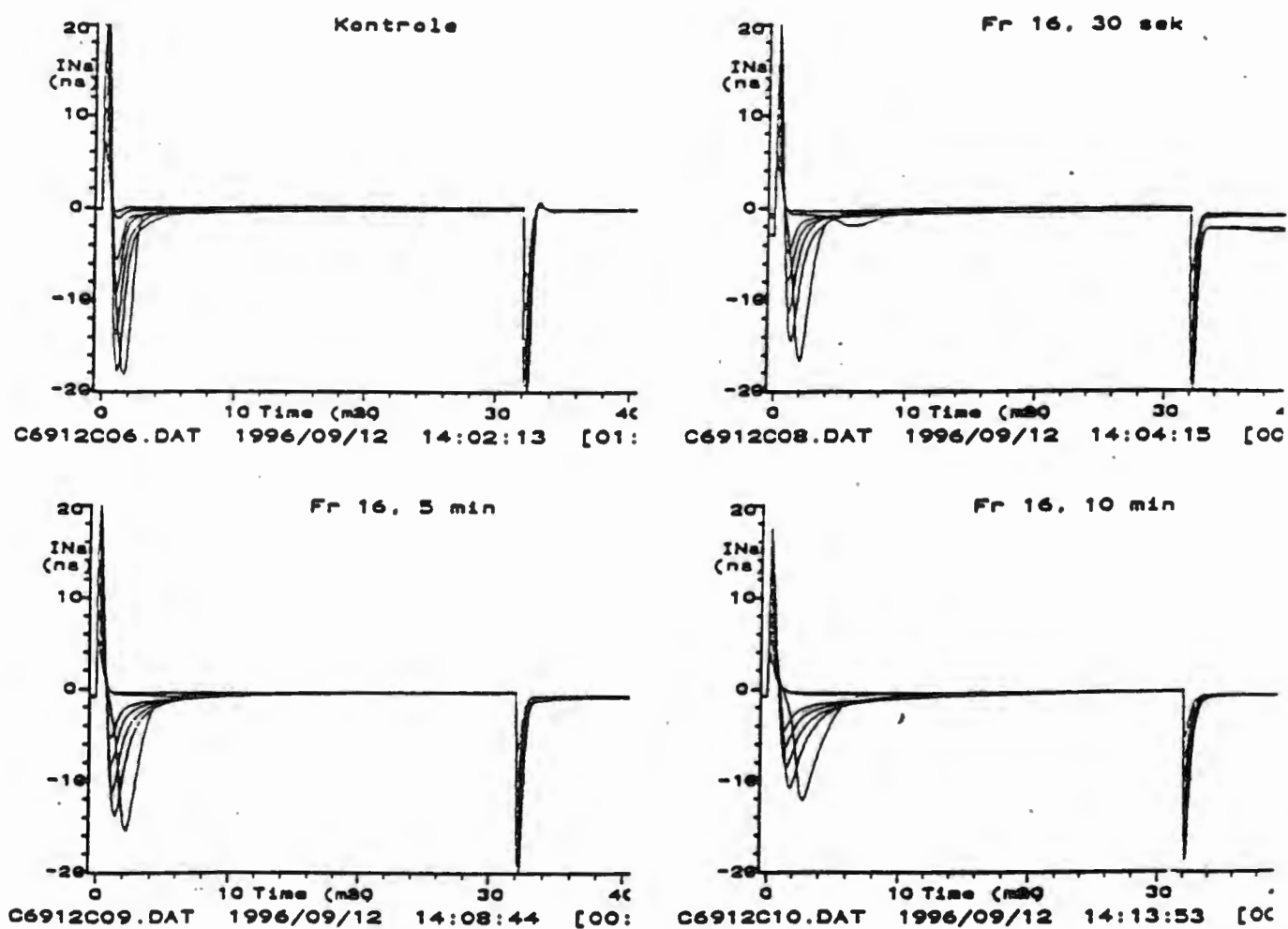
Figuur 6. Binne 1 minuut van blootstelling van die miosiete aan fraksie 11 van die heelgif van *O. carinatus* is α -toksien effekte duidelik waarneembaar. Na die toevoeging van antivenien by die badoplossing is daar 'n duidelike onderdrukking van die waarneembare α -toksien effekte.

4. Fraksie 12 van *O. carinatus*.



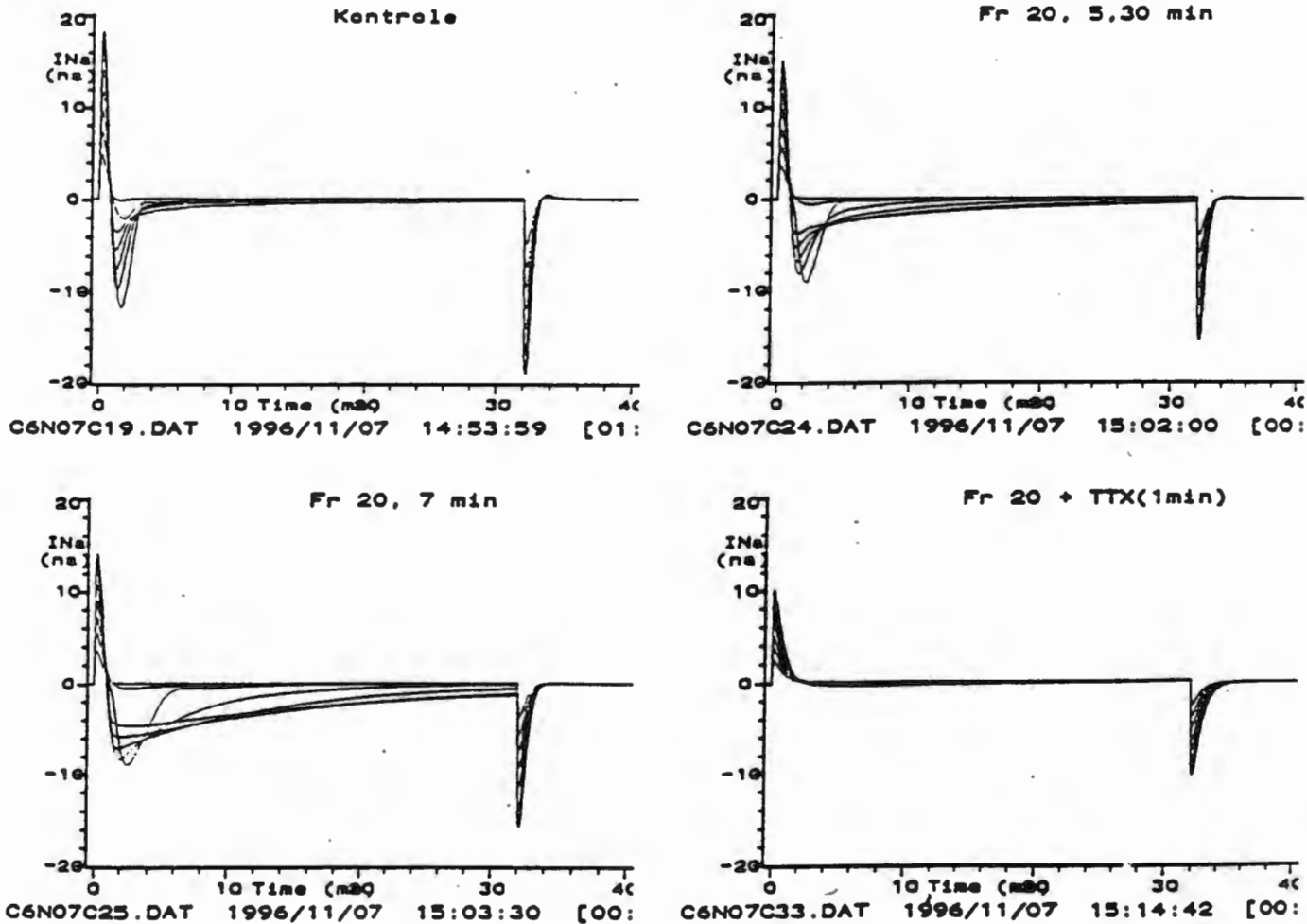
Figuur 7. Geen identificeerbare toksien geïnduseerde effecte op Na^+ -kanale is waarneembaar na blootstelling van miosiete aan fraksie 12 van die heelgif van *O. carinatus* nie.

5. Fraksie 16 van *O. carinatus*.



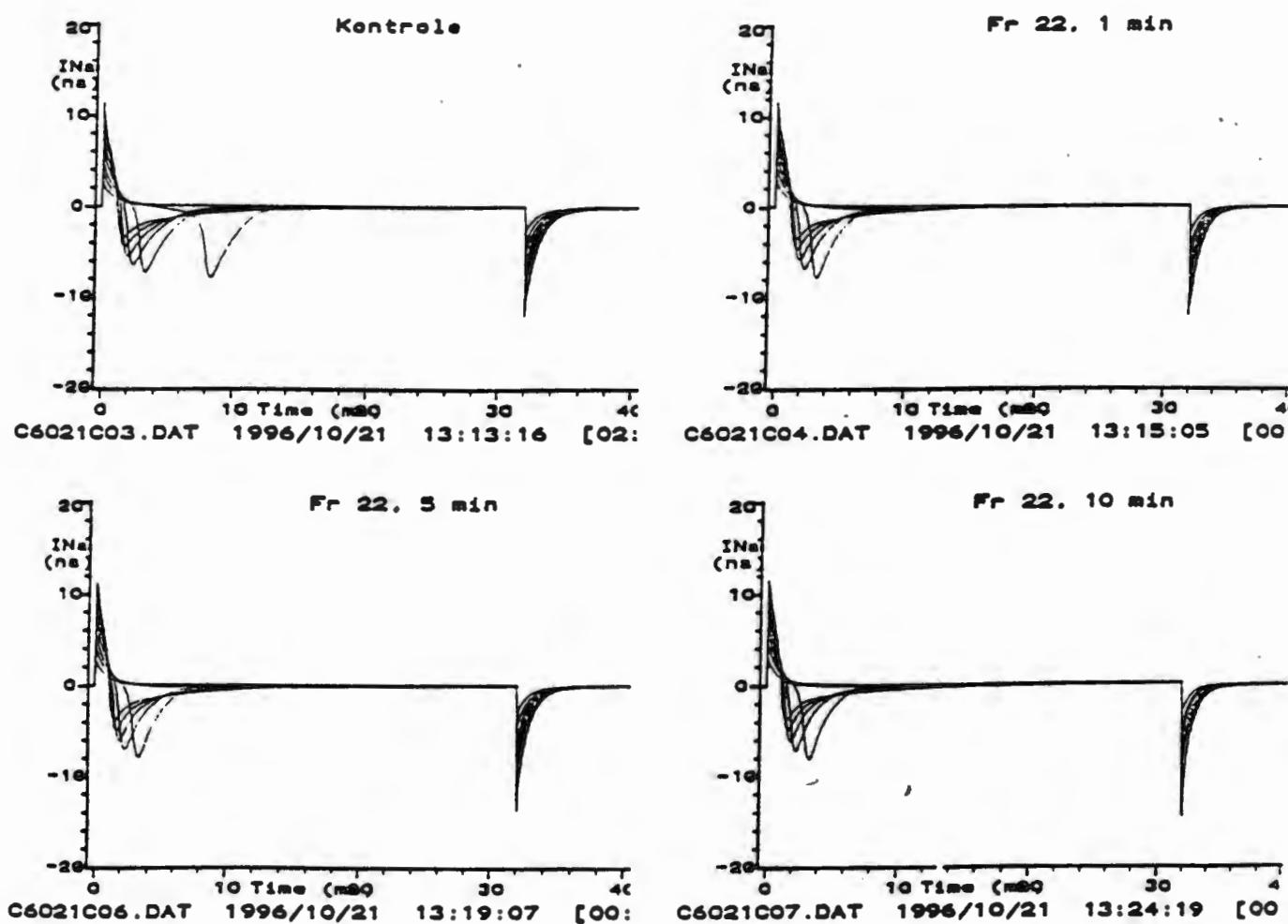
Figuur 8. Blootstelling van miosiete aan fraksie 16 van die heelgif van *O. carinatus* vertoon geen duidelike waarneembare toksien geïnduseerde effekte op Na^+ -kanale nie.

6. Fraksie 20 van *O. carinatus*.



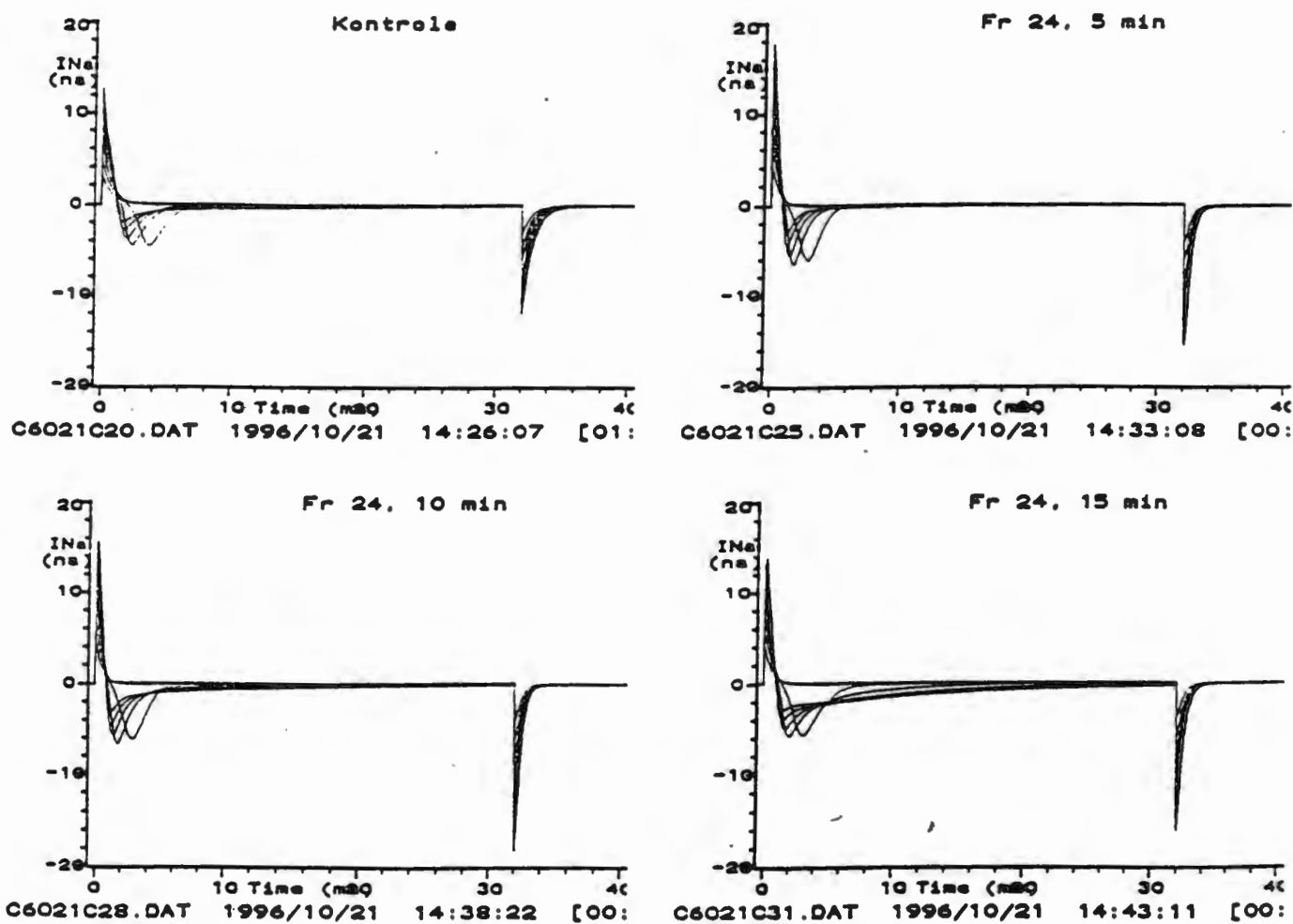
Figuur 9. Blootstelling van miosiete aan fraksie 20 van die heelgif van *O. carinatus* vertoon duidelik waarneembare α -toksien effekte. Na die toevoeging van TTX by die badoplossing is 'n duidelike blokkering van die Na^+ -stroom waarneembaar. Hierdie is 'n aanduiding dat die toksien nie die TTX reseptor beïnvloed nie.

7. Fraksie 22 van *O. carinatus*.



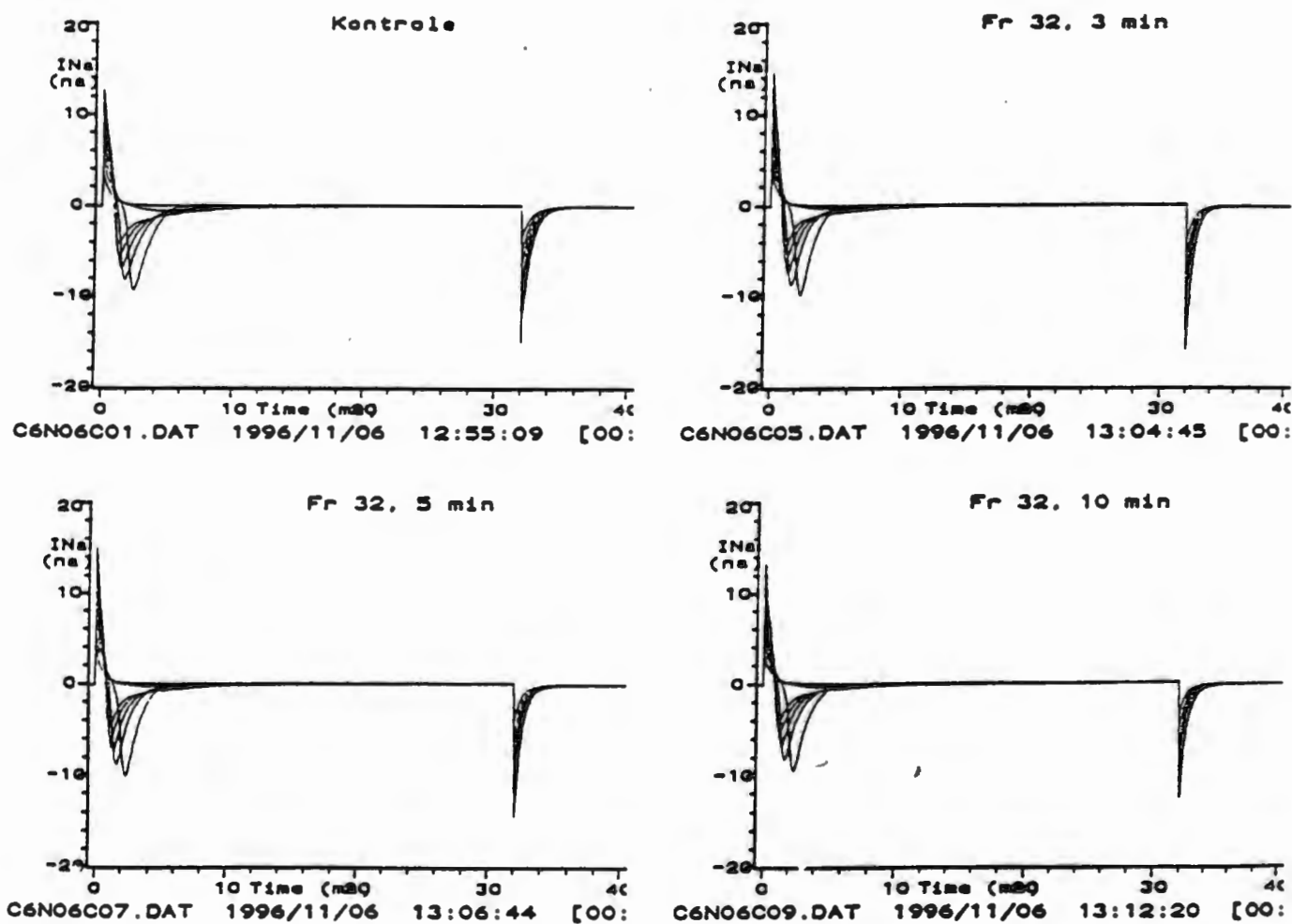
Figuur 10. Blootstelling van miosiete aan fraksie 22 van die heelgif van *O. carinatus* veroorsaak geen waarneembare toksien geïnduseerde effekte nie.

8. Fraksie 24 van *O. carinatus*.



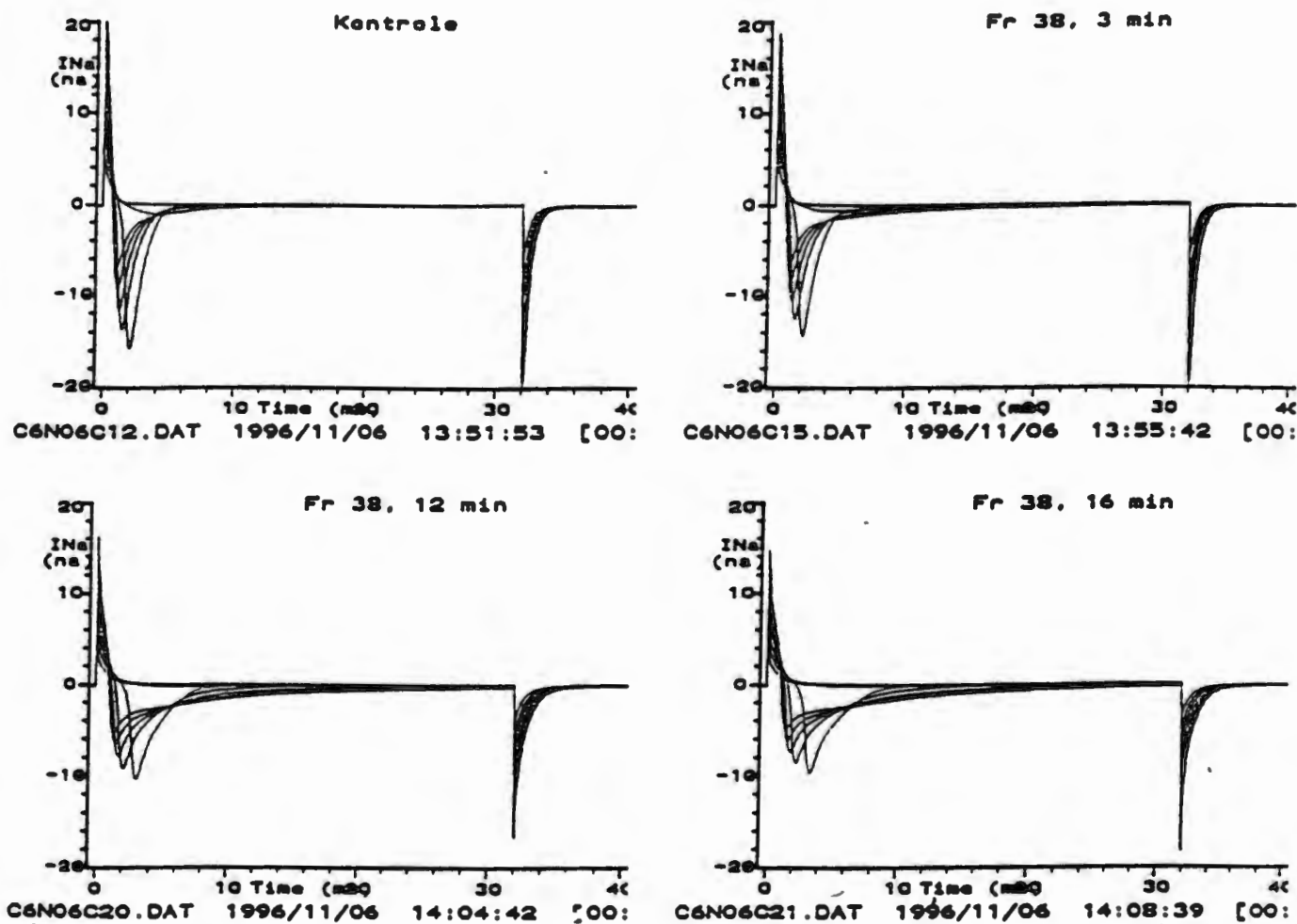
Figuur 11. Geen duidelijk waarneembare toksien geïnduseerde effekte kom voor nadat miosiete blootgesteld is aan fraksie 24 van die heelgif van *O. carinatus* nie.

9. Fraksie 32 van *O. carinatus*.

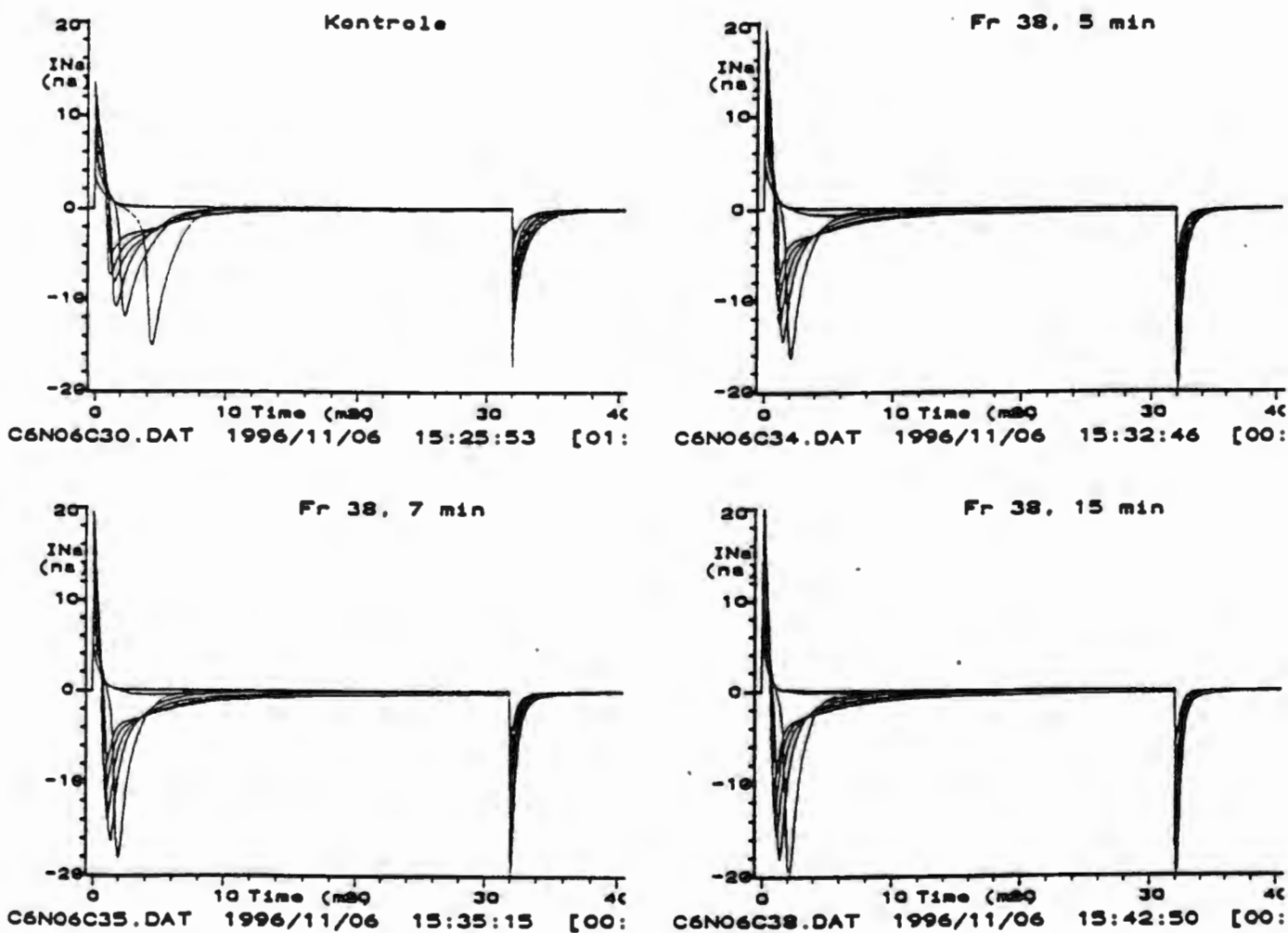


Figuur 12. Blootstelling van miosiete aan fraksie 32 van die heelgif van *O. carinatus* veroorsaak geen waarneembare toksien geïnduseerde effekte nie.

10. Fraksie 38 van *O. carinatus*.



Figuur 13. Na 16 minute se blootstelling van miosiete aan fraksie 38 van die heelgif van *O. carinatus* is slegs 'n klein effek waarneembaar op die inaktivering van Na^+ -kanale. Dit blyk of daar 'n effense vertraging van die inaktiveringsfase van die Na^+ -kanale is. Die grootte van hierdie effek is egter van so 'n aard dat dit weglaatbaar was vir die doeleindes van hierdie projek.



Figuur 14. Blootstelling van miosiete aan fraksie 38 van die heelgif van *O. carinatus* gee aanleiding tot effekte op die inaktiveringsfase van die Na^+ -stroom waarvan die grootte van so 'n aard was dat dit weglaatbaar is vir die doeleindes van hierdie projek.