

BESTUDERING VAN DIE EFFEK VAN SAGATAL^R
(NATRIUMPENTOBARBITURAAT) OP SKELETSPIER
SARKOPLASMIESE RETIKULUMFUNKSIE

DEUR

SUZETTE FRYLINCK

HONNS. B.Sc.

Verhandeling ingedien ter gedeeltelike
nakoming van die vereistes vir die graad

MAGISTER SCIENTIAE
(Fisiologie)

AAN DIE

POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR
CHRISTELIKE HOËR ONDERWYS

LEIER: PROF. N.T. MALAN

POTCHEFSTROOM

JANUARIE 1986

INHOUDSOPGAWE

		Bladsy
HOOFSTUK 1	INLEIDING EN LITERATUURAGTERGROND	1
1.1	Historiese agtergrond	2
1.2	Struktuur en funksie van die skeletspier-sarkotubulêre stelsel	3
1.2.1	T-buis en terminale sisternae	3
1.2.2	Skeletspier sarkoplasmiese retikulum	6
1.2.2.1	Morfologie	6
1.2.2.2	ATPase-proteïen	6
1.2.2.3	Ca ²⁺ -bindingsproteïen (M ₅₅) en kalsekwestrien (M ₄₆)	8
1.2.3	Eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier	10
1.2.3.1	Ca ²⁺ -opname	10
1.2.3.2	Ca ²⁺ -vrystelling	17
1.3	Verdowingsmiddels	19
1.3.1	Lokale verdowingsmiddels	20
1.3.2	Algemene verdowingsmiddels	23
1.3.3	Barbiturate	25
1.4	Doel en motivering	27
HOOFSTUK 2	MATERIAAL EN METODE	29
2.1	Bereiding van SR vesikels uit skeletspier	29

	Bladsy	
2.2	Proteïenbepaling	30
2.3	Bepaling van ATPase-aktiwiteit by skeletspier	31
2.3.1	ATPase-aktiwiteit in die teenwoordigheid van Triton X-100	31
2.4	ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname by skeletspier SR	32
2.4.1	Invloed van sagatal ^R	32
2.4.2	Invloed van natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname ná EDTA-geïnduseerde Ca^{2+} -vrystelling	33
2.5	Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat	33
2.6	Chemikalieë	36
2.7	Statistiese verwerking	36
HOOFSTUK 3	RESULTATE	37
3.1	Totale ATPase-aktiwiteit	37
3.2	Invloed van sagatal ^R op ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname	38
3.3	Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat	42
3.3.1	Invloed van die barbituraat op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit	42
3.3.2	Invloed van preïnkubasie vir verskillende tydsdure	44
3.3.3	Die invloed van temperatuur op die uitwerking van die barbituraat	48
3.3.3.1	Die invloed van temperatuur op die uitwerking van natriumpentobarbitoon en sagatal ^R op totale ATPase-aktiwiteit	48
3.3.3.2	Invloed van temperatuur op die uitwerking van sagatal ^R by Ca^{2+} -opname	51

3.4	Invloed van natriumpentobarbitoon op ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname na EDTA-geïnduseerde Ca^{2+} -vrystelling	56
3.5	Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasies op die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon	58
HOOFSTUK 4	BESPREKING	63
4.1	Totale ATPase-aktiwiteit	64
4.1.1	Invloed van die barbituraat op ATPase-aktiwiteit	65
4.2	Ca^{2+} -opname-aktiwiteit	66
4.2.1	ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname	67
4.2.2	Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat	68
4.2.2.1	Invloed van sukrose op die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon	69
4.2.2.2	Invloed van preïnkubasie vir verskillende tydsdure	71
4.2.2.3	Invloed van temperatuur op die werking van barbituraat	72
4.2.2.3.1	Invloed van temperatuur op die werking van natriumpentobarbitoon en sagatal ^R op totale ATPase-aktiwiteit	72
4.2.2.3.2	Invloed van temperatuur op die werking van sagatal ^R by Ca^{2+} -opname	74
4.2.2.4	Invloed van natriumpentobarbitoon op membraandeurlaatbaarheid	76
4.2.2.5	Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasies op die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon	78

	Bladsy
OPSOMMING	81
SUMMARY	84
LITERATUURLYS	87
AFKORTINGS	98
BEDANKINGS	99

HOOFSTUK 1

INLEIDING EN LITERATUURAGTERGROND

Die sarkotubulêre sisteem speel 'n baie belangrike rol gedurende die eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier. Die sarkotubulêre sisteem bestaan uit die transverse of T-buise en die sarkoplasmiese retikulum (SR). In 'n rustende spier word die sarkoplasmiese Ca^{2+} -konsentrasie gehandhaaf deur die ATP-afhanklike Ca^{2+} -pomp in die SR-membraan (Fuchs, 1974). Same-trekking en verslapping word volgens die vesikel-teorie gereguleer deur die opname en vrystelling van kalsium deur die SR (Hasselbach, 1964), terwyl kruisbrug-aktiwiteit gereguleer word deur die Ca^{2+} -konsentrasie in die sarkoplasma (Fuchs, 1974).

Farmakologiese middels veroorsaak veranderinge in die funksionele eienskappe van die SR-membrane (Herbette *et al.*, 1982). Die verdowingsmiddels word in drie groepe verdeel, naamlik barbiturate, lokale- en algemene verdowingsmiddels. Daar bestaan verskeie voorgestelde meganismes vir die werking van die verdowingsmiddels, byvoorbeeld 'n depolariseringsuitwerking (Saida & Suzuki, 1981), inhibisie van Ca^{2+} -vrystelling (Volpe *et al.*, 1983), kompeterende inhibisie (Malinconico & McCarl, 1982) en vervloeiing van die membrane (Miller & Pang, 1976) om maar 'n paar te noem.

In hierdie projek is gepoog om die uitwerking wat sagatal^R (natriumpentobarbitoon) op die skeletspier SR-funksie het, te bestudeer en om verder die meganisme waarvolgens die uitwerking uitgeoefen word vas te stel.

In Hoofstuk 1 word die historiese agtergrond van die ontwikkeling van navorsing oor die SR behandel. 'n Literatuurbespreking word gegee oor die invloed wat die verskillende verdoingsmiddels op die SR-funksie het asook die verskillende meganismes wat daar bestaan vir hulle spesifieke werking. In Hoofstuk 2 volg 'n bespreking van die metodes wat gebruik is. Hoofstuk 3 handel oor die resultate wat verkry is. In Hoofstuk 4 word die resultate bespreek en gevolgtrekkings gemaak oor die meganisme waarvolgens sagatal^R (natriumpentobarbitoon) die SR-funksie beïnvloed.

1.1 Historiese agtergrond

Reeds in die laat agtiende eeu, 1791, het Galvani melding gemaak van aksiepotensiaal en depolarisasie en hoe dit spiersametrekking veroorsaak. Sandow het in 1952 na hierdie elektriese fenomeen as die eksitasie-kontraksiekoppeling verwys (Ebashi, 1976). In 1894 het Locke aangetoon dat Ca^{2+} noodsaaklik is vir elektriese eksiteerbaarheid van membrane (Kwant & Seeman, 1969). Retzius het in 1882 en Verratti in 1902 die teenwoordigheid van 'n retikulêre struktuur binne die miofibrille beskryf (Hasselbach, 1964). Bennett & Porter beskryf in 1953 die teenwoordigheid van 'n netwerk-struktuur, die sarkoplasmiese retikulum binne die interfibrillêre ruimte van die skeletspier (Fuchs, 1974).

In 1952 het Marsh gevind dat 'n skeletspierhomogenaat wat die miofilamente bevat, nie sametrekking vertoon as ATP bygevoeg word nie. Indien die ATP egter by geïsoleerde miofibrille gevoeg word, word wel spiersametrekking verkry. Daar is afgelei dat in die spierhomogenaat 'n verslappingsfaktor teenwoor-

dig is, wat hierdie spiersametrekking inhibeer. Hanson & Huxley het in 1953 voorgestel dat die aktien en miosien wat die twee vernaamste kontraktiele proteïene is, voorkom as twee stelle paralelle filamente wat kontraksie laat plaasvind.

Die SR-membrane bevat 'n ATP-afhanklike Ca^{2+} -pomp wat die sarkoplasmiese Ca^{2+} -konsentrasie in 'n rustende spier handhaaf. Tydens stimulasie word 'n elektriese impuls langs die T-buis vervoer wat die SR-membraan depolariseer en waardeur vinnige vrystelling van Ca^{2+} plaasvind sodat die sarkoplasmiese Ca^{2+} -konsentrasie verhoog (Fuchs, 1974). Volgens Ebashi & Endo (1968) reguleer die sarkoplasmiese retikulum die Ca^{2+} -konsentrasie in die mioplasma van die skeletspiervesels gedurende die sametrekking-verslapping-siklus volkome. Daar is voorgestel dat die SR die Ca^{2+} vrystel wat spiersametrekking veroorsaak en die Ca^{2+} weer opneem wanneer spierverslapping begin.

1.2 Struktuur en funksie van die skeletspier-sarkotubulêre stelsel

Die sarkotubulêre stelsel bestaan uit die T-sisteem en die sarkoplasmiese retikulum.

1.2.1 T-buis en terminale sisternae

Die T-buis is hoofsaaklik instulpings of invouings van die sarkolemma (Fuchs, 1974) wat die interne dele van die spiervesel diep binnedring (Bloom & Fawcett, 1975:303).

Volgens Bloom en Fawcett (1975:303) verloop pare paralelle terminale sisternae transversaal oor die miofibrille naby aan die

T-buise. Twee terminale sisternae kom aan weerskante van die T-buis voor en die hele struktuur is bekend as 'n triade (Franzini-Armstrong, 1970). By amfibieë kom die triade rondom elke I-band voor op die vlak van die Z-lyn, terwyl daar by soogdiere twee triades vir elke sarkomeer voorkom by die aansluitings van elke A-band met die naasliggende I-bande (Bloom & Fawcett, 1975:303). Tussen die T-buis en die terminale sisternae kom daar 'n ruimte van 120-140 Å voor. Met periodieke intervalle van ongeveer 300 Å vorm die SR-membraan klein uitstulplings wat deur middel van 'n amorfte stof verbind is aan die T-buis-membrane. Hierdie SR-uitstulplings en die amorfte stof staan bekend as die SR-voete. Die SR-voete is parallel gerangskik. Dit wil voorkom of die aansluitingsgebied tussen die SR-voete nie gevul is nie. Die SR-voete beslaan nie meer as 30% van die oppervlak van die T-sisteem en nie meer as 3% van die totale SR gebied nie (Franzini-Armstrong, 1970).

Daar het baie jare lank onsekerheid bestaan oor die teenwoordigheid van die opening van die T-buis by die sarkolemma. In 1970 het Franzini-Armstrong die teenwoordigheid van die opening by die T-buis baie duidelik aangetoon. Die hoeveelheid openinge per eenheid oppervlak-area kan egter nie met behulp van elektronmikroskopie aangedui word nie. Ebashi (1976) skryf die onvermoë om die opening te vind, toe aan die moontlike feit dat die opening baie klein is.

Die algemene hipotese by die eksitasie-kontraksiekoppeling is dat depolarisasie van die T-buis membraan deur die aksiepotensiaal, depolarisasie van die SR-membraan veroorsaak en Ca^{2+} -vrystelling vanuit die SR plaasvind. Daar word aangeneem dat dié aansluiting van die triade moontlik deelneem aan hierdie kope-

ling (Franzini-Armstrong, 1970). Endo *et al.*, (1970) stel voor dat Ca^{2+} -vrystelling 'n regeneratiewe proses is waarin Ca^{2+} self die vrystelling van verdere Ca^{2+} uit die SR veroorsaak. Volgens Schwartz (1972) beweeg Ca^{2+} by die hartspier tydens elke depolarisasie in nanomol hoeveelhede in die sel in waar dit met sowel die selmembraan as die SR reageer. Dit is moontlik dat die Ca^{2+} vrystelling van bykomende Ca^{2+} veroorsaak. Volgens Fuchs (1974) word daar tussen twee moontlike meganismes onderskei waarvolgens die T-buise by Ca^{2+} -vrystelling betrokke is, 1. 'n regstreekse elektriese koppeling tussen die T-buis en die SR-membrane, met die SR-membrane se deurlaatbaarheid vir Ca^{2+} wat spanning-afhanklik is en 2. 'n chemiese verband tussen die twee membrane waar Ca^{2+} self die Ca^{2+} -vrystelling uit die SR kan inisieer. Brandt *et al.* (1980) toon die teenwoordigheid van 'n ATP-afhanklike Ca^{2+} -pomp in die transverse buise by konynskeletspier aan, wat 'n intrinsieke komponent van die geïsoleerde T-buis membraan is. Die geïsoleerde T-buise het 'n Ca^{2+} -ATPase-aktiwiteit van 0,78 nmol/min.mg en neem meer as 70 nmol Ca^{2+} .mg⁻¹ proteïen op. Hierdie Ca^{2+} -opname is vernietig deur die Ca^{2+} -ionofoor A23187. Die Ca^{2+} -pomp van die geïsoleerde T-buis verskil van die Ca^{2+} -pomp van die SR en sarkolemma deurdat die Ca^{2+} -pomp van die T-buis 1. nie verhoog is deur oksalaat nie, 2. nie versnel is deur stowwe soos asetielfosfaat of para-nitrofenielfosfaat nie en 3. nie stowwe soos para-nitrofenielfosfaat gehidroliseer het nie. Brandt *et al.* (1980) het ook gevind dat die Ca^{2+} -ATPase in die T-buis nie verhoog word deur stowwe wat die T-buise lekbaar maak nie. Die bevinding dat die T-buise min kalsiumoksaalaat akkumuleer, dien om die T-buise van die SR en plasma-membrane te onderskei.

1.2.2 Skeletspier sarkoplasmiese retikulum

1.2.2.1 Morfologie

Die sarkoplasmiese retikulum (SR) is 'n intrasellulêre netwerk van buise wat dwarsdeur die sarkoplasma en rondom elke miofi-bril voorkom (Bloom & Fawcett, 1975:303).

Die SR bestaan uit twee dele wat onderling aan mekaar verbind is, naamlik die terminale sisternae wat 'n sakagtige struktuur is en die longitudinale buise of L-buise. Die SR-buise wat die A-bande oorkruis, is oorheersend longitudinaal gerangskik en hulle eindig in die transversaal gerangskikte terminale sisternae wat oor 'n groter deursnee beskik (Bloom & Fawcett, 1975: 303). Daar word drie groepe vesikels onderskei, naamlik ligte-, intermediêre- en swaar vesikels. Die vesikels verskil van mekaar deurdat die swaar vesikels oor 'n groter hoeveelheid nie-spesifieke Ca^{2+} -bindingsplekke beskik as die ligte vesikels, in ooreenstemming met die groot hoeveelheid Ca^{2+} -bindingsproteïene (Meissner, 1975). Die SR-vesikels bestaan ná suiwering uit ongeveer 65% proteïene en 35% lipiede (Eletr & Inesi, 1972). Volgens Meissner *et al.* (1973) maak die eenvoud van die SR-struktuur dit 'n veelbelowende sisteem vir die bestudering van aktiewe transport by 'n membraansisteem. Uit die literatuur is dit duidelik dat die SR 'n goed geordende buisstelsel is. Die funksie van die SR lê in die beheer van die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasies (Hasselbach, 1964).

1.2.2.2 ATPase-proteïene

Die SR-vesikels besit 'n hoogs doeltreffende Ca^{2+} -transportsis-

teem wat deur 'n membraan-gebonde ATPase bemiddel word (De Meis & Vianna, 1979). In 1975 het Meissner aangetoon dat, indien die Ca^{2+} -bindingsproteïene en die M_{55} -proteïene uit die swaar vesikels verwyder word, daar leë membraanagtige strukture agterbly wat hoofsaaklik uit Ca^{2+} -pompproteïene en fosfolipiede bestaan. Die Ca^{2+} -pompproteïene (ATPase-ensiem of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase) is die hoof membraanproteïene, wat die grootste deel van die SR-proteïene beslaan (MacLennan *et al.*, 1985; Meissner *et al.*, 1973). Die ATPase -molekuul beskik oor 'n molekulêre massa van 100 000 dalton (MacLennan *et al.*, 1985; Margreth *et al.*, 1974; Sarzala *et al.*, 1975; Stewart & MacLennan, 1974).

Die ATPase-proteïene beskik oor die volgende eienskappe wat bydra tot die strukturele eienskappe van die SR-vesikels:

- i. Tydens vriesfraksionering van die SR-vesikelmembraan word die membraan in 'n buitenste en binneste deel gesplyt, waarna beide dele 'n konkawe en 'n konvekse oppervlak besit (Malan, 1976: 27, 28). In 'n studie van die invloed wat tyd op die ontwikkeling van die SR-struktuur het, voor en na geboorte, het Sarzala *et al.* (1975) aangetoon dat die skeletspier SR-vesikels van konynembrio's en pasgebore konyne oor 'n gladde voorkoms beskik en die 40 Å-partikels afwesig is, terwyl dit by volwasse diere teenwoordig is. Hierdie 40 Å-partikels verskyn eers 8-10 dae na geboorte. Volgens hierdie outeurs stem die afwesigheid van die 40 Å-partikels en die lae ATPase-inhoud ooreen met die lae Ca^{2+} -afhanklike ATPase en die lae Ca^{2+} -opname wat by hierdie ontwikkelende SR-vesikels gevind is.

- ii. In 1974 het Tillack *et al.* die teenwoordigheid van sferiese 75 Å-partikels binne die SR-membraan van kuikens aangetoon wat 'n groter mate op die konkawe as op die konvekse dele voorgekom het. Hierdie outeur het aangedui dat die skerp styging in Ca^{2+} -transport en Ca^{2+} -ATPase-aktiwiteit met verloop van tyd gepaard gaan met 'n toename in 75 Å-partikels. Boland *et al.* (1974) het aangetoon dat ná 10-14 dae van embrionale ontwikkeling die ATPase en Ca^{2+} -transport in die SR-vesikels laag was. Tussen 14-30 dae van ontwikkeling was daar 'n geweldige toename in onder meer die ekstra ATPase-aktiwiteit en Ca^{2+} -transport. Met behulp van vriesfraksionering het Scales & Inesi (1976) aangetoon dat daar 90 Å-partikels op die konkawe dele van die vesikel voorkom. Deur onder meer van negatiewe kleuring gebruik te maak, toon hierdie outeurs die teenwoordigheid van uitwaartse projeksies aan. By vesikels wat geïnkubeer is met tripsien, was die uitwaartse projeksies afwesig. Die tripsien splyt die ATPase en verander die ultrastruktuur van die vesikels. Volgens Scales & Inesi (1976) kan sowel die uitwaartse projeksies as die 90 Å-partikels verwant wees aan die ATPase-proteïen.

1.2.2.3 Ca^{2+} -bindingsproteïen (M_{55}) en Kalsekwestrien (M_{45})

In 1973 beskryf Meissner *et al.* die isolering van 'n gesuiwerde SR-preparaat. Die drie hoof proteïenkomponente wat waargeneem is, is die Ca^{2+} -pompproteïen, die Ca^{2+} -bindingsproteïen en die M_{45} -proteïene wat onderskeidelik 90%, 5-10% en 5-10% van die proteïen beslaan. Stewart & MacLennan (1974) toon aan dat met vertering deur tripsien, word die ATPase-proteïen in twee pep=

tiede, met 'n molekulêre massa van 45 000 en 55 000 dalton, geklief. Geen verlies van ATPase-aktiwiteit vind plaas nie. Die twee ekstrinsieke proteïene (MacLennan *et al.*, 1985) bestaan uit die M_{45} -proteïen of kalsekwestrien, wat 'n molekulêre massa van 44 000 besit (MacLennan & Wong, 1971) of 46 500 (Ostwald & MacLennan, 1974) en die M_{55} -proteïen of Ca^{2+} -bindingsproteïen met 'n molekulêre massa van 55 000 (Meissner, 1975; Meissner *et al.*, 1973; Ostwald & MacLennan, 1974). MacLennan (1974) toon die bestaan van 'n tweede tipe kalsekwestrien aan waarvan die molekulêre massa 6% minder is as die eerste tipe. In die rot kom die M_{45} -proteïen en die affiniteit M_{55} -proteïen eerder op die binne-oppervlak van die SR-vesikel voor (Yu *et al.*, 1976). Die M_{45} -proteïen is uniek aan die SR en is hidrofobies aan die binnekant van die SR-vesikels gebind (MacLennan & Wong, 1971). Michalak *et al.* (1980) toon aan dat proteïene met 'n massa van 55 000 dalton in die transverse buise voorkom en hierdie outeurs bevestig dat dié proteïene wel die Ca^{2+} -bindingsproteïene is. Michalak & MacLennan (1980) stel voor dat die sintese van die M_{45} -proteïen gekoördineerd is met die M_{55} -proteïen, hoewel die M_{45} -proteïen 'n glikoproteïen is, terwyl die M_{55} -proteïen nie geglikosileerd is nie.

Die rol van die M_{55} -proteïen(e) (Margreth *et al.*, 1974) en die M_{45} -proteïen (MacLennan & Wong, 1971) lê albei in die sekwestrasie van Ca^{2+} wat na die buite-oppervlak van die membraan vervoer is deur die transport-ATPase. By 'n pH 7,5 in die teenwoordigheid van KCl, bind die M_{55} -proteïen slegs 16-22 nmol Ca^{2+} per mg terwyl die M_{45} -proteïen 850 nmol Ca^{2+} per mg bind. In die afwesigheid van KCl, sal die M_{55} -proteïen wat ook die enigste proteïen is met 'n hoë affiniteit vir Ca^{2+} , ongeveer 460 nmol Ca^{2+} per mg bind (Ostwald & MacLennan, 1974).

MacLennan & Wong (1971) bevind dat M_{45} -proteïen tot ongeveer 970 nanomol Ca^{2+} per mg bind, by n pH 7,5.

1.2.3 Eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier

Sametrekking en verslapping by die spier word beheer deur die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die spiervesel (Ebashi & Endo, 1968; Sandow, 1970). Die aksiepotensiaal by die sarkolemma word deur die T-sisteem na die binnekant van die spiervesel gelei waar die depolarisasie van die T-sisteem se membraan Ca^{2+} -vrystelling uit die terminale sisternae van die SR veroorsaak. Die vrygestelde Ca^{2+} bind nou aan die troponien en sodoende word die inhiberingsuitwerking van troponien, wat in die troponien-tropomiosienkompleks voorkom, op die interaksie tussen aktien en miosien opgehef. Sametrekking vind nou plaas. Deur gebruik te maak van die energie van ATP, word die Ca^{2+} wanneer die depolariseringseffek eindig, weer opgeneem (Ebashi & Endo, 1968). Die L-buise van die SR neem die Ca^{2+} terug na die terminale sisternae waar dit gestoor word vir die volgende same-trekking. Volgens Gergely (1974) kan die M_{45} -proteïen ook betrokke wees by die berging van Ca^{2+} . Uitruiling vind plaas tussen die Ca^{2+} in die sarkoplasma, die buisgedeelte van die retikulum en die kontraktiele filamente met Ca^{2+} wat vanuit die terminale sisternae lek. In die rustende spier is die uit-lekking van Ca^{2+} min, maar neem toe tydens stimulasie (Winegrad, 1970).

1.2.3.1 Ca^{2+} -opname

Tydens die hidrolise van ATP vind vrystelling van n anorganiese fosfaat (Pi) plaas. Die hidrolise word deur die ATPase-

ensiem bewerkstellig. MacLennan & Wong (1971) stel voor dat die ATPase moontlik as 'n transport-proteïen optree. Uit die literatuur is dit bekend dat die ATPase die Ca^{2+} - Mg^{2+} -afhanklike ATP-hidrolise kataliseer. Hidrolise van ATP voorsien die energie vir die SR om Ca^{2+} van die eksterne vloeistof af teen 'n konsentrasiegradiënt te vervoer. Indien die Ca^{2+} afwesig is, vertoon die SR 'n lae Mg^{2+} -afhanklike ATPase-aktiwiteit. In die teenwoordigheid van Ca^{2+} verhoog die ATPase-aktiwiteit en is dit dus 'n Ca^{2+} -afhanklike ATPase (Tonomura, 1973: 311, 313). Die Ca^{2+} -transport-ATPase is eenvormig versprei dwarsdeur die longitudinale buise en in die terminale sisternae, maar kom waarskynlik nie in die aansluitingsgebied van die sisternae-membraan wat die triade met die T-buise vorm, voor nie. Die Ca^{2+} -kanale wat verantwoordelik is vir die aktivering van Ca^{2+} -vrystelling in gestimuleerde spiere, verskil van die Ca^{2+} -ATPase en is hoofsaaklik geleë in die aansluitingsgebied van die SR (Martonosi, 1984).

1. Die struktuur van die Ca^{2+} -ATPase

Die ATPase-molekuul bestaan uit vyf polêre segmente (Allen & Green, 1976; Klip *et al.*, 1980). Tydens vertering van die Ca^{2+} -ATPase met tripsien, word in die eerste stap twee hooffragmente verkry, naamlik fragment A met 'n molekulêre massa van 55 000 en fragment B met 'n molekulêre massa van 45 000, terwyl daar in stap 2, tydens kliewing van fragment A, twee subfragmente gevorm word (Shamoo *et al.*, 1976; Stewart & MacLennan, 1974). Klip *et al.* (1980) slaag daarin om die ligging van die tripsienkiewingsplekke te bepaal. Die eerste en tweede tripsienkiewingsplekke is geleë in segmente III en II onderskeidelik wat aan die hand doen dat segmente II en III aan die

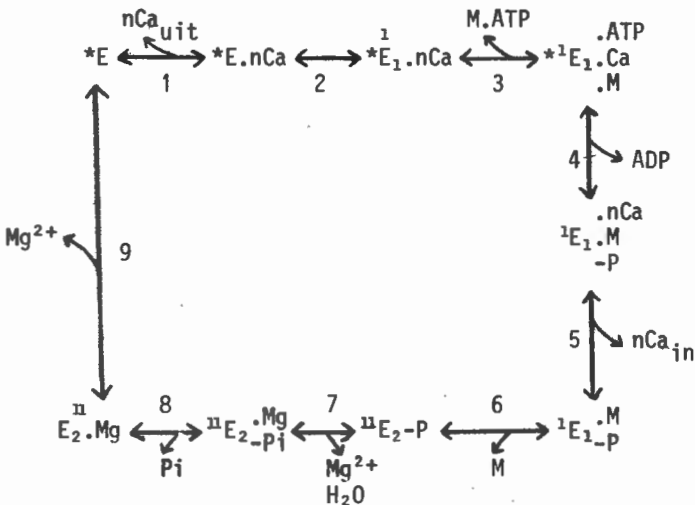
buite-oppervlak van die SR-membraan blootgestel is, aangesien die membraan ondeurlaatbaar vir tripsien is. Dit wil voorkom of segment I ook aan die buite-oppervlak blootgestel is. By die twee apolêre segmente is die een geleë tussen segmente I en II, terwyl die tweede een tussen segmente II en III voorkom. Die presiese plek waar segment IV geleë is sowel as die rangskikking van segmente IV en V, is nog nie vasgestel nie. Volgens Klip *et al.* (1980) is dit aanloklik om die ligging van segmente IV en V op die buite-oppervlak van die membraan te plaas.

Ca²⁺-bindingsplekke en kanaal: Die Ca²⁺-bindingsplekke op die Ca²⁺-afhanklike ATPase (Ikemoto, 1975) is regstreeks betrokke by die transport-meganisme (Ikemoto, 1976). Hierdie plekke word gedefinieer as Ca²⁺-transportplekke. Volgens Shamoo *et al.* (1976) lê die moontlike rol van die 45 000 dalton fragment daarin om 'n groot, nie-spesifieke kanaal oor die membraan te vorm. Die energie-oordrag stap mag tussen die 30 000 en 20 000 dalton fragmente voorkom. Ikemoto (1982) stel voor dat die plek waaraan Ca²⁺ bind en die kanaal waardeur Ca²⁺ oor die membraan vervoer word, beide in die A₂-subfragmente geleë is.

2. ATPase-reaksie gekoppel met die Ca²⁺-pomp

Daar bestaan verskeie voorgestelde skemas vir die meganisme waarvolgens die ATPase-reaksie met die Ca²⁺-pomp gekoppel word. Daar bestaan egter variasie oor wat tydens die verskillende stappe plaasvind. Met samevoeging van die data verkry deur die verskillende outeurs, stel Ikemoto (1982) die volgende meganisme voor waarvolgens die Ca²⁺-transportproses plaasvind. Die reaksiesiklus kan beskryf word in terme van die verwisse-

ling van drie klasse van konformasietoestande. Die een verteenwoordig die grondtoestand en oorheers in die afwesigheid van Ca^{2+} . Fosforilasië van die ensiem vind slegs plaas indien die ensiem vanaf die grondtoestand na die Ca - of Mg -toestand verander, waarna verwys word as die E_1 en E_2 toestande. Die E_1 kan EP vorm vanaf $n \text{ M.ATP}$, maar nie vanaf P_i nie. Die E_2 kan egter weer EP vanaf P_i vorm maar nie vanaf M.ATP nie (Chaloub *et al.*, 1979; De Meis & Vianna, 1979; Hasselbach, 1978). Gedurende die M.ATP -geïnduseerde reaksie, word die Ca^{2+} -toestand na die Mg^{2+} -toestand verander deur middel van verskeie EP-intermediëre. Die Mg^{2+} -toestand kan ook regstreeks veroorsaak word deur die toevoeging van hoër Mg^{2+} -konsentrasies in die afwesigheid van Ca^{2+} (Chaloub *et al.*, 1979). Die volgende skematiese voorstelling verteenwoordig die aangepaste skema van die ATPase-reaksie gekoppel met die Ca^{2+} -pomp soos voorgestel deur Ikemoto (1982).



*E: hoë affiniteitstoestand en E₁: lae affiniteitstoestand.
 Drie konformasietoestande word onderskei waar E die grondtoestand verteenwoordig, ¹E of E₁ die Ca-toestand verteenwoordig en ²E of E₂ die Mg-toestand verteenwoordig.

M: Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Mn²⁺

In die literatuur word vyf tipes EP-intermediêre onderskei. Die volgorde waarin die verskillende reaksie-intermediêre gevorm word, is soos volg:

Stap 1 : Twee hoë affiniteit Ca²⁺-bindingsplekke word vir elke Ca²⁺-ATPase polipeptiedketting waargeneem (Ikemoto, 1975). Hierdie outeur het gevind dat die hoeveelheid hoë affiniteit Ca²⁺-bindingsplekke met temperatuur varieer. By 22°C is daar twee α-plekke per 10⁵ daltons, terwyl by 0°C die een bindingsplek onveranderd bly (α-plek) terwyl die tweede bindingsplek se affiniteit vir Ca²⁺ afneem en dit dus 'n β-plek skyn te wees.

Stap 2 + 3: Die vorming van die EP is vinniger wanneer die ATPase reaksie begin word met 'n ensiem wat gepreïnkubeer is met Ca²⁺ as wanneer die reaksie begin word met 'n ensiem wat geen gebonde Ca²⁺ bevat nie. By die tempo-bepalende stap in die $E + Ca^{2+} + ATP \rightarrow EP.Ca^{2+} + ADP$, kan veranderinge in die ensiemkonformasie plaasvind (Rauch *et al.*, 1978).

Stap 4 - 7: Tydens toediening van M.ATP, word die terminale fosfaat van ATP kovalent verenig in die Ca²⁺-ATPase waardeur 'n suur-stabiele EP gevorm word (Ikemoto,

1982). Volgens Yamada & Ikemoto (1980), is die Mg.ATP die ware substraat vir die Ca^{2+} -ATPase-reaksie en kan die Mg^{2+} vervang word deur Ca^{2+} , Mn^{2+} of Co^{2+} . Volgens Ikemoto (1982) is daar verskeie belangrike hipoteses in verband met gebeure wat verband hou met die isomerisasiestappe waarby EP betrokke is. Daar word aangeneem dat translokasie van die eksterne gebonde Ca^{2+} na die binnekant van die membraan plaasvind in stap 4. Volgens Ikemoto (1975) verhoed hoër Ca^{2+} -konsentrasies die afbraak van EP-2 en dus wil dit lyk of vrystelling van die getranslokeerde Ca^{2+} na die intramolekulêre pakkie en later na die intravesikulêre oppervlak, in stap 5 plaasvind. Omdat EP-4 Mg^{2+} -sensitief is terwyl EP-3 Mg^{2+} -nie-sensitief is, word voorgestel dat konformasieveranderinge van die Ca^{2+} -toestand na die Mg^{2+} -toestand in stap 6, plaasvind.

Stap 8+9: In stap 8 en 9 vind vrystelling van Pi en Mg^{2+} van die ensiem af opeenvolgend plaas (De Meis & Vianna, 1979).

Terugwaartse reaksie

’n Groot aantal bewyse dat die reaksie-siklus heeltemal omkeerbaar is, word weergegee deur Hasselbach (1978). Die omkeerbaarheid van die proses van Ca^{2+} -transport is reeds vroeg aangetoon (Barlogie *et al.*, 1971; Makinose, 1971; Makinose & Hasselbach, 1971). Hierdie outeurs het getoon dat die Ca^{2+} -ATPase die sintese van ATP vanaf ADP en anorganiese fosfaat (Pi) kan kataliseer wanneer ’n konsentrasiegradiënt oor die

vesikelmembraan gevorm is. Hasselbach (1978) en de Meis & Vianna (1979) toon aan dat toediening van ADP en Pi aan ge= fragmenteerde SR wat aktief of passief gelaai is met Ca^{2+} , Ca^{2+} -vrystelling gekoppel met ATP-sintese veroorsaak. Dié waarneming dat ADP en Pi Ca^{2+} -vrystelling aktiveer is ook be= vestig deur Barlogie *et al.* (1971). Volgens Hasselbach (1978) moet die reaksiedium EGTA, fosfaat, ADP en Mg^{2+} bevat waar= deur die vlak van geïoniseerde Ca^{2+} verlaag word tot onder 0,1 μM sodat Ca^{2+} -vrystelling met die begeleidende verskynsel van ATP-sintese kan begin. Die pompgedieerde Ca^{2+} -vrystelling benodig hoë intravesikulêre Ca^{2+} -konsentrasies terwyl die eks= trasellulêre Ca^{2+} -konsentrasies laag moet wees. Die Ca^{2+} -vry= stelling is Mg^{2+} -afhanklik deurdat die Ca^{2+} -vrystelling nie geaktiveer word deur fosfaat en ADP in die teenwoordigheid van EDTA nie (Hasselbach, 1978) en die Ca^{2+} -vrystellingsmeganisme geïnhibeer word deur geïoniseerde Ca^{2+} en 'n Mg^{2+} -tekort (Barlo= gie *et al.*, 1971). Daar bestaan koppeling tussen Ca^{2+} -vrystel= ling en ATP-sintese (Hasselbach, 1978; Makinose, 1971; Maki= nose & Hasselbach, 1971) deurdat die vrystelling van 2 Ca^{2+} aan= leiding gee tot die vorming van een molekule ATP (Hasselbach, 1978; Martonosi, 1984).

Volgens Makinose & Hasselbach (1971) vind splyting van ATP plaas wanneer Ca^{2+} inwaarts beweeg terwyl ATP-sintese plaas= vind wanneer Ca^{2+} uitwaarts beweeg.

In die literatuur word twee terme gebruik om die opneem van Ca^{2+} te beskryf, naamlik Ca^{2+} -opname en Ca^{2+} -binding. Die Ca^{2+} -opname is 'n aktiewe proses waar Ca^{2+} opgeneem word in die teenwoordigheid van Ca^{2+} -presipiteermiddels soos oksalaat maar die reaksie vind stadig plaas. By Ca^{2+} -binding is geen Ca^{2+} -

presipiteermiddels teenwoordig nie, en die opname-proses vind vinniger plaas. In hierdie projek is die term Ca^{2+} -opname deurgaans gebruik. Wanneer die Ca^{2+} -presipiteermiddel, oksalaat, teenwoordig is, word na die opname-proses verwys as Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat, terwyl die term ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname gebruik word as die Ca^{2+} -presipiteermiddel afwesig is.

1.2.3.2 Ca^{2+} -vrystelling

Die Ca^{2+} -inhoud van die SR is 'n weerspieëling van die ewewig wat daar bestaan tussen die tempo waarteen Ca^{2+} van die sitoplasma in die SR-lumen in vervoer word, die binding van Ca^{2+} aan die elemente in die SR en die tempo waarteen vrystelling van Ca^{2+} uit die SR in die sitoplasma plaasvind (Martonosi, 1984). Ca^{2+} -vrystelling kan op verskillende maniere plaasvind: 1. behandeling met kaffeïene en verwante middels, 2. verhoging van die Ca^{2+} -konsentrasie, 3. verhoging in die Mg^{2+} -konsentrasie, 4. depolarisasie, 5. skielike daling in temperatuur en 6. afname in osmotiese druk (Ebashi, 1976). Ca^{2+} -vrystelling uit die SR in gestimuleerde spiere is 'n vinnige proses (Martonosi, 1984).

1. Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling

Die tempo waarteen Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling plaasvind, word beïnvloed deur die ekstravesikulêre $[\text{Ca}^{2+}]$, die Ca^{2+} -inhoud van die SR, kaffeïene en lokale verdoewingsmiddels (Martonosi, 1984). Reeds in 1970 toon Endo *et al.* aan dat toediening van kaffeïene, Ca^{2+} en cheleermiddel herhaaldelike spiersametrekkings by spiere waarvan die sarkolemma verwyder

is, tot gevolg het en kan die Ca^{2+} -vrystelling 'n regeneratiewe proses wees waar die Ca^{2+} self vrystelling van Ca^{2+} uit die retikulum veroorsaak. Katz *et al.*, (1977) toon aan dat die inofoor X537A vinnige Ca^{2+} -vrystelling veroorsaak ná Ca^{2+} -opname in die afwesigheid van die presipiteermiddel oksalaat. Nadat 'n kalsiumoksalaat-presipitaat in die vesikel gevorm het, veroorsaak hierdie inofoor min Ca^{2+} -vrystelling. In die teenwoordigheid van 'n lae Ca^{2+} -konsentrasie word Ca^{2+} -opname geïnhibeer, maar toediening van verdere Ca^{2+} in die afwesigheid van inofoor lei tot verhoogde Ca^{2+} -opname. Katz *et al.* (1977) het hier inofoor- en Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling aangetoon.

2. Lokale verdowingsmiddels

Prilokaïen in millimolaar hoeveelhede veroorsaak sametrekking van die skeletspier in sowel die gepolariseerde en gedepolariseerde toestande. Prilokaïene induseer Ca^{2+} -vrystelling uit die SR wat nie deur Mg^{2+} nie, maar wel deur sukrose geïnhibeer kan word. Met toenemende prilokaïenkonsentrasies is toenemende Ca^{2+} -vrystelling verkry. Prilokaïen kan nie die Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystellingsmeganisme van die SR verhoog nie (Saida & Suzuki, 1981). Toediening van halotaan aan gelaai, gefragmenteerde SR veroorsaak vinnige Ca^{2+} -vrystelling gevolg deur uitlekking van Ca^{2+} . Prokaïene en hoë Mg^{2+} -konsentrasies inhibeer die vinnige Ca^{2+} -vrystellingseienskappe van halotaan (Ogawa & Kurebayashi, 1982). Wanneer vesikels gelaai word met Ca^{2+} in die teenwoordigheid van ATP en trifluorperazien word by die gelaai vesikels gevoeg, word inhibisie van die katalitiese siklus tesame met vinnige vrystelling van die geakkumuleerde Ca^{2+} verkry (Ho *et al.*, 1983).

3. Depolarisasie-gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling

In 1984 het Ikomoto *et al* gevind dat, indien 0,15 M K-glukonaat in 'n swaar fraksie van konyn SR-vesikels vinnig vervang word met 0,15 M Chloïen Cl, 'n meerfasige vrystelling van Ca^{2+} plaasvind. In die aanvanklike stadige fase is min Ca^{2+} vrygestel gevolg deur 'n vinnige fase waar aansienlik meer Ca^{2+} vrygestel is. "Franse drukbehandeling" van die buis SR-kompleks lei tot dissosiasie van die T-buise waarna die kompleks herstel word tydens inkubasie met Kalium-Kakodilaat. Met T-buisdissosiasie is sowel die vinnige as die stadige Ca^{2+} -vrystelling geïnhibeer. Met herassosiasie is die vinnige Ca^{2+} -vrystelling volkome herstel, terwyl dit by stadige fase gedeeltelik herstel is. Die resultate toon aan dat die T-buis wat geassosieer is met die SR, 'n belangrike rol speel om die vinnige Ca^{2+} -vrystelling, wat deur ion-ervanging geïnduseer is, aan die gang te sit. Die stadiger Ca^{2+} -vrystelling wat geïnduseer is deur Ca^{2+} en verdowingsmiddels word veroorsaak deur die regstreekse invloed op die SR-membraan.

1.3. Verdowingsmiddels

Volgens Herbette *et al*. (1982) veroorsaak farmakologiese middels veranderinge in die funksionele eienskappe van die SR-membrane. Verdowingsmiddels kan in verskeie groepe verdeel word, naamlik 1. lokale verdowingsmiddels soos trifluorperazien, 2. algemene verdowingsmiddels soos diëtieleter en halotaan en 3. hipnotiseer- en kalmeermiddels waaronder barbiturate soos pentobarbital aangetref word. 'n Verdere gebruik van verdowingsmiddels is om die membraanfunksies te ondersoek (Diamond & Berman, 1980).

1.3.1 Lokale verdowningsmiddels

Lokale verdowningsmiddels is middels wat verdowning van 'n beperkte gebied veroorsaak. Volgens Herbette *et al.* (1982) het faktore soos pH van die inkubasiemedium, die funksionele toestand van die kalsiumpomp in die SR-membraan gedurende daardie tyd dat die verdowningsmiddel bygevoeg word sowel as die verdowningsmiddelkonsentrasie 'n invloed op die verdowningsmiddeluitwerking. Lokale verdowningsmiddels bestaan as swak basisse (Sharpless, 1971).

Daar is aangetoon dat 'n tetrakaïenkonsentrasie van 1 mM die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit met ongeveer 70% verlaag. By konyn geïnduseerde SR het tetrakaïene die Ca^{2+} -ATPase-aktiwiteit verlaag by 'n kalsiumkonsentrasie laer as 1 μM , terwyl dit die aktiwiteit verhoog het by hoër kalsiumkonsentrasies (Kurebayashi *et al.*, 1982). Prilokaïenkonsentrasies in die millimolaargebied het Ca^{2+} -vrystelling geïnduseer wat weer deur sukrose geïnhibeer is. Prilokaïene kan die Ca^{2+} -opname deur die SR inhibeer, terwyl dit Ca^{2+} -vrystelling kan verhoog met toenemende konsentrasies (Saida & Suzuki, 1981). Fuchs het in 1969 aangetoon dat die inhibering van sarkotubulêre Ca^{2+} -transport deur kaffeïene spesie- en temperatuurafhanklik is. So het hy gevind dat by 25°C die Ca^{2+} -opname deur konyn SR slegs effens geïnhibeer is deur kaffeïene. Met so 'n verhoging in temperatuur tot by 37°C, word 'n toename in kaffeïen-gevoeligheid verkry. Hierteenoor was die ligter fraksie by albei temperature nie gevoelig teenoor kaffeïene nie. Fuchs *et al.* (1968) het bevind dat 10^{-3} M quinidien 'n kleiner (90%) mate van inhibisie op skeletspier SR as op hartspier (100%) uitgeoefen het. Verder is ook bevind dat by albei preparate die Ca^{2+} -opname=

tempo, Ca^{2+} -transport en die Ca^{2+} -geaktiveerde ATPase-aktiwiteit geïnhibeer is.

Kwant & Seeman (1969) het aangetoon dat chloorpromazien by vrye konsentrasies van 0,1-1 mM die membraangebonde Ca^{2+} kompetierend verplaas het, wat dus inhou dat die chloorpromazien en Ca^{2+} met mekaar meeding vir binding aan die membraan-proteïenplekke. Daar is verder ook bevind dat een Ca^{2+} van die membraan verplaas is deur ongeveer 2 molekules chloorpromazien. Ho *et al.* het in 1983 bevind dat ATPase-inhibisie en kalsiumvrystelling albei deur identiese konsentrasies trifluorperazien veroorsaak word. Trifluorperazien tree ook op 'n bepaalde wyse tussenbeide by Ca^{2+} -transport by die SR en ook met die rol wat die SR speel in kontraktiele aktivering.

In 1969 het Johnson & Inesi gevind dat die metielxantiene die netto Ca^{2+} -akkumulاسie verlaag deurdat dit die deurlaatbaarheid van die membraan verhoog, asook die vloeï van Ca^{2+} uit gelaaië vesikels. By lae lokale verdowingsmiddelkonsentrasies (< 1 mM) is die membraandeurlaatbaarheid en Ca^{2+} -diffusie oor die membraan verlaag. Anders as met lae konsentrasies het hoë konsentrasies (> 1 mM) die Ca^{2+} -uitvloeï verhoog en Ca^{2+} -akkumulاسie verhoed. In teenstelling met metielxantiene, het 10^{-6} - 10^{-3} M veratridien geen uitwerking op Ca^{2+} -opname deur die SR gehad nie. Katz *et al.* (1975) het gevind dat lokale verdowingsmiddels die Ca^{2+} -transport deur die hartspier SR inhibeer. Dibukaïene inhibeer die Ca^{2+} -transport die maklikste, dan tetraïene gevolg deur lidokaïene en prokaïenamied. Vir laasgenoemde twee verdowingsmiddels word egter baie hoë konsentrasies benodig om Ca^{2+} -transport te onderdruk.

Daar is verskeie gepostuleerde meganismes vir die werking van verdowingsmiddels. So byvoorbeeld word die volgende hipotese ondersteun vir die uitwerking van quinidien op skeletspier SR. Deur inmenging van die quinidien met die intrasellulêre Ca^{2+} -sekwestrasie veroorsaak hierdie middel die vermoë tot sametrekking (Fuchs *et al.*, 1968). Die uitwerking van quinidien op hartspier SR is gegrond op die hipotese dat die kardiaale kontraksie 'n funksie van die hoeveelheid vrygestelde Ca^{2+} uit die SR is. Dus sal met inhibisie van Ca^{2+} -transport, minder Ca^{2+} beskikbaar wees vir binding (Fuchs *et al.*, 1968). Daar is verskeie voorgestelde meganismes vir die werking van lokale verdowingsmiddels, naamlik a. die tyd-afhanklike inhibisie van Ca^{2+} -vrystelling (Ca^{2+} -effluks) kan verklaar word aan die hand van 'n stadige binding van dié middel aan 'n inhiberingsplek of die stadige oorbeweeg oor die membraan om die inhiberingsplek te bereik of 'n kombinasie van albei (Volpe *et al.*, 1983); b. by hartspier SR tree die lokale verdowingsmiddel op deur die depolariseringsuitwerking van die stadige inwaartse stroom te verminder as gevolg van 'n uitwerking op die sarkomlemma. Hierdie uitwerking kan dui op 'n kompeterende inhibisie van Ca^{2+} -transport (Katz *et al.*, 1975); c. die uitwerking van trifluoorperazien hou verband met die beweging aan die middel in die SR-membraan met die gevolglike verandering aan die wyse waarop die ensieme binne die membraanstruktuur gerangskik is (Ho *et al.*, 1983). Solaro *et al.* (1972) het ook bewys dat sekere verdowingsmiddels die struktuur van biologiese membrane verander; d. kompeterende inhibisie waar die lokale verdowingsmiddel en die Ca^{2+} met mekaar meeding vir binding aan die membraanproteïen-bindingsplekke (Kwant & Seeman, 1969); e. die uitwerking van prilokaïne op die SR verteenwoordig 'n depolariseringsaksie (Saida & Suzuki, 1981). Hierdie moontlike mega-

nisme word ondersteun deur die feit dat, wanneer die verdo-
wingsmiddel kontinuu teenwoordig is, dit die depolarisasie-geïn-
duseerde Ca^{2+} -vrystelling uit die SR sterk onderdruk; f. die
uitwerking van lokale verdoeringsmiddels is om die oorgangsre-
aksie aan die gang te sit waardeur die membraanlipiede verander
word van die gel- na die vloeistofkristallyne toestand (Lee,
1976); g. Volpe *et al.* (1983) stel voor dat die bindingsplek-
ke vir die lokale verdoeringsmiddels geleë is aan die binnekant
van die SR-membraan en dat die middel ook regstreeks reageer
op die Ca^{2+} -kanaal.

1.3.2 Algemene verdoeringsmiddels

Volgens Herbette *et al.* (1982) beïnvloed die algemene verdo-
wingsmiddels die funksionele eienskappe van die SR. Hierdie
groep verdoeringsmiddels kan verder ingedeel word in drie groe-
pe, naamlik gasagtige verdoeringsmiddels soos etileen, vlugtige
verdoeringsmiddels soos halotaan en diëtieleter en laastens in-
traveneuse verdoeringsmiddels soos heksobarbital.

Halotaan by verdoeringsmiddelkonsentrasie reageer met die
weefsel en veroorsaak sodoende 'n verskeidenheid biochemiese
veranderinge (Diamond & Berman, 1980). Hulle het verder ge-
vind dat met preïnkubasie by 37°C , pH 6,8 in die teenwoordig-
heid van 'n halotaankonsentrasie kleiner as 5 mM, geen invloed
uitgeoefen is op Ca^{2+} -transport aktiwiteit nie. Zucker *et al.*
(1982) het gevind dat met preïnkubasie by 37°C die nie-spesi-
fieke binding van Ca^{2+} nie beïnvloed is nie. Hulle het ook be-
vind dat die uitwerking van halotaan konsentrasie- en
tydafhanklik is met studies op lewerendoplasmiese retikulum.
Deur Diamond & Berman (1980) is aangetoon dat tydens die inak-

tivering van Ca^{2+} -transport, die Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase verhoog is. Die kalsiumione en ATP het hier 'n beskermende uitwerking teen hierdie inaktivering gehad.

Halotaan veroorsaak 'n toename in die Ca^{2+} -ATPase-aktiwiteit in die teenwoordigheid van hoë kalsiumkonsentrasies by die intakte konyn gefragmenteerde SR. By 'n halotaankonsentrasie van 0,03% is die maksimum-aktiwiteit effens verhoog, by 0,2% is die aktiwiteit geïnhibeer en by 0,33% het halotaan 'n nie-spesifieke aksie gehad. Hulle het ook bevind dat halotaan die ATP-binding van gefragmenteerde SR verminder (Kurebayashi & Ogawa, 1982). Hierteenoor het Malinconico & McCarl (1982) gevind dat 'n halotaankonsentrasie van 1-3% die aktiwiteit baie geïnhibeer het by 'n lae kalsiumkonsentrasie en die inhibisie minder was by 'n hoë kalsiumkonsentrasie. Hier is van hartspier SR gebruik gemaak.

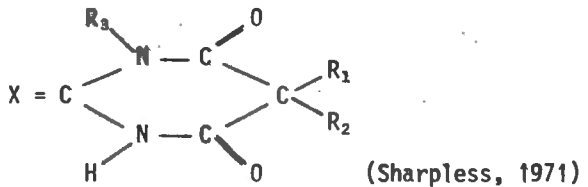
Die feit dat hartspier SR baie meer gevoelig is teenoor halotaan- en kalsiumkonsentrasies as die skeletspier SR-vesikels (Malinconico & McCarl, 1982) en dat opnames met hartspier SR by 37°C uitgevoer is, terwyl opnames met skeletspier SR by 15°C uitgevoer is, kan 'n moontlike verklaring inhou vir die teenstrydige resultate verkry deur Kurebayashi & Ogawa (1982) en Malinconico & McCarl (1982).

Die voorgestelde moontlike meganismes vir die werking van halotaan is die volgende: a. met toenemende halotaankonsentrasies bly die V_{maks} konstant terwyl die K_m toeneem. Hierdie resultate impliseer dat die onderdrukking van SR- Ca^{2+} -ATPase-aktiwiteit deur halotaan volgens 'n kompeterende inhibisie plaasvind (Malinconico & McCarl, 1982); b. halotaan reageer met die Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase-proteïen by die ATP-spesifieke bin-

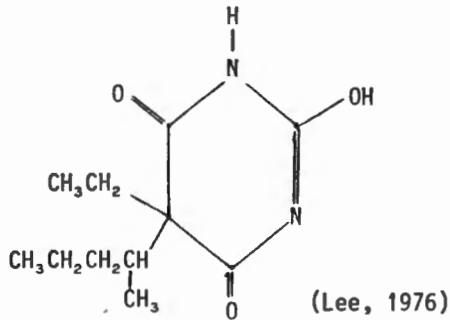
dingsplek of dit veroorsaak verbreking van die proteïen-lipied-interaksies in die membraan (Diamond & Berman, 1980);
 c. Algemene verdowingsmiddels soos halotaan vervloei membraane (Miller & Pang, 1976).

1.3.3 Barbiturate

Barbiturate is 'n groep verdowingsmiddels wat geklassifiseer word onder hipnotiserings- en kalmeermiddels. Die algemene chemiese struktuur vir barbituraat is soos volg:



Volgens Sharpless (1971) is barbiturate algemene inhibeerders wat die aktiwiteit van senuwee, skeletspier, gladdespier en hartspier onderdruk. Die barbiturate is verder ook in staat om net soos lokale verdowingsmiddels, hipnotiseermiddels, vlugtige- en gasagtige verdowingsmiddels, 'n wye verskeidenheid biologiese funksies omkeerbaar te verander. Die barbiturate bestaan as swak sure en in oplossings kom dit in sowel die nie-geïoniseerde as geïoniseerde toestand voor (Sharpless, 1971). Vir die struktuur van pentobarbital word R_1 vervang met 'n etielgroep, R_2 word met 'n 1-metielbutiel vervang, R_3 met 'n H, terwyl X vervang word met 'n O (Lee, 1976).



Klein veranderinge in die chemiese struktuur gee aanleiding tot belangrike verskille in die fisiese eienskappe en farmakologiese uitwerking (Mark *et al.*, 1974). Indien 'n swawelatoom in die chemiese struktuur teenwoordig sou wees en dit vervang word met 'n suurstofatoom in die tweede posisie van pentobarbital, verander 'n kalmerings-verdowingsmiddel in 'n intraveneuse verdowingsmiddel wat algemeen gebruik kan word. Vervanging van die metielbutiel deur 'n fenielring in die vyfde posisie, lei tot 'n afname in die sterkte van die middel, terwyl die tydsduur van aksie verleng word (Mart *et al.*, 1974).

tiewe verhoging in K^+ -deurlaatbaarheid veroorsaak, met 'n verhoging in membraanweerstand en hiperpolarisering van die membraan. Daar is gevind dat daar met die toediening van barbiturate soos tiopental, 'n afname was in kardiaal omset, 'n verhoging in die totale berekende perifere weerstand met 'n moontlike toename of geen verandering in die hartsnelheid nie. Barbiturate kan dus tagikardie tot gevolg hê. In hoë konsentrasies kan barbiturate 'n regstreekse uitwerking hê op die kardiaal en vasculêre spierstelsel. Pentobarbital in konsentrasies van 15-20 mg % kan 'n 50% afname veroorsaak in die sametrekings-

grootte van atriale en ventrikulêre spierstroke (Sharpless, 1971). Dat barbiturate wel kardiaale kontraktiliteit onderdruk, word ook ondersteun deur Lain *et al.* (1968).

Daar is verskeie voorgestelde meganismes van aksie vir barbiturate soos byvoorbeeld a. die verdowingsmiddel versteur die orde van die lipieddubbellag, maar hierdie meganisme is nie werklik geskik vir die barbiturate nie (Pang *et al.*, 1980); b. Pang *et al.* (1980) stel voor dat die verandering in die membraanvolume 'n meer geskikte model is vir die aksie van verdowingsmiddels as die lipied-orde; c. barbiturate ontkoppel Ca^{2+} -transport van ATPase-aktiwiteit (Lain *et al.*, 1968); d. barbiturate verlaag die fase-oorgangstemperatuur van dipalmitoïelfosfatidietanolamien en dipalmitoïelfosfatidielcholien (Lee, 1976). Hy stel voor dat die natriumkanal omring word deur 'n lipiedannulus in die geltoestand. Daar vind dus 'n verandering plaas van die annulêre lipiede van die gel- na die vloeistofkristallyne toestand. 'n Verslapping van die Na^{+} -kanaal tot 'n onaktiewe konfigurasie, waardeur die Na^{+} -stroom verminder of geblokkeer word en e. barbiturate soos pentobarbital vervloei membrane, maar die vervloeiing vind net plaas in membrane wat 4% fosfatidielsuur en 33% cholesterol bevat (Miller & Pang, 1976).

1.4 Doel en motivering

Dit is opvallend dat toediening van narkotiserende dosisse barbituraat tagikardie veroorsaak (Sharpless, 1971) wat dan ook waargeneem is tydens toediening van sagatal^R. Aangesien dit die narkosemiddel is wat gebruik word tydens die verwydering van die hart vir die isolering van sarkoplasmiese retikulum

(SR), was dit noodsaaklik om die uitwerking wat sagatal^R op SR uitoefen, te bestudeer. Aangesien die metodes en tegnieke by skeletspier SR beter gestandaardiseer is en daar reeds 'n studie verskyn het van die effek van natriumpentobarbitoon op hartspier SR (Lain *et al.*, 1968) is daar in dié studie op skeletspier SR gewerk. Die uitwerking van die barbituraat wat hier ondersoek is, is natriumpentobarbitoon wat in 'n reeks handelsmerke beskikbaar is, byvoorbeeld sagatal^R (May & Baker Beperk). Die handelsproduk sagatal^R, word verkry in 'n opgeloste toestand en kan bykomende bestanddele soos alkohol en anti-oksidante bevat wat moontlik 'n uitwerking op die SR-funksie kan veroorsaak. Op grond hiervan is die eksperimentele prosedures ook uitgevoer met die suiwer vorm van die natriumpentobarbitoon. Die natriumpentobarbitoon is in poeiervorm verkry. Deurdat die poeier eers opgelos moes word met dubbelgedistilleerde, gedestilleerde water, kon kontrole gehandhaaf word oor die oplosmiddel en dus oor die suiwerheid van die barbituraat. Vervolgens sal daar slegs na twee benaminge verwys word, naamlik sagatal^R wat na die handelsproduk verwys en wat moontlik alkoholiese oplosmiddels en anti-oksidante bevat, en tweedens natriumpentobarbitoon wat die suiwer barbituraat verteenwoordig en geen alkoholiese oplosmiddels of anti-oksidante bevat nie.

Die doel van hierdie projek is om vas te stel watter uitwerking natriumpentobarbitoon op die funksie van die skeletspier sarkoplasmiese retikulum het en om die meganisme te bepaal waarvolgens hierdie uitwerking plaasvind. Vervolgens is begin met die verskillende tegnieke wat in die volgende hoofstuk omskryf word.

HOOFSTUK 2

MATERIAAL EN METODE

2.1 Bereiding van SR-vesikels uit skeletspier

Vir die bereiding word witskeletspier gebruik wat verwyder word van die agterbene van konyne. Die metode van Eletr & Inesi (1972) is met enkele wysigings gevolg. Die konyne word met 'n harde hou agter die kop bewusteloos geslaan en vervolgens doodgemaak deur die karotis arteries deur te sny. Sodra die konyne doodgebloe het, word die spiere uitgehaal en gewas in yskoue 0,1 mM EDTA, pH 7,0. Alle oortollige bind- en vetweefsel word verwyder. Hierna word 170 g fyngesnyde skeletspier vyftien sekondes lank gehomogeniseer in 500 ml medium 1 (10 mM MOPS; 10% sukrose; 0,1 mM EDTA, pH 7,2) in 'n Waringhomogeniseerder elke vyf minute vir een uur lank.

Gedurende die homogenisering word die pH van die homogenaat konstant gehou tussen 6,5 en 7,0 deur die byvoeging van 20% KOH. Die homogenaat word 20 minute lank gesentrifugeer teen 15 000 g. Die supernatant word deur 'n 2 cm dik laag gaas gefiltreer vir die verwydering van laedighedslipiede. Die gefiltreerde supernatant word vervolgens teen 40 000 g 90 minute lank gesentrifugeer.

Die sediment wat hieruit verkry word, word hersuspendeer in 50 ml medium 2 (10 mM MOPS; 0,6 M KCl, pH 7,0) deur middel van 'n glashomogeniseerder en 40 minute lank by 2-4°C gekubeer. Inkubasie in 'n hoë konsentrasie KCl is noodsaaklik om die kontraktiele proteïene op te los. Die suspensie word nou 20 mi-

nute lank teen 15 000 g gesentrifugeer. Ná hierdie sentrifugering word die boonste laag, ongeveer 10% van die totale volume, weggegooi omdat laedighedslipiede hierin voorkom en nie gebruik word nie. Die onderste deel word ook weggegooi om te voorkom dat kontaminasie van die preparaat plaasvind met deeltjies van die sediment. Die oorblywende deel van die supernatant word 90 minute lank gesentrifugeer teen 40 000 g en die finale sediment word in 10 ml medium 3 (10 mM MOPS; 30% sukrose, pH 7,0) hersuspendeer.

Die hele prosedure word uitgevoer in 'n koelkamer by 2-4°C.

2.2 Proteïenbepaling

Die proteïenbepaling is volgens die Folinmetode (Lowry *et al.*, 1951) gedoen. Vir hierdie Lowry-proteïenbepaling word die volgende oplossings opgemaak:

- Oplossing 1: 190 mM NaCO₃
 100 mM NaOH
- Oplossing 2: 430 mM natriumtartraat
- Oplossing 3: 20 mM kopersulfaat.

Die drie oplossings word in die verhouding van 50:1:1 gemeng om oplossing 4 te kry. By 5 ml van oplossing 4 word 0,025 ml SR-monster of blanko gevoeg en drie minute lank geïnkubeer by 37°C. Hierna word 0,5 ml Phenolreagens bygevoeg en verder 20 minute geïnkubeer. Die optiese digtheid word by 640 mμ gelees en vergelyk met 'n serum albumien-standaard.

2.3 Bepaling van ATPase-aktiwiteit by skeletspier

2.3.1 ATPase-aktiwiteit in die teenwoordigheid van Triton X-100

Die volgende reaksiemengsel is gebruik: 0,1% Triton; 20 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM EGTA; 0,2 mM $CaCl_2$ en 0,2-0,3 mg SR/ml in 'n totale volume van 10 ml. Die reaksie is begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Deurdat sowel $MgCl_2$ as $CaCl_2$ teenwoordig is in die reaksiemengsel, word die Ca^{2+} - Mg^{2+} -afhanklike ATPase dus gemeet. Monsters word 90 sekondes lank elke 10 sekondes geneem en registreer by 'n gelyke volume yskoue 10% TCA op ys gevoeg om die reaksie te staak. Die monsters word 10 minute lank gelaat vir volledige presipitasie, waarna dit 15 minute lank gesentrifugeer word. Die hoeveelheid Pi (anorganiese fosfaat) gevorm in elke monster is bepaal deur die metode van Fiske & Subbarow (1925) as aanduiding van die ATPase-aktiwiteit. Die eksperiment is by 37°C uitgevoer.

Om die invloed wat natriumpentobarbitoon (2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pirimidientrione, 5-etiel-5-(1-metielbutiel)-, mononatriumsout), op die ATPase-aktiwiteit het, te bepaal, is 3,0 mM natriumpentobarbitoon bykomend by die reaksiemengsel gevoeg. Vir die invloed van sagatal^R is 3,0 mM sagatal^R by die reaksiemengsel gevoeg. Die standaardkromme vir die bepaling van Pi is effens gewysig deur die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon en daarom is die spesifieke waardes daarvolgens aangepas. Die eksperiment is vir beide sagatal^R en natriumpentobarbitoon herhaal met die volgende konsentrasies 1,9 mM, 3,1 mM, 9,4 mM en 15,6 mM. Om die uitwerking wat sukrose op die werking van

natriumpentobarbitoon het, by die ATPase-aktiwiteit te bepaal, is 300 mM sukrose by die reaksiemengsel gevoeg.

Ten bepaling van die rol wat temperatuur speel by die werking van sagatal^R, is 3,0 mM sagatal^R by die reaksiemengsel gevoeg, terwyl 3,0 mM natriumpentobarbitoon by die reaksiemengsel gevoeg is ten bepaling van die temperatuuruitwerking in die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon. Die eksperimentele prosedure vir sagatal^R en natriumpentobarbitoon is ook dieselfde soos beskryf in 2.3.1. Die opnames vir die kontrole, sagatal^R en natriumpentobarbitoon is elk onderskeidelik uitgevoer by 15°C; 20°C; 25°C; 30°C; 35°C; 40°C en 45°C.

2.4 ATP-afhanklike Ca²⁺-opname by skeletspier SR

Ca²⁺-opname is uitgevoer by 25°C in 'n medium bestaande uit: 120 mM KCl; 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM ⁴⁵Ca-CaCl₂; 0,1 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die opname is begin met 5 mM ATP. Ná 10, 20, 30, 40, 50 en 60 sekondes is monsters geneem en die opnameproses is beëindig deur millipore-filtrering. Die Ca²⁺ wat nie opgeneem is nie, is bepaal deur middel van vloeistofsintellasietelling.

2.4.1 Invloed van sagatal^R

By hierdie opname is dieselfde medium gebruik soos beskryf in 2.4, maar die konsentrasies sagatal^R bygevoeg is 0,1 mM; 1,9 mM; 3,0 mM; 9,4 mM en 15,6 mM. Die eksperimentele prosedure stem ooreen met dié beskryf in 2.4. Die opnames is uitgevoer by 25°C.

2.4.2 Invloed van natriumpentobarbitoon op EDTA-geïnduseerde Ca^{2+} -vrystelling

Die invloed wat natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname het na EDTA-geïnduseerde Ca^{2+} -vrystelling, is bepaal. Ca^{2+} -opname is hier gemeet in die afwesigheid van kalsiumpresipiteringsione. Die reaksiemengsel hier gebruik, bestaan uit: 60 mM KCl; 20 mM MOPS, pH 6,8; 0,1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$; 0,1 mM EGTA en 0,1-0,2 mg SR/ml. 120 Sekondes nadat die opnameproses begin is deur 5 mM ATP, is 40 mM EDTA, pH 7,0 by die reaksiemengsel gevoeg, waarna monsters op 5, 10, 30, 60 en 120 sekondes geneem is. Die opnameproses is beëindig deur millipore-filtrering. Die Ca^{2+} wat nie opgeneem is nie, is bepaal deur middel van vloeistofsintellasietelling. Die opnames is by 25°C gedoen. Die hele eksperiment is herhaal in die teenwoordigheid van 3,0 mM natriumpentobarbitoon.

2.5 Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat

Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat is onder verskillende eksperimentele toestande nagegaan. Die medium gebruik, bestaan uit: 1 mM EGTA; 10 mM K_2O_x ; 18 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die opnames is uitgevoer by 37°C en begin deur die byvoeging van 5 mM MgATP. Monsters is geneem op 10, 20, 30, 40, 50 en 60 sekondes en die opnameproses is beëindig deur millipore-filtrering. Die Ca^{2+} wat nie opgeneem is nie, is deur middel van vloeistofsintellasietelling bepaal.

Om die invloed van sagatal^R op die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit te bepaal, is sagatal^R in dieselfde konsentrasies soos beskryf

in 2.4.1 by die reaksiemengsel gevoeg, terwyl ten bepaling van die invloed van natriumpentobarbitoon die natriumpentobarbitoon ook in dieselfde konsentrasies by die reaksiemengsel gevoeg is. Die eksperimentele prosedure stem verder ook ooreen soos beskryf in 2.5.

Ten bepaling van die invloed wat verskillende konsentrasies su-krose op die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit het, is die reaksiemengsel hier gebruik, dieselfde soos beskryf in 2.5. Verskillen-de hoeveelhede sukrose is by die reaksiemengsels gevoeg vir die finale sukrosekonsentrasies van 100 mM; 200 mM; 300 mM en 400 mM vir daaropvolgende opnames. Die hele eksperiment is her=haal in die teenwoordigheid van 6,0 mM natriumpentobarbitoon. Die eksperimentele prosedure by albei eksperimente is dieselfde soos beskryf in 2.5

Vir die invloed wat sukrose op die werking van verskillende kon-sentrasies natriumpentobarbitoon het, stem die reaksiemengsel hier gebruik, ooreen met die reaksiemengsel soos beskryf in 2.5, maar hier is bykomend ook 300 mM sukrose by die reaksiemengsel gevoeg. Natriumpentobarbitoon in konsentrasies soos beskryf in 2.4.1, is hier by die reaksiemengsel vir die verskillende opna-mes gevoeg. Die eksperimentele prosedure is dieselfde soos be-skryf in 2.5.

Die invloed wat preïnkubasie met sagatal^R op Ca^{2+} -opname het, is bepaal. Die reaksiemengsel hier gebruik, bestaan uit: 5 mM EGTA; 25 mM K_2O_x ; 90 mM MOPS, pH 7,2; 600 mM KCl; 0,1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die reaksiemengsel is vyf mi-nute lank gepreïnkubeer waarna die opnameproses begin is met 5 mM MgATP. Monsters is geneem op 10, 30, 60 en 120 sekondes

en die opnameproses is beëindig deur middel van millipore-filtrering. Die Ca^{2+} wat nie opgeneem is nie, is bepaal deur middel van vloeistofsintellasetelling. Die hele eksperiment is herhaal vir preïnkubasie vir 10 en 20 minute onderskeidelik. Die opnames is gedoen by 25°C .

Die invloed wat temperatuur het op die werking van Sagatal^R by Ca^{2+} -opname-aktiwiteit, is bepaal. Die reaksiemengsel gebruik is dieselfde soos beskryf in 2.5, maar $3,0 \text{ mM}$ sagatal^R is bykomend by die reaksiemengsel gevoeg ten bepaling van die temperatuuruitwerking in die teenwoordigheid van sagatal^R. Die eksperimentele prosedure is ook dieselfde soos beskryf in 2.5. Die opnames in die afwesigheid sowel as die teenwoordigheid van sagatal^R is onderskeidelik by die volgende temperature uitgevoer: 20°C , 25°C , 30°C , 35°C en 40°C .

Die invloed van verskillende konsentrasies vrye Ca^{2+} op Ca^{2+} -opname is bepaal. Die reaksiemengsel gebruik, bestaan uit: 20 mM MOPS, pH 6,8; 1 mM EGTA; 10 mM K_2O_x ; 120 mM KCl en $0,1-0,2 \text{ mg}$ SR/ml. Die $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ -konsentrasie in die reaksiemengsel is gevarieer om finale $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ -konsentrasie van $0,2$; $0,3$; $0,4$; $0,5$ en $0,6 \text{ mM}$ te gee. Die vrye Ca^{2+} -konsentrasie het gevarieer tussen $0,25$ en $1,43 \mu\text{M}$ en is bereken met behulp van die waardes vir die dissosiasiekonstante en die rekenaarprogram deur Fabiato & Fabiato (1979). Die opnames is uitgevoer by 25°C . Vir die invloed wat vrye Ca^{2+} -konsentrasies in die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon het, is $3,0 \text{ mM}$ natriumpentobarbitoon telkens by elke reaksiemengsel gevoeg vir elke opname.

2.6 Chemikalieë

Radioaktiewe ^{45}Ca is verkry vanaf New England Nuclear en Aqua-gel-sintellasievloeistof is gebruik. Deurgaans is gebruik gemaak van analitiese graad chemikalieë en gedeïoniseerde, dubbelgedistilleerde water.

2.7 Statistiese verwerkings

Standaard-afwykings is bepaal met behulp van die volgende vergelyking:

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

Liniêre regressiepassings is gedoen met behulp van die volgende vergelykings:

$$Y = a_1 x + a_0$$

$$\text{met } a_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$\text{met } a_0 = \bar{y} - a_1 \bar{x}$$

Die korrelassiekoëffisiënt r^2 word bereken met die volgende formule

$$r^2 = \frac{\left[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n} \right]^2}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}$$

HOOFSTUK 3

RESULTATE

In die literatuur is verskeie verdoewingsmiddels gebruik vir die daarstelling van moontlike meganismes vir die interaksie van verdoewingsmiddels met die SR-membraan, waardeur spiersametrekking (Fuchs *et al.*, 1968) veroorsaak word, inhibisie van Ca^{2+} -vrystelling plaasvind (Volpe *et al.*, 1983), die struktuur van die membraan verander word (Solaro *et al.*, 1972), vervloeiing van die membraan (Lee, 1976; Miller & Pang, 1976) en kompeterende inhibisie (Kwant & Seeman, 1969) plaasvind.

In hierdie studie is die invloed van natriumpentobarbitoon op die volgende membraanfunksies nagegaan, naamlik Ca^{2+} -opname in die afwesigheid sowel as die teenwoordigheid van kalsiumpresipiteringsione en totale ATPase-aktiwiteit, vir die daarstelling van 'n meganisme waarvolgens natriumpentobarbitoon sy uitwerking het.

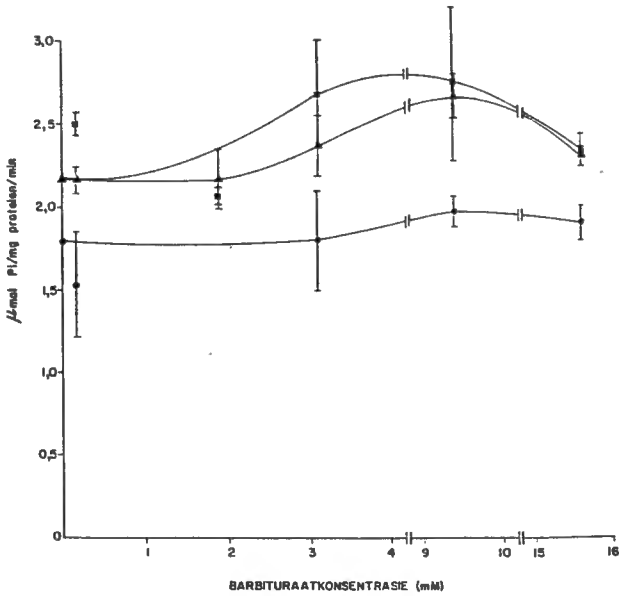
3.1 Totale ATPase-aktiwiteit

Die verskillende konsentrasies barbituraat wat by die reaksiemengsel gevoeg is, is 0,1 mM; 1,9 mM; 3,0 mM; 9,4 mM en 15,6 mM. Die konsentrasies was dieselfde vir sagatal^R en natriumpentobarbitoon. Tussen die konsentrasiegrens 0,1 mM en 1,9 mM het sagatal^R geen uitwerking op die totale ATPase-aktiwiteit nie, terwyl natriumpentobarbitoon reeds van 0,1 mM die aktiwiteit verhoog. Die effense verhoging in die ATPase-aktiwiteit deur natriumpentobarbitoon kan moontlik daarop dui dat natriumpentobarbitoon die membraan se deurlaatbaarheid verander. Sagatal^R en natriumpentobarbitoon in hoër konsentrasies veroorsaak stimu-

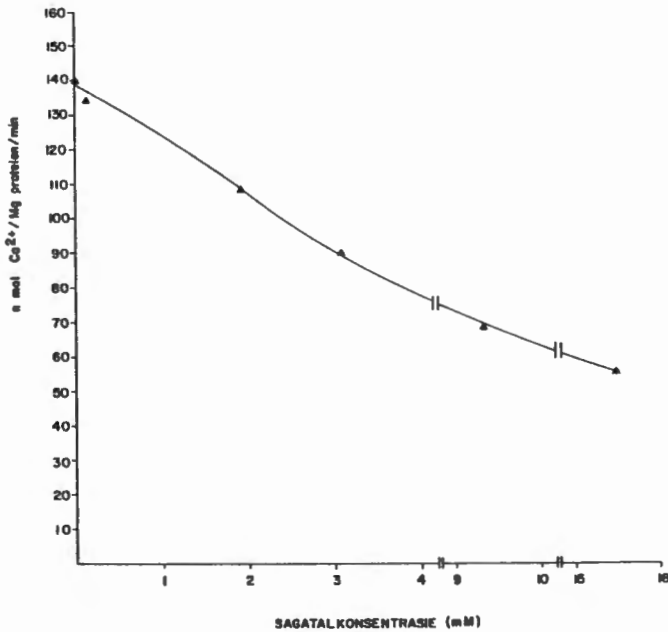
lasie van die totale ATPase-aktiwiteit (Figuur 1). Sagatal^R en natriumpentobarbitoon inhibeer nie die totale ATPase-aktiwiteit nie. Uit die figuur is dit ook duidelik dat met byvoeging van 300 mM sukrose by die reaksiemengsel, 'n kromme verkry word wat soortgelyk is aan die krommes verkry waar sukrose nie in die reaksiemengsel teenwoordig is nie. Die teenwoordigheid van sukrose in die reaksiemengsel beïnvloed dus glad nie die werking van die barbituraat nie. By die totale ATPase-aktiwiteit verleen sukrose geen beskerming teen die uitwerking van die barbituraat nie.

3.2 Invloed van Sagatal^R op die ATP-afhanklike Ca²⁺-opname

In Figuur 2 word die invloed wat verskillende konsentrasies sagatal^R op ATP-afhanklike Ca²⁺-opname het, verteenwoordig. Uit die figuur kan duidelik gesien word dat daar 'n regstreekse eweredige verband bestaan tussen die mate waarin inhibisie plaasvind en die grootte van die konsentrasie. Met ander woorde, by 'n lae konsentrasie sagatal^R (0,1 mM) vind min inhibisie (4,3%) van Ca²⁺-opname-aktiwiteit plaas, terwyl 3,0 mM die opname-aktiwiteit met 35,7% onderdruk het. 'n Hoë sagatal^R-konsentrasie (15,6 mM) inhibeer egter die opname-aktiwiteit met 60,7% (Tabel 1).



FIGUUR 1: Dosisresponskromme van die uitwerking van verskillende konsentrasies barbituraat op totale ATPase-aktiwiteit van die witskeletspier SR. Die volgende reaksiemengsel is gebruik: 0,1% Triton; 20 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,2 mM EGTA; 0,2 mM CaCl₂ en 0,2-0,3 mg SR/ml. Die reaksie is begin met 2,5 mM ATP. Die ATPase-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 3,0 mM sagatalR (▲); 3,0 mM Natriumpentobarbitoon (■) en 300 mM sukrose (●). Die eksperimente is uitgevoer by 37°C. Die kromme verteenwoordig die gemiddeld van vier afsonderlike eksperimente.



FIGUUR 2: Dosisresponskromme van die uitwerking wat verskillende konsentrasies sagatal^R op ATP-afhanklike Ca²⁺-opname-aktiwiteit het. Die reaksie-medium: 120 mM KCl; 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM ⁴⁵Ca-CaCl₂; 0,1 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂ en 0,1-0,2 mg SR proteïen/ml. Die opname-aktiwiteit is begin met 5 mM ATP by 25°C. Die kromme verteenwoordig die gemiddeld van drie afsonderlike eksperimente.

TABEL 1

n Vergelyking tussen die persentasie Ca^{2+} -opname en inhibisie wat sagatal^R by ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname veroorsaak

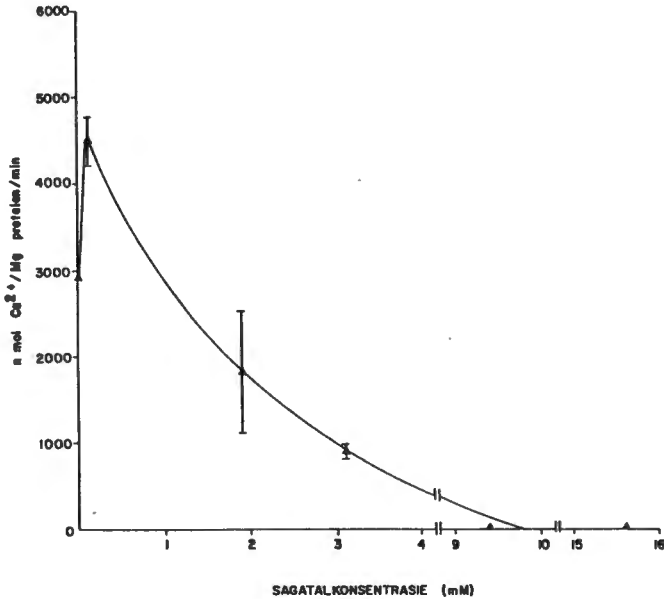
Sagatal ^R - konsentrasie (mM)	Ca^{2+} -opname-aktiwiteit	
	% Opname	% Inhibisie
0	100	-
0,1	95,7	4,3
1,9	77,1	22,9
3,0	64,3	35,7
9,4	48,6	51,4
15,6	39,3	60,7

3.3 Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat

3.3.1 Invloed van die barbituraat op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit

Figuur 3 verteenwoordig die dosisresponskromme van die uitwerking wat verskillende konsentrasies sagatal^R op die Ca^{2+} -opname deur skeletspier SR het, in die teenwoordigheid van kalsiumpre-sipiteringsione. In hierdie studie is kaliumoksalaat in die reaksiemengsel gebruik om geïoniseerde Ca^{2+} te cheleer. 'n Lae sagatal^R-konsentrasie van 0,1 mM veroorsaak 'n skerp toename in Ca^{2+} -opname-aktiwiteit gevolg deur 'n skerp afname tussen die konsentrasiegrens 0,1 mM en 15,6 mM.

Om die optimum sukrosekonsentrasie te bepaal vir beskerming teen die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon, is sukrose in verskillende konsentrasies by die reaksiemengsel gevoeg in finale konsentrasies van 100 mM, 200 mM, 300 mM en 400 mM onderskeidelik. Die opnames is uitgevoer in die afwesigheid sowel as die teenwoordigheid van 6,0 mM natriumpentobarbitoon. In die afwesigheid van natriumpentobarbitoon word 'n plato tussen die konsentrasiegrens 100 mM en 400 mM verkry, waar die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit ongeveer dieselfde bly. Sukrose het dus geen uitwerking op die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit nie. In die teenwoordigheid van 6,0 mM natriumpentobarbitoon word 'n toename in die Ca^{2+} -



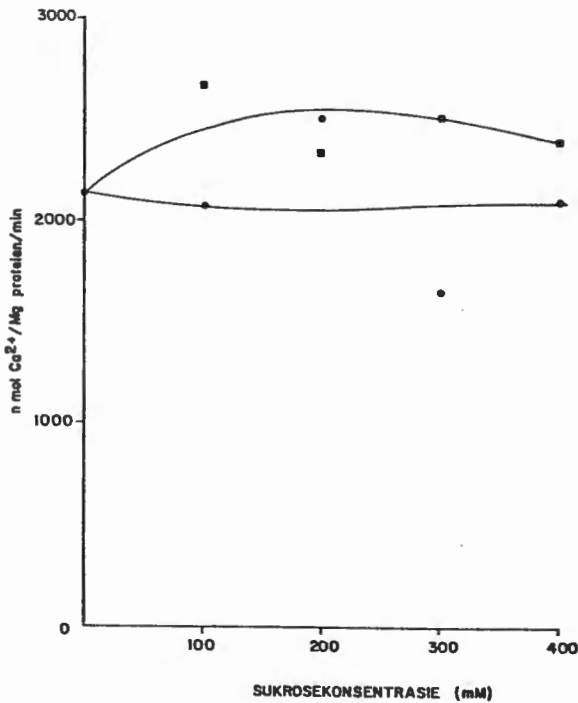
FIGUUR 3: Dosisresponskromme van die uitwerking van verskillende konsentrasies sagatal^R op Ca²⁺-opname-aktiwiteit in die teenwoordigheid van oksalaat. Die reaksie-medium: 1,0 mM EGTA; 10 mM KO_x; 18 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 1,0 mM ⁴⁵Ca-CaCl₂ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die reaksie is begin met 5 mM MgATP by 37°C. Die grafiek verteenwoordig die gemiddeld van drie afsonderlike eksperimente.

opname-aktiwiteit verkry, met 200 mM en 300 mM sukrose wat die grootste uitwerking het (Figuur 4).

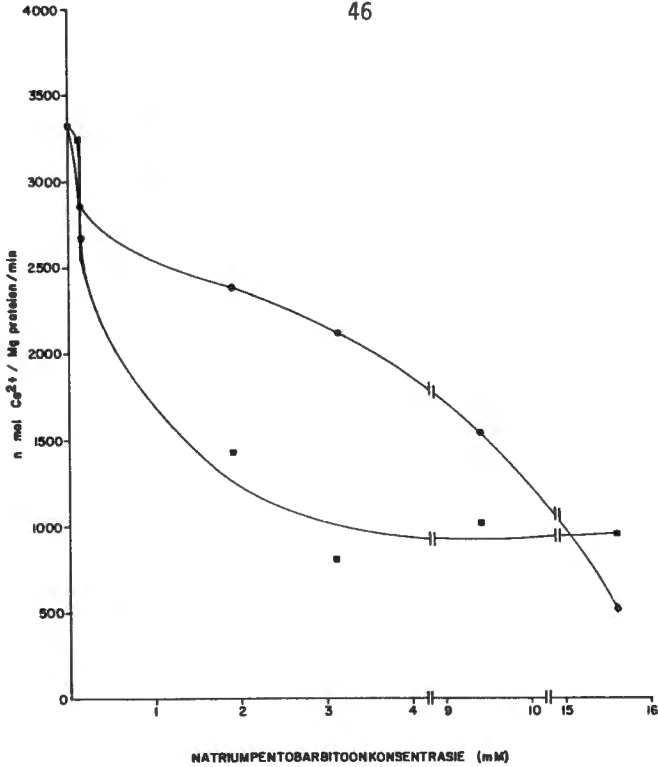
Die Dosisresponskromme van die uitwerking wat verskillende konsentrasies natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname het, in sowel die afwesigheid as die teenwoordigheid van 300 mM sukrose, word in Figuur 5 verteenwoordig. Wanneer sukrose afwesig is, veroorsaak die lae konsentrasie natriumpentobarbitoon (0,1 mM) reeds 'n afname in die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit. Hier is slegs 97% Ca^{2+} opgeneem. By 1,9 mM natriumpentobarbitoon is die Ca^{2+} -opname met ongeveer 62% geïnhibeer. Tussen die konsentrasiegrens 0,1 mM en 3,0 mM is daar 'n skerp afname in die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit. Tussen 3,0 mM en 15,6 mM word 'n plato bereik waar die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit konstant bly. By 15,6 mM is die Ca^{2+} -opname met 72% geïnhibeer. Wanneer 300 mM sukrose by die reaksiemengsel gevoeg word, verander die vorm van die kromme aansienlik. By 0,1 mM natriumpentobarbitoon is ongeveer 86% Ca^{2+} opgeneem. By 1,9 mM is Ca^{2+} -opname 72%, terwyl net 16% Ca^{2+} by 15,6 mM opgeneem is. Alhoewel daar vanaf 0,1 mM tot by 15,6 mM 'n afname in die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit is, is die mate waarin die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit geïnhibeer is, baie minder. Dit is duidelik dat sukrose wel beskerming bied teen die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit.

3.3.2 Invloed van preïnkubasie vir verskillende tydsdure

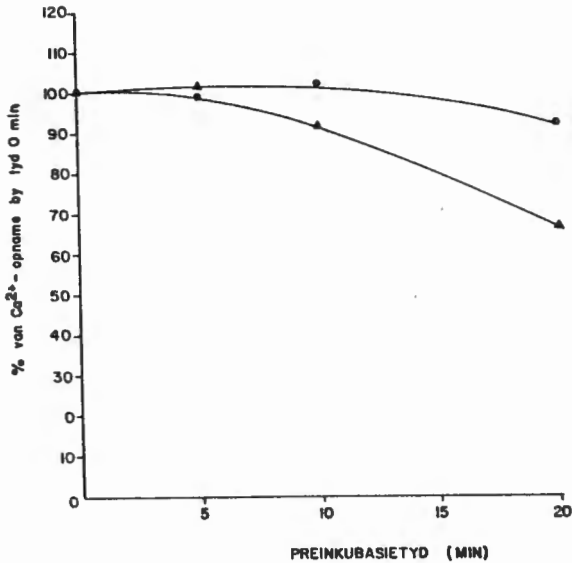
Om te bepaal of sagatal^R 'n invloed het op Ca^{2+} -opname ná preïnkubasie van die SR-vesikels, is die SR-vesikels onderskeidelik 5, 10 en 20 minute lank gepreïnkubeer in 'n reaksiemengsel, waar CaCl_2 teenwoordig is. Die preïnkubasie is by 25°C uitgevoer (Figuur 6). Hierdie krommes verteenwoordig die invloed



FIGUUR 4: Dosisresponskromme van die uitwerking wat verskillende konsentrasies sukrose het op die aksie van natriumpentobarbitoon by Ca^{2+} -opname-aktiwiteit. Die reaksie-medium: 1 mM EGTA; 10 mM K_2O_x ; 18 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Sukrose in 'n finale konsentrasie van 100 mM is by die reaksiemengsel gevoeg vir die eerste opname en 200 mM; 300 mM en 400 mM vir daaropvolgende opnames. Die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 0 mM (●) en 6,0 mM natriumpentobarbitoon (■). Die reaksie is begin met 5 mM MgATP by 37°C. Die grafiek verteenwoordig die gemiddeld van twee afsonderlike eksperimente.



FIGUUR 5: Dosisresponskromme van die uitwerking van verskillende konsentrasies natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit in die teenwoordigheid van oksalaat. Die reaksiedium: 1,0 mM EGTA; 10 mM K_2O_x ; 18 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 1,0 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die reaksie is begin met 5 mM MgATP by 37°C. Die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 3,0 mM natriumpentobarbitoon (■) en 300 mM sukrose (●). Die grafiek verteenwoordig die gemiddeld van drie afsonderlike eksperimente.



FIGUUR 6: Die uitwerking van preïnkubasie met Sagata1^R op Ca²⁺-opname-aktiwiteit in die teenwoordigheid van oksalaat. Die reaksie-medium: 1 mM EGTA; 10 mM KO_x; 18 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 1 mM ⁴⁵Ca-CaCl₂ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die reaksie is begin met 5 mM MgATP by 25°C. Die opname-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 0 mM (●) en 3,0 mM (▲) sagata1^R. Die grafiek verteenwoordig die gemiddeld van drie afsonderlike eksperimente.

wat preïnkubasietyd op die persentasie van normale Ca^{2+} -opname het. By 0 minute preïnkubasietyd word die persentasie van normale Ca^{2+} -opname bereken as 100%. Wanneer sagatal^R afwesig is, word 'n plato verkry by 5 en 10 minute preïnkubasietyd. Hierdie plato verteenwoordig ongeveer 100% normale Ca^{2+} -opname, wat aandui dat preïnkubasie by 25°C nie die SR-vesikels beïnvloed het nie. Ná preïnkubasie van 20 minute lank, daal die opname-aktiwiteit en is die persentasie van normale Ca^{2+} slegs 90%. In die teenwoordigheid van 3,0 mM sagatal^R word 'n soortgelyke kromme verkry maar hierdie kromme is afwaarts verskuif. Van 0 minute tot 5 minute word ook 'n plato verkry wat soortgelyk is aan die plato by die kromme waar sagatal^R afwesig is. Preïnkubasie vyf minute lank veroorsaak 'n afname in die persentasie van die normale Ca^{2+} -opname, maar die uitwerking is klein en is nie betekenisvol nie. Ná preïnkubasie 10 minute lank is die opname-aktiwiteit slegs ongeveer 90% van die normale, terwyl na preïnkubasie van 20 minute, die Ca^{2+} -opname slegs 65% van die normale Ca^{2+} -opname-aktiwiteit is. Die resultate dui aan dat met preïnkubasie van die SR-vesikels in die teenwoordigheid van sagatal^R in die reaksiemengsel, sagatal^R die membraan meer deurlaatbaar maak het of dat meer Ca^{2+} uit die bindingsplekke verplaas is.

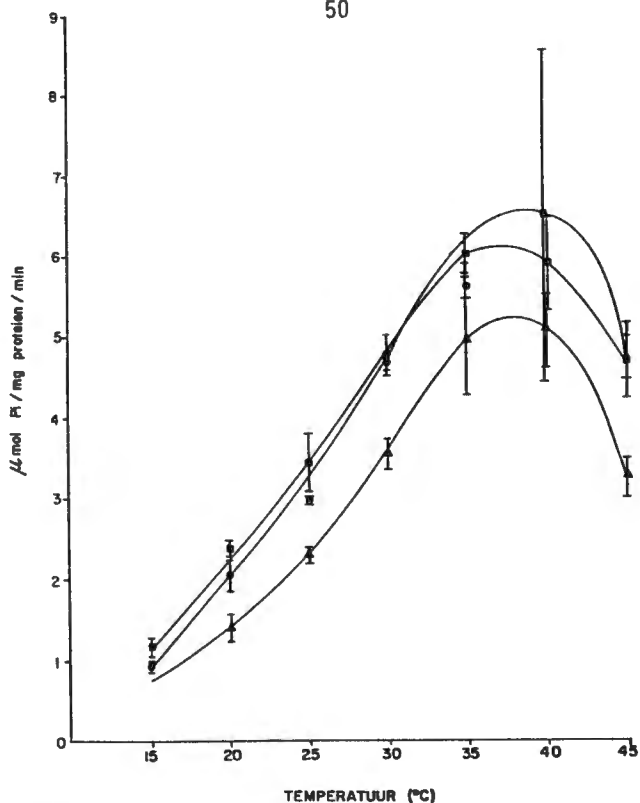
3.3.3 Die invloed van temperatuur op die uitwerking van die barbituraat

3.3.3.1 Die invloed van temperatuur op die uitwerking van natriumpentobarbitoon en sagatal^R op totale ATPase-aktiwiteit

Hierdie eksperiment is uitgevoer om vas te stel op watter wyse

die uitwerking wat barbituraat op totale ATPase-aktiwiteit het, beïnvloed sal word indien die Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase by verskillende temperature uitgevoer word (Figuur 7). Die reaksiemengsel is aangemaak en in die waterbad wat by 'n bepaalde temperatuur ingestel is, geplaas, waardeur die reaksiemengsel toegelaat word om die bepaalde temperature te bereik. Die Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase aktiwiteit is uitgevoer by die volgende temperature: 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C en 45°C. Triton is by die reaksiemengsel gevoeg omdat die akkumulering van Ca^{2+} binne die vesikels te voorkom. In die teenwoordigheid van 0 mM barbituraat het 'n toename in temperatuur by 40°C, 'n verhoging in ATPase-aktiwiteit veroorsaak. By 45°C het die aktiwiteit skerp gedaal en hierdie afname in aktiwiteit is te wyte aan die Triton X-100 wat die temperatuursensitiwiteit van die SR-vesikels verhoog het. By 37°C was die totale ATPase-aktiwiteit 6,50 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen}$.

Wanneer die barbituraat in die reaksiemengsel teenwoordig is, word soortgelyke krommes verkry vir 3,0 mM barbituraat as 0 mM. Daar kan egter onderskei word tussen die sagatal^R kromme en die natriumpentobarbitoonkromme deurdat die sagatal^R kromme afwaarts verskuif is, hoewel die twee krommes oor 'n soortgelyke vorm beskik as 0 mM. Uit albei die barbituraatkrommes is dit duidelik dat 'n toename in temperatuur 'n verhoging in die totale ATPase veroorsaak, waar die maksimum aktiwiteit vir natriumpentobarbitoon (6,13 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen}$) by 37°C was terwyl die maksimum aktiwiteit vir sagatal^R (5,18 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen}$) by 38°C was. Na 37°C en 38°C onderskeidelik, vind daar ook 'n skerp afname in aktiwiteit plaas wat hier weer eens te wyte is aan die Triton X-100 wat die SR-vesikels se temperatuursensitiwiteit verhoog het.

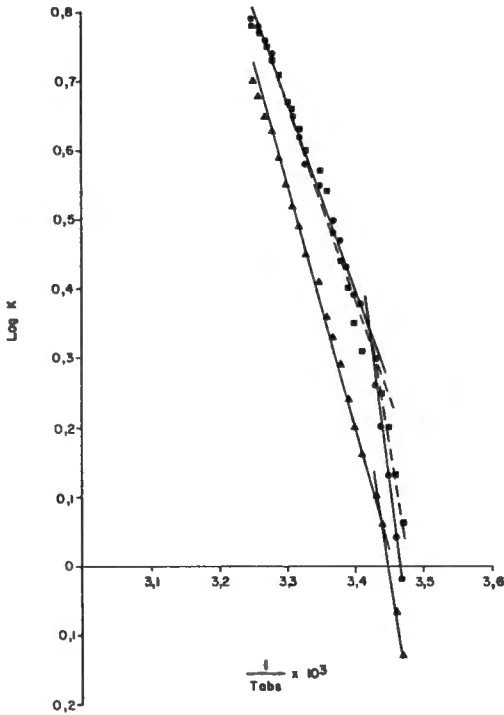


FIGUUR 7: Die uitwerking van verskillende temperature op totale ATPase-aktiwiteit van SR. Die reaksie-medium: 0,1% Triton; 20 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,2 mM EGTA; 0,2 mM CaCl₂ en 0,2-0,3 mg SR/ml. Die reaksie is begin met 2,5 mM ATP. ATPase-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 0 mM (●); 3,0 mM Natriumpentobarbitoon (■) en 3,0 mM sagatal^R (▲). Die kromme verteenwoordig die gemiddeld van drie afsonderlike eksperimente.

Uit die Arrheniusplotting (Figuur 8) kan duidelik gesien word dat die hellings vir 0 mM en 3,0 mM natriumpentobarbitoon soortgelyk is, en het natriumpentobarbitoon dus nie die helling van die kromme verander nie. Die aktiveringsenergie, E_A vir die ATPase-ensiem by 0 mM natriumpentobarbitoon is $51,36 \text{ kJ.mol}^{-1}$, terwyl die E_A vir 3,0 mM natriumpentobarbitoon $55,44 \text{ kJ.mol}^{-1}$ is (Tabel 2). Natriumpentobarbitoon het nie die aktiveringsenergie vir die ATPase-ensiem veel verander nie. Dit geld egter nie by 3,0 mM sagatal^R nie. Uit die Arrheniusplotting kan duidelik gesien word dat die sagatal^R wel die helling van dié kromme verander het, asook die aktiveringsenergie vir die ATPase-ensiem ($E_A = 66,12 \text{ kJ.mol}^{-1}$). By 0 mM en 3,0 mM natriumpentobarbitoon het die breekpunt by 20°C plaasgevind en by 3,0 mM sagatal^R by 19°C (Tabel 2).

3.3.3.2 Invloed van temperatuur op die uitwerking van sagatal^R by Ca^{2+} -opname

Hierdie eksperiment is uitgevoer om te bepaal hoe die teenwoordigheid van sagatal^R die aktiveringsenergie (E_A) sal beïnvloed indien die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit by verskillende temperature bepaal word (Figuur 9). Uit die Arrheniusplotting is dit duidelik dat sagatal^R by 0 mM en 3,0 mM die vorm van die twee krommes sowel as die hellings aansienlik van mekaar laat verskil. By 0 mM sagatal^R kom daar 'n breekpunt voor by 23°C, terwyl die breekpunt vir 3,0 mM sagatal^R by 25°C plaasgevind het (Tabel 3). By 0 mM is die aktiveringsenergie (E_A) ná die breekpunt $68,98 \text{ kJ.mol}^{-1}$, terwyl die E_A ná die breekpunt by 3,0 mM sagatal^R $124,55 \text{ kJ.mol}^{-1}$ is (Tabel 3). Daar vind dus inhibisie van die Ca^{2+} -opnameproses plaas in die teenwoordigheid van sagatal^R, waarna ongeveer twee keer die hoeveelheid energie nodig is om die opnamereaksie te laat plaasvind.



Figuur 8: 'n Arrheniusplotting van die uitwerking van verskillende temperature op ATPase-aktiwiteit van SR. Die eksperimentele toestande was dieselfde soos beskryf in Figuur 7. ATPase-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 0 mM (●); 3,0 mM natriumpentobarbitoon (■) en 3,0 mM sagatalR (▲). K verteenwoordig die tempo van ATP-hidrolise in mikromol $\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Die grafiek verteenwoordig die gemiddeld van vier afsonderlike eksperimente.

Tabel 2

’n Vergelyking tussen die verskillende termodinamiese parameters in die afwesigheid sowel as die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon en sagatal^R

Barbituraat	ATPase- aktiwiteit by 37°C	Breekpunt (0°C)	E_A (kJ.mol ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (kJ.mol ⁻¹ °K ⁻¹)
Kontrole	6,50	20	51,36	51,36	0,0935	0,165
Natriumpen- to-barbitoon	6,13	20	55,44	55,44	0,0936	0,179
Sagatal ^R	5,18	19	66,11	66,11	0,0941	0,213

E_A = Aktiveringsenergie in kJ.mol⁻¹ en word met behulp van die volgende formule bereken:
 $E_A = \text{helling} \times 19,161$,

ΔH = verandering in entalpi (hitte van aktivering) en word met behulp van die volgende formule bereken:

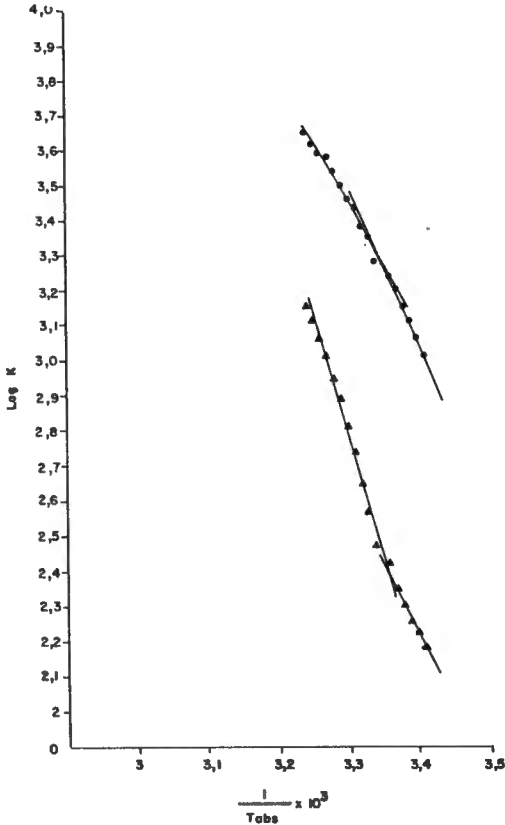
$$E_A = \Delta H + RT \text{ in kJ.mol}^{-1};$$

ΔG = verandering in die vrye energie en word met behulp van die volgende formule bereken:

$$K = \left(\frac{kT}{h}\right) \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)} \text{ in kJ.mol}^{-1} \cdot \text{°K}^{-1}, \text{ waar } K \text{ die snelheidskonstante, } k \text{ die Boltzman-} \\ \text{konstante en } h \text{ die Planckkonstante is,}$$

ΔS = verandering in entropie en word met behulp van die volgende formule bereken:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \text{ in kJ.mol}^{-1}.$$



FIGUUR 9: Arrheniusplotting van die uitwerking van verskillende temperature op die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit van SR. Die reaksie-medium: 1,0 mM EGTA; 10 mM KO_x ; 18 mM MOPS, pH 7,2; 120 mM KCl; 1,0 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die reaksie is begin met 5 mM MgATP. Die Ca^{2+} -opname is uitgevoer in die teenwoordigheid van 0 mM (●) en 3,0 mM (▲) sagatal^R. Die K verteenwoordig die tempo van Ca^{2+} -opname in $\text{nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tabel 3

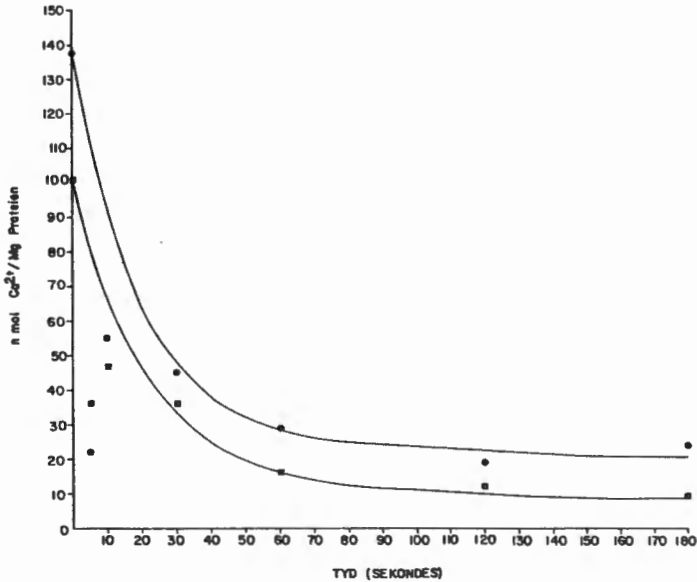
n Vergelyking tussen die verskillende termodinamiese parameters in die afwesigheid sowel as die teenwoordigheid van sagatal^R

Sagatal ^R - konsentrasie (mM)	Ca ²⁺ - opnames by 30°C	Breekpunt (°C)	E _A (kJ.mol ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (kJ.mol ⁻¹ .°K ⁻¹)
0	2940	23	68,98	68,98	0,0599	0,222
3,0	650	25	124,55	124,55	0,0638	0,402

Vir die betekenis van die termodinamiese parameters en die formules waarvolgens dit bereken word, sien Tabel 2.

3.4 Invloed van natriumpentobarbitoon op EDTA-geïnduseerde Ca^{2+} -vrystelling

In hierdie eksperiment is die vesikels twee minute lank gelaai met Ca^{2+} nadat die Ca^{2+} -opnameproses begin is deur 5 mM ATP, voordat 40 mM EDTA by die reaksiemengsel gevoeg is (Figuur 10). Die EDTA word hier bygevoeg om volledige vrystelling van Ca^{2+} te verseker. Die eksperiment is uitgevoer in die afwesigheid sowel as die teenwoordigheid van 3,0 mM natriumpentobarbitoon. In die afwesigheid van natriumpentobarbitoon stimuleer die EDTA die Ca^{2+} -vrystelling aanvanklik sterk tot op 60 sekondes waar 79% van die Ca^{2+} vrygestel is. Van 60 tot 180 sekondes neem die Ca^{2+} -vrystellingsaktiwiteit af en is 85% van die Ca^{2+} ná 180 sekondes vrygestel (Tabel 4). Die kromme vir 3,0 mM natriumpentobarbitoon is soortgelyk aan die kromme verkry indien natriumpentobarbitoon afwesig is, hoewel natriumpentobarbitoon die kromme afwaarts verskuif het. Net soos vir die kromme indien natriumpentobarbitoon afwesig is, word ook hier tot by 60 sekondes 'n skerp afname in Ca^{2+} -opname-aktiwiteit verkry, waar 84% van die Ca^{2+} vrygestel is. Ook word by hierdie kromme van 60 tot 180 sekondes 'n plato bereik met 90% van die Ca^{2+} wat op 180 sekondes vrygestel is (Tabel 4). Dit is dus duidelik dat 3,0 mM natriumpentobarbitoon in die teenwoordigheid van EDTA die Ca^{2+} -vrystellingsaktiwiteit slegs in 'n geringe mate gestimuleer het.



FIGUUR 10: Die uitwerking van natriumpentobarbitoon op ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname ná EDTA-geïnduseerde Ca^{2+} -vrystelling. Die reaksiedium: 60 mM KCl; 20 mM MOPS, pH 6,8; 0,1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$; 0,1 mM EGTA en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP by 25°C en ná $t = 120$ sekondes is 40 mM EDTA, pH 7,0 by die reaksiedium gevoeg. Die opname-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 0 mM (●) en 3,0 mM (■) natriumpentobarbitoon.

Tabel 4

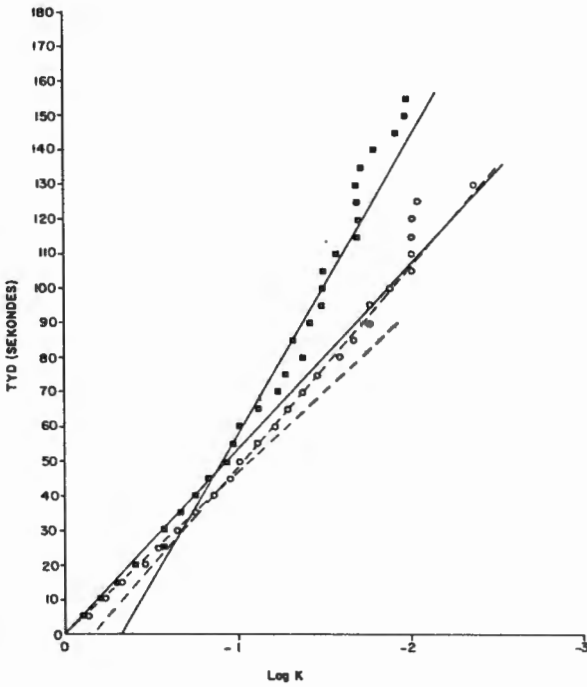
Invloed van natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -vrystelling, voor en 3 minute na EDTA-byvoeging

[Natriumpentobarbitoon] (mM)	EDTA-byvoeging	
	Voor ($\text{nmolCa}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Na ($\text{nmolCa}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$)
0	138	22
3,0	101	8

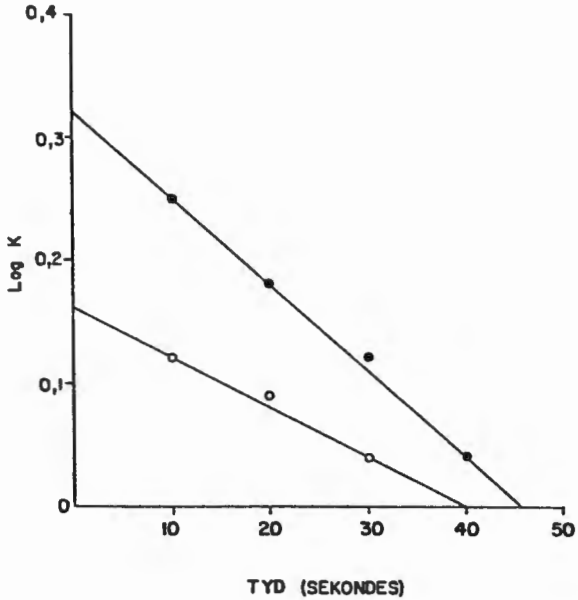
Figuur 11 verteenwoordig die Arrheniusplotting waar Ca^{2+} -vrystelling (effluks) geplot word as 'n funksie van tyd. Uit hierdie kromme is die vinnige vrystellingskomponent bereken vir sowel 0 mM as 3,0 mM natriumpentobarbitoon. Die berekende vinnige vrystellingskomponent word nou geplot as 'n funksie van tyd (Figuur 12). Die $t_{\frac{1}{2}}$ vir EDTA is 20 sekondes terwyl dit vir natriumpentobarbitoon 23 sekondes is. Die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon verander nie die $t_{\frac{1}{2}}$ betekenisvol nie. Die hoeveelheid Ca^{2+} vrygestel met die vinnige vrystellingskomponent vir 0 mM is $0,16 \text{ nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$, terwyl dit vir 3,0 mM $0,32 \text{ nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$ is.

3.5 Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasie op die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon

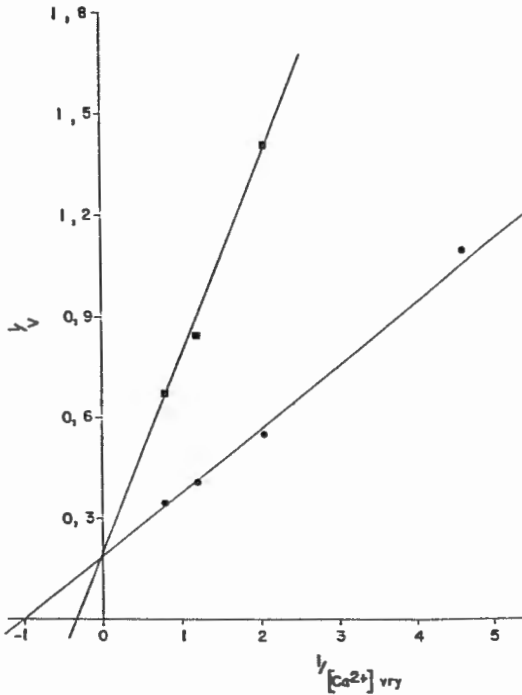
Die uitwerking wat verskillende konsentrasies vrye Ca^{2+} op die inhiberingsuitwerking van 3,0 mM natriumpentobarbitoon het, word verteenwoordig deur die Lineweaver-Burke-plotting in Figuur 13. By beide 0 mM en 3,0 mM natriumpentobarbitoon is die tempo van Ca^{2+} -opname stadig indien die konsentrasie vrye Ca^{2+}



FIGUUR 11: Arrheniusplotting van die uitwerking van natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit ná EDTA-byvoeging. Die eksperimentele toestande is dieselfde soos beskryf vir Figuur 10. Die opname-aktiwiteit is bepaal in die teenwoordigheid van 0 mM (○) en 3,0 mM (■) natriumpentobarbitoon. K verteenwoordig die tempo van Ca^{2+} -vrystelling in $\text{nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.



FIGUUR 12: Arrheniusplotting van die vinnige vry=stellingskomponent onmiddellik ná EDTA-byvoeging. K verteenwoordig die tempo van Ca^{2+} -vrystelling in $\text{nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Die $t_{1/2}$ vir 0 mM (●) is 20 sekondes en vir 3,0 mM (■) natriumpentobarbitoon 23 sekondes.



FIGUUR 13: Lineweaver-Burke-plotting van die uitwerking van verskillende konsentrasies vrye Ca^{2+} op Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat. Die vrye Ca^{2+} -konsentrasies is bereken met behulp van die waardes vir die dissoiasiekonstante en die rekenaarprogram deur Fabiato en Fabiato (1979). Die reaksie-medium: 20 mM MOPS, pH 6,8; 1 mM EGTA; 10 mM KO_x ; 120 mM KCl; 5 mM $^{45}Ca-CaCl_2$ en 0,1-0,2 mg SR/ml. Die Ca^{2+} -opname is uitgevoer in die teenwoordigheid van 0 mM (●) en 3,0 mM (■) natriumpentobarbitoon. Die v verteenwoordig die tempo van Ca^{2+} -opname in $\mu mol Ca^{2+} \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$, terwyl die vrye $[Ca^{2+}]$ in μM is. Die grafiek verteenwoordig die gemiddeld van twee afsonderlike eksperimente.

laag is. Met 'n verhoging in die konsentrasie vrye Ca^{2+} neem die tempo waarteen Ca^{2+} -opname plaasvind, ook toe. Die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon verskuif hierdie kromme na links. By 'n vrye $[\text{Ca}^{2+}]$ groter as $1,43 \mu\text{M}$ bereik beide 0 mM en $3,0 \text{ mM}$ natriumpentobarbitoon 'n V_{maks} van $5,556 \mu\text{mol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Albei bereik dus dieselfde maksimumsnelheid waarteen Ca^{2+} -opname plaasvind, en dus ding hulle met mekaar mee om binding aan die Ca^{2+} -bindingsplekke.

HOOFSTUK 4

BESPREKING

Om te verstaan op watter wyse die SR fisiologies funksioneer, is dit belangrik om die verband wat tussen die verskillende membraankomponente en hulle funksie bestaan, te verstaan. Indien 'n meganisme gepostuleer wil word oor die interaksie wat bestaan tussen die verdoingsmiddels en die SR, moet duidelikheid verkry word oor die moontlike interaksie tussen die verdoingsmiddels en membraankomponente. Vir die onderskeie membraanfunksies word energie benodig wat verkry word tydens die hidrolise van ATP. Die hoofaktiwiteit van die membrane is die proses van Ca^{2+} -opname verbind met ATP-hidrolise (Eletr & Inesi, 1972).

Farmakologiese middels veroorsaak veranderinge in die funksionele eienskappe van die SR-membrane (Herbette *et al.*, 1982). In die lig van die getal publikasies wat reeds verskyn het en met bestudering van die literatuur, kom duidelik aan die lig dat daar al heelwat navorsing gedoen is oor die veranderinge wat te weeggebring word in die struktuur en funksie van die SR-membraan, onder die inwerking van die verskillende groepe verdoingsmiddels. Die invloed van lokale verdoingsmiddels op eritrosiete (Kwant & Seeman, 1969), op hartspier SR (Fuchs *et al.*, 1968; Katz *et al.*, 1975) en op skeletspier SR (Fuchs, 1969; Fuchs *et al.*, 1968; Ho *et al.*, 1983; Johnson & Inesi, 1969; Katz *et al.*, 1977; Kurebayashi *et al.*, 1982; Saida & Suzuki, 1981; Solaro *et al.*, 1972; Volpe *et al.*, 1983) is ondersoek. Die uitwerking wat algemene verdoingsmiddels op die fosfolipied-membrane (Miller & Pang, 1976), die hartspier SR (Malinconico & McCarl, 1982), hepatiese endoplasmiese retikulum (Zucker *et al.* 1982) en op skeletspier SR het (Diamond & Berman, 1980;

Kurebayashi & Ogawa, 1982) is ook vasgestel sowel as die invloed wat barbiturate op die fosfolipied-membraan (Miller & Pang, 1976), die lipieddubbellaag (Pang *et al.*, 1980) en op die hartspier SR het (Lain *et al.*, 1968; Sharpless, 1971).

Dit is egter opvallend dat daar tot op hede betreklik min publikasies verskyn het waarin die barbiturate se meganisme van aksie bestudeer is en voorstellings oor moontlike meganismes gemaak word. In die literatuur is daar nie 'n ooreenkomstigheid oor die voorgestelde meganismes van aksie (Lain *et al.*, 1968; Lee, 1976; Pang *et al.*, 1980) vir die barbiturate nie. In hierdie projek is gepoog om te bepaal wat die meganisme van aksie van die barbituraat natriumpentobarbitoon (2,4,6 (1H, 3H, 5H)-Pirimidientrione, 5-eties-5-(1-metiesbutiel)-, mononatriumsout is.

4.1 Totale ATPase-aktiwiteit

Meissner (1975) toon aan dat met verwydering van die Ca^{2+} -bindingsproteïen en M_{55} -proteïene uit die swaar vesikels, daar leë membraanagtige strukture agterbly wat hoofsaaklik uit Ca^{2+} -pompproteïen en fosfolipiede bestaan. Hierdie Ca^{2+} -pompproteïen (ATPase ensiem of Ca^{2+} - Mg^{2+} -proteïen) is die vernaamste membraanproteïen wat die grootste deel van die SR-proteïen beslaan (MacLennan *et al.*, 1985; Meissner *et al.*, 1973). By die totale ATPase-aktiwiteit kom sowel Ca^{2+} as Mg^{2+} in die reaksiemengsel voor. Volgens Herbette *et al.* (1982) is die hoofproteïen die Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase wat 'n asielfosfaatkompleks vorm wat verantwoordelik is vir die aktiewe transport van Ca^{2+} .

Daar het baie onduidelikheid oor die Ca^{2+} -ATPase bestaan (Johnson & Inesi, 1969) wat teenwoordig nie meer ondervind word nie (Martonosi, 1984), en verskeie studies waarin die Ca^{2+} -ATPase bestudeer is, het reeds verskyn (Fuchs *et al.*, 1968; Kurebayashi & Ogawa, 1982; Kurebayashi *et al.*, 1982; Malinconico & McCarl, 1982; Utsunomiya *et al.*, 1982). Op grond hiervan en die feit dat die uitwerking wat natriumpentobarbitoon op hartsier SR het, ondersoek is, is besluit om die uitwerking van natriumpentobarbitoon op die totale ATPase-aktiwiteit (Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase) by skeletspier SR te ondersoek. Dus is by hierdie studie sowel Ca^{2+} as Mg^{2+} in die reaksiemengsel gevoeg vir die bepaling van die totale ATPase-aktiwiteit.

In die eerste eksperiment is die invloed wat natriumpentobarbitoon en sagatal^R op die totale ATPase-aktiwiteit het, bepaal sowel as die invloed wat sukrose het op die uitwerking van hierdie barbituraat. Die resultate in Figuur 1 toon duidelik aan dat die barbituraat tussen die konsentrasiegrens 0,1 mM en 1,9 mM, n baie klein uitwerking op die totale ATPase-aktiwiteit het, terwyl tussen die konsentrasiegrens 3,0 mM en 15,6mM n effense verhoging in die ATPase-aktiwiteit voorgekom het. Hierdie stimulasie was kleiner wanneer sagatal^R teenwoordig was as wanneer natriumpentobarbitoon teenwoordig was, waarskynlik as gevolg van die moontlike teenwoordigheid van alkohol en anti-oksidente wat in die sagatal^R-oplossing teenwoordig kan wees en wat n inhiberingsuitwerking op die ATPase-ensiem kan hê.

Diamond & Berman (1980) het aangetoon dat halotaankonsentrasies hoër as 5 mM stimulasie van die totale ATPase-aktiwiteit veroorsaak het. Pentobarbital in konsentrasies so hoog as $200\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

het geen uitwerking op Ca^{2+} -ATPase-aktiwiteit in hartspier SR gehad nie (Utsunomiya *et al.*, 1982). Lain *et al.* wat in 1968 op hartspier SR gewerk het, het gevind dat natriumpentobarbital tussen die konsentrasiegrens 0,2 mM en 3,0 mM die ATPase-aktiwiteit verhoog het. Hoewel die totale ATPase-aktiwiteit in hierdie studie op skeletspier SR-vesikels uitgevoer is, vergelyk die resultate wat hier verkry is baie gunstig met die resultate verkry deur Lain *et al.* (1968). In beide studies het natriumpentobarbitoon geen onderdrukking van ATPase-aktiwiteit veroorsaak nie.

Die volgende stap in die eksperiment was om te bepaal wat die invloed is wat sukrose op die ATPase-aktiwiteit het. Na byvoeging van 300 mM sukrose by die reaksiemengsel, is 'n soortgelyke kromme verkry as wanneer sukrose afwesig is. Die teenwoordigheid van sukrose by 0 mM natriumpentobarbitoon het die kromme afwaarts verskuif wat daarop dui dat sukrose die ATPase-ensiem inhibeer. Hierdie resultaat is soos te wagte kan wees aangesien sukrose oor 'n beskermingsfunksie beskik (Solaro *et al.*, 1972). In die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon het sukrose geen inhiberingsuitwerking op die ATPase-aktiwiteit gehad nie. By 9,4 mM natriumpentobarbitoon in die teenwoordigheid van sukrose, is daar selfs 'n effense stimulasie in die ATPase-aktiwiteit, wat aandui dat sukrose nie die aktiwiteit van die ATPase-ensiem inhibeer nie, maar selfs effens stimuleer.

4.2 Ca^{2+} -opname-aktiwiteit

Deurdat die teenwoordigheid van die barbituraat in laer konsentrasies (1,9 mM - 3,1 mM) die ATPase-aktiwiteit in 'n mindere mate en hoër konsentrasies (3,1 mM - 9,4 mM) die ATPase-aktiwiteit

teit in 'n meerdere mate stimuleer, was die volgende stap in die projek om te bepaal watter uitwerking indien enige, die barbituraat op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit gaan uitoefen in sowel die afwesigheid as die teenwoordigheid van kaliumoksalaat.

4.2.1 ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname

In die reaksiemengsel gebruik is geen kalsiumpresipiteringsione soos oksalaat teenwoordig nie. Reeds by 'n lae konsentrasie (0,1 mM), onderdruk sagatal^R die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit (4,3% onderdrukking), wat toenemend vergroot met toenemende konsentrasies. Die hoogste sagatal^R-konsentrasie (15,6 mM) het die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit met 60,7% geïnhibeer. Hier kom dus 'n direkte eweredige verband voor tussen die grootte van die sagatal^R-konsentrasie en die mate waarin Ca^{2+} -opname geïnhibeer word (Tabel 1). Hoe laer die sagatal^R-konsentrasie, hoe minder is die mate waarin Ca^{2+} -opname onderdruk word en dus word meer Ca^{2+} opgeneem (Figuur 2). Die resultate hier verkry met skeletspier SR vergelyk gunstig met die resultate verkry deur Lain *et al.* (1968) wat op hartspier SR gewerk het. Lain *et al.* (1968) het aange-ton dat natriumpentobarbitoon tussen die konsentrasiegrens 0,3 mM en 3,0 mM die Ca^{2+} -opname onderdruk het en dat dié opname-aktiwiteit die kleinste was by 0,3 mM en die grootste was by 3,0 mM natriumpentobarbitoon. Die resultate dui daarop dat sagatal^R moontlik sy uitwerking uitoefen wanneer die ATPase-ensiem aan die Ca^{2+} -molekules bind. Dit wil voorkom of sagatal^R die verbinding van Ca^{2+} aan die ATPase-ensiem onderdruk, wat dan ook 'n moontlike verklaring bied vir die afname in Ca^{2+} -opname-aktiwiteit wanneer sagatal^R teenwoordig is. Die resultate kan egter ook dui op 'n afname in kapasiteit wat moontlik teweeggebring kan word deur 'n verhoging in membraandeurlaatbaarheid.

4.2.2 Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat

In die volgende eksperiment is gepoog om die invloed te bepaal wat barbituraat op die Ca^{2+} -vrystelling het indien die kaliumpresipiteringsione teenwoordig is. In hierdie studie is kaliumoksalaat as presipiteringsione gebruik. In die teenwoordigheid van die presipiteringsione is die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit baie hoër as wanneer die presipiteringsione afwesig is, wat veroorsaak word deur die kaliumoksalaat wat in kristalvorm in die vesikels neerslaan. Die hoeveelheid Ca^{2+} in die vesikels is dus baie groter. Uit die dosisresponskromme van sagatal^R (Figuur 3) veroorsaak 0,1 mM sagatal^R 'n aanvanklike skerp toename in die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit wat daarop dui dat die lae sagatal^R-konsentrasie die beweging van Ca^{2+} in die SR-vesikels in gestimuleer het, moontlik as gevolg van 'n toename in die tempo van Ca^{2+} -opname. Tussen die konsentrasiegrens 0,1 mM en 15,6 mM sagatal^R is die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit toenemend onderdruk met toenemende konsentrasies. By 9,4 mM en 15,6 mM is geen Ca^{2+} -opname gemeet nie.

Deurdat natriumpentobarbitoon in teenstelling met sagatal^R, geen moontlike alkoholiese oplosmiddels en anti-oksidente bevat nie, bestaan die moontlikheid dus dat die natriumpentobarbitoon nie soortgelyke uitwerking as sagatal^R op Ca^{2+} -opname sal hê nie. Op grond hiervan is die dosisresponskromme ook herhaal vir natriumpentobarbitoon. Uit die dosisresponskromme van die invloed wat natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit het in die teenwoordigheid van kalsiumpresipiteringsione (Figuur 5), tree dit duidelik na vore dat 0,1 mM natriumpentobarbitoon in teenstelling met sagatal^R, reeds 'n afname in Ca^{2+} -opname-aktiwiteit veroorsaak. Van 0,1 mM tot 3,0 mM natriumpen-

tobarbitoon vind n skerp afname in Ca^{2+} -opname-aktiwiteit plaas, gevolg deur n plato wat bereik word tussen 3,0 mM en 15,6 mM natriumpentobarbitoon. Die plato verteenwoordig die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit wat konstant bly moontlik as gevolg van die membraandeurlaatbaarheid wat onveranderd bly.

Die resultate in dié studie verkry van die uitwerking wat natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van oksalaat by skeletspier SR het, vergelyk gunstig met die resultate verkry deur Lain *et al.* (1968) waar op hartspier SR gewerk is. In beide dié studies het natriumpentobarbitoon nie die tempo van Ca^{2+} -opname verhoog nie.

Deurdar n skerp afname in Ca^{2+} -opname plaasvind tussen die konsentrasiegrens 0,1 mM en 3,0 mM, vir sowel sagatal^R as natriumpentobarbitoon, is 3,0 mM as n geskikte konsentrasie gekies vir verdere studie om die meganisme van die barbituraat vas te stel.

4.2.2.1 Invloed van sukrose op die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon

Solaro *et al.* (1972) het toevallig waargeneem dat sukrose in staat was om die inhiberingsuitwerking wat die algemene verdowingsmiddel propranolol op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit het, teen te werk. In dié studie is aangetoon dat sagatal^R (natriumpentobarbitoon) Ca^{2+} -opname in sowel die afwesigheid as die teenwoordigheid van kalsiumpresipiteringsione onderdruk. Verder is ook aangetoon dat sukrose, op die uitwerking wat natriumpentobarbitoon op die totale ATPase-aktiwiteit het, geen onderdrukking uitoefen nie maar dat daar selfs n effense stimulasie in ATPase-aktiwiteit plaasgevind het. Op grond hiervan is die

invloed wat sukrose het op die inhiberingsuitwerking van sagatal^R (natriumpentobarbitoon) op Ca^{2+} -opname bepaal.

In Figuur 4 is die invloed van verskillende sukrosekonsentrasies ondersoek om sodoende die konsentrasie sukrose te bepaal wat die grootste uitwerking op die werking van natriumpentobarbitoon sal hê. Wanneer slegs sukrose in die reaksiedium teenwoordig is, oefen sukrose geen invloed op Ca^{2+} -opname-aktiwiteit uit nie en word 'n plato verkry tussen die konsentrasiegrens 100 mM tot 400 mM sukrose, waar die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit ongeveer dieselfde bly. Die hoeveelheid Ca^{2+} wat in die SR-vesikels inbeweeg, in sowel die afwesigheid as die teenwoordigheid van sukrose, is ongeveer dieselfde. Wanneer 6,0 mM natriumpentobarbitoon egter in die reaksiemengsel teenwoordig is, word 'n toename in Ca^{2+} -opname-aktiwiteit verkry. Dié toename kom tussen die konsentrasiegrens 100 mM tot 400 mM sukrose voor, met 200 mM en 300 mM sukrose wat die grootste uitwerking het.

Vir die invloed wat sukrose het op die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname, is 300 mM sukrose bykomend by die reaksiemengsel gevoeg (Figuur 5). Die figuur toon duidelik aan dat die teenwoordigheid van 300 mM sukrose die vorm van die kromme verander sowel as opwaarts verskuif het. Sukrose stimuleer dus Ca^{2+} -opname sodat die hoeveelheid Ca^{2+} wat in die SR-vesikels inbeweeg, toeneem. Hier vind dus 'n toename in kapasiteit plaas. Dié resultate dui aan dat sukrose die inhiberingsuitwerking van natriumpentobarbitoon teen-gewerk het en dus beskerming gebied het teen die uitwerking van die barbituraat. Hierdie resultate vergelyk ook gunstig met die resultate van Solaro *et al.* (1972) wat aangetoon het dat 300 mM sukrose die inhiberingsuitwerking wat chloroform, quinidien en propranolol op ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname by hartspier SR

uitoefen, teengewerk het.

4.2.2.2 Invloed van preïnkubasie vir verskillende tydsdure

Deurdat daar gevind is dat 'n faseverandering in die membraankomponente reeds by 'n temperatuur van 20°C plaasvind (Reinert & Steim, 1970), is die invloed bepaal wat preïnkubasie van die SR-vesikels vir verskillende tydsdure op Ca^{2+} -opname het (Figuur 6). By preïnkubasie 0 minute lank word die Ca^{2+} -opname geneem as 100%. In die afwesigheid van 3,0 mM sagatal^R word Ca^{2+} -opname vir die SR-vesikels nie beïnvloed na preïnkubasie onderskeidelik 5 en 10 minute lank by 25°C nie. Indien die Ca^{2+} wat hier opgeneem is bereken word as 'n persentasie van die normale Ca^{2+} -opname (Ca^{2+} -opname 0 minute lank), word die Ca^{2+} -opname nie beïnvloed nie.

Word die SR-vesikels egter 20 minute lank gepreïnkubeer, neem die hoeveelheid Ca^{2+} opgeneem af sodat dit slegs 92% van die normale Ca^{2+} -opname verteenwoordig. Dié afname kan verklaar word aan die hand van die SR-vesikelmembraan wat moontlik verklaar kan word deur die lang tydperk van preïnkubasie by 25°C waardeur 'n verandering in die deurlaatbaarheid van die membraan vir Ca^{2+} veroorsaak word. In die teenwoordigheid van 3,0 mM sagatal^R word reeds na preïnkubasie van 5 minute lank, 'n afname in die Ca^{2+} -opname waargeneem, met preïnkubasie van 20 minute wat die grootste invloed het. Volgens die studie gedoen deur Miller & Pang (1976) wat aangetoon het dat pentobarbitoon membrane met 'n hoë cholesterolinhoud vervloei en Pang *et al.* (1980) wat aangetoon het dat pentobarbital die orde van die lipieddubbellag kan versteur, is dit dus moontlik dat sagatal^R die fosfolipiede in die membrane kan vervloei waardeur die membrane vervolgens meer deurlaatbaar is vir Ca^{2+} . Volgens die resultate in hierdie studie

verkry, kan sagatal^R die SR-funksies op die volgende moontlike maniere beïnvloed: 1. Sagatal^R kan die membraan se deurlaatbaarheid verhoog en 2. sagatal^R kan moontlik die Ca²⁺ uit die Ca²⁺-bindingsplekke verplaas.

4.2.2.3 Invloed van temperatuur op die werking van die barbituraat

4.2.2.3.1 Invloed van temperatuur op die werking van natriumpentobarbitoon en sagatal^R op totale ATPase-aktiwiteit

Vervolgens is die invloed wat natriumpentobarbitoon en sagatal^R op die totale ATPase-aktiwiteit onder verskillende temperatuur, bestudeer (Figuur 7). In die teenwoordigheid van 0 mM barbituraat het 'n toenemende verhoging in temperatuur tot by 40°C die ATPase-aktiwiteit skerp laat toeneem, waarna die ATPase-aktiwiteit afgeneem het. Tydens blootstelling van die SR-vesikels aan die hoë temperatuur kan denaturasie van die ATPase-ensiem wat 'n proteïen is (Herbette *et al.*, 1982) plaasvind met 'n gevolglike afname in ATP-hidrolise en dus 'n afname in die hoeveelheid Pi wat vrygestel word. Die teenwoordigheid van Triton X-100 in die reaksiemengsel speel ook hier 'n moontlike rol deurdat die Triton X-100 die SR-vesikels se gevoeligheid vir temperatuur verhoog aangesien die triton ongeveer 80% van die proteïene en byna al die fosfolipiede van die SR-membrane vloeit (McFarland & Inesi, 1971).

Indien die barbituraat in die reaksiemengsel teenwoordig is, word soortgelyke krommes verkry, hoewel sagatal^R se kromme afwaarts verskuif is en die ATPase-aktiwiteit by elke temperatuur

laer is as die ATPase-aktiwiteit wat verkry word wanneer die barbituraat afwesig is of wanneer die barbituraat in die suiwer vorm (natriumpentobarbitoon) teenwoordig is. Dit kan moontlik toegeskryf word aan die teenwoordigheid van moontlike alkoholiese oplosmiddels of anti-oksidente in die sagatal^R-oplossing wat die aktiwiteit van die ATPase-ensiem inhibeer. By 37°C het 0 mM barbituraat die hoogste ATPase-aktiwiteit vertoon (6,50 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen}$), gevolg deur 3,0 mM natriumpentobarbitoon (6,13 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen}$) en laastens 3,0 mM sagatal^R (5,18 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen}$). By die laer temperature (< 40°C) word daar met 'n verhoging in temperatuur telkens 'n verhoging in die hoeveelheid Pi verkry wat afgesplyt word.

Indien daar na die Arrheniusplotting gekyk word in Figuur 8, wat die invloed van verskillende temperature op totale ATPase-aktiwiteit verteenwoordig, kan duidelik gesien word dat 3,0 mM natriumpentobarbitoon nie die vorm of die helling van die kromme verander het nie, terwyl 3,0 mM sagatal^R wel beide verander het wat ook hier toegeskryf kan word aan die teenwoordigheid van moontlike alkoholiese oplosmiddels en anti-oksidente.

Die breekpunt vir die krommes het in die geval van 0 mM barbituraat en 3,0 mM natriumpentobarbitoon by 20°C en vir 3,0 mM sagatal^R by 19°C plaasgevind (Tabel 2). Die barbituraat verander nie die breekpunt-temperatuur nie. Na dié breekpunt benodig 0 mM barbituraat 'n aktiveringsenergie (E_A) van 51,36 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 3,0 mM natriumpentobarbitoon 'n E_A van 55,44 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, terwyl 3,0 mM sagatal^R 'n E_A van 66,11 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ benodig. Hoewel die hoeveelheid aktiveringsenergie benodig deur die ATPase-ensiem vir verdere hidrolise van ATP, effens hoër is wanneer die barbituraat in die suiwer vorm (natriumpentobarbitoon) en

in die vorm van 'n sagatal^R-oplossing teenwoordig is, is die toename in E_A baie klein en kan aangeneem word dat die barbituraat nie die E_A vir ATPase betekenisvol verander nie. Uit die berekende waardes vir ΔH (verandering in entalpi), ΔS (verandering in entropie) en ΔG (verandering in vrye energie) is dit duidelik dat die barbituraat nie die hitte van aktivering, die vrye energie of die entropie veel verander het nie.

4.2.2.3.2 Invloed van temperatuur op die werking van sagatal^R by Ca^{2+} -opname

Diamond & Berman (1980) het aangetoon dat die teenwoordigheid van halotaan die Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase-aktiwiteit gestimuleer het. Zucker *et al.* (1982) het vervolgens aangetoon dat die invloed van halotaan op die Ca^{2+} -transport by die hepatiese endoplasmiese retikulum konsentrasie- en preïnkubasietyd-afhanklik is. Die resultate in dié studie verkry toon aan dat natriumpentobarbitoon die Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase-aktiwiteit gestimuleer het en ook dat die invloed van natriumpentobarbitoon konsentrasie- sowel as preïnkubasietyd-afhanklik is. 'n Gepostuleerde meganisme vir halotaan is dat die verdowingsmiddel Ca^{2+} -transport vanaf ATP-hidrolise ontkoppel (Berman *et al.*, 1970). Uit dié resultate in dié studie blyk dit dat natriumpentobarbitoon ook die Ca^{2+} -transport en ATP-hidrolise ontkoppel, wat ook ondersteun word deur die resultate verkry met hartspier SR deur Lain *et al.* (1968). Deurdat temperatuur vervalping van die membraan veroorsaak (Reinert & Steim, 1970), kan temperatuur dus Ca^{2+} -opname ook beïnvloed. Vervolgens is die invloed wat verskillende temperature op die inhiberingsuitwerking van sagatal^R op Ca^{2+} -transport sal uitoefen, nagegaan.

Uit 'n Arrheniusplotting van die invloed wat verskillende temperature op die inhiberingsuitwerking van 3,0 mM sagatal^R (Figuur 9), word geen liniêre krommes verkry nie, wat daarop dui dat veranderinge in die termodinamiese parameters van die aktiveringsproses plaasgevind het. Die krommes se vorm en helling van albei verskil van mekaar. In die afwesigheid van 3,0 mM sagatal^R kom daar 'n breekpunt in die Ca²⁺-opnameproses by 23°C voor, waarna 'n aktiveringsenergie (E_A) van 68,98 kJ.mol⁻¹ benodig word om Ca²⁺-opname verder te laat plaasvind. In die teenwoordigheid van 3,0 mM sagatal^R vind 'n breekpunt by 25°C plaas, waarna 'n E_A van 124,55 kJ.mol⁻¹ nodig was vir verdere Ca²⁺-opname (Tabel 3). Met 3,0 mM sagatal^R is dus ongeveer twee keer die hoeveelheid aktiveringsenergie nodig vir Ca²⁺-opname om verder plaas te vind. Met sagatal^R teenwoordig is die ΔH sowel as die ΔS twee keer die hoeveelheid as wanneer sagatal^R afwesig is, terwyl ΔG nie betekenisvol verander het nie. Uit die resultate blyk dit dus dat, indien sagatal^R teenwoordig is, die hitte van aktivering toeneem, terwyl die vrye energie nie betekenisvol verhoog word nie. Die verandering in ΔS wanneer sagatal^R in die reaksiedium teenwoordig is, dui op die moontlikheid dat die geordenheid in die SR-membraan verander word, sodat 'n meer ongeordende toestand moontlik in die membraan bestaan wat 'n moontlike aanduiding kan wees van verhoogde membraandeurlaatbaarheid.

Die resultate verkry ondersteun ook die moontlikheid dat sagatal^R 'n inhiberingsuitwerking het wat kan plaasvind deurdat sagatal^R die binding van Ca²⁺ aan die Ca²⁺-bindingsplekke onderdruk of dat sagatal^R 'n verhoging in die deurlaatbaarheid van die membraan veroorsaak.

4.2.2.4 Invloed van natriumpentobarbitoon op membraandeur- laatbaarheid

Indien daar gekyk word na die verband wat daar bestaan vir ATP-hidrolise en Ca^{2+} -opname (Ca^{2+} -transport) veroorsaak toenemende konsentrasies barbituraat 'n toename in ATP-hidrolise met 'n afname in Ca^{2+} -opname. Tydens die hidrolise van ATP na ADP + Pi vind vrystelling van energie plaas wat binding van Ca^{2+} en ATP aan die ensiemproteïen moontlik maak. Wanneer die ATP van die buitekant af na die binnekant van die membraanoppervlak beweeg, word die ekstrasellulêre Ca^{2+} dus na die binnekant van die SR-vesikels vervoer. 'n Verhoging in Ca^{2+} -opname-aktiwiteit word verkry tydens 'n toename in ATP-hidrolise. Wanneer die barbituraat teenwoordig is, vind daar wel 'n toename in ATP-hidrolise plaas. Die barbituraat stimuleer dus die ensiemaktiwiteit. By Ca^{2+} -opname het die barbituraat egter die Ca^{2+} -opname-aktiwiteit onderdruk. Die groot verandering in ΔS (Tabel 3) dui op 'n moontlike vervloeiing van die membraan en dus 'n verhoging in die deurlaatbaarheid van die membraan. Daar bestaan dus twee moontlikhede vir die meganisme van natriumpentobarbitoon, deurdat hierdie barbituraat moontlik self aan die Ca^{2+} -bindingsplekke bind en sodoende verhoed dat Ca^{2+} daaraan bind of dat die Ca^{2+} uit die vesikels uitlek deurdat die barbituraat die membrane meer deurlaatbaar maak.

Vervolgens is gepoog om vas te stel of die barbituraat die vesikelmembrane se deurlaatbaarheid vir Ca^{2+} verander (Figuur 10). Indien 3,0 mM natriumpentobarbitoon afwesig is, word ongeveer 138 nmol Ca^{2+} /mg proteïen opgeneem, terwyl ongeveer 101 nmol Ca^{2+} /Mg proteïen opgeneem word as 3,0 mM natriumpentobarbitoon teenwoordig is (Tabel 4). Hierdie eksperiment is uitgevoer in

die afwesigheid van kalsiumpresipiteringsione. Nadat die vesikels in die afwesigheid van natriumpentobarbitoon twee minute lank gelaai is met Ca^{2+} , is 40 mM EDTA by die reaksiemengsel gevoeg. Die EDTA veroorsaak volledige vrystelling van Ca^{2+} (Rauch *et al.*, 1978). Vir beide krommes, waar natriumpentobarbitoon onderskeidelik afwesig en teenwoordig is, vind daar aanvanklik 'n vinnige vrystelling van Ca^{2+} uit die SR-vesikels plaas. Die vinnige Ca^{2+} -vrystelling verteenwoordig die vinnige vrystellingskomponent wat 60 sekondes lank duur. Tussen die tydgrens 60 sekondes tot 180 sekondes kom 'n plato voor waar Ca^{2+} -vrystelling afneem. Die plato verteenwoordig die stadige vrystellingskomponent. Drie minute ná die byvoeging van EDTA is slegs 22 nmol Ca^{2+} /mg proteïen in die vesikels teenwoordig wanneer natriumpentobarbitoon afwesig is. In die teenwoordigheid van 3,0 mM natriumpentobarbitoon, is slegs 8 nmol Ca^{2+} /mg proteïen in die SR-vesikels. Die geringe mate waarin die natriumpentobarbitoon die Ca^{2+} -vrystelling gestimuleer het, is egter nie betekenisvol nie.

Figuur 11 verteenwoordig die Ca^{2+} -vrystelling wat geplot is as 'n funksie van tyd. Albei die krommes vertoon 'n soortgelyke vorm en helling wat aandui dat natriumpentobarbitoon nie 'n betekenisvolle uitwerking op Ca^{2+} -vrystelling het nie, wat ook gesien kan word in Figuur 10. Vir die plottings in Figuur 11 is die vinnige vrystellingskomponent bereken, wat in Figuur 12 geplot is as 'n funksie van tyd. Die berekende $t_{\frac{1}{2}}$ vir 0 mM natriumpentobarbitoon is 20 sekondes en vir 3,0 mM natriumpentobarbitoon 23 sekondes. Indien die $t_{\frac{1}{2}}$ vir beide plottings vergelyk word, is dit duidelik dat natriumpentobarbitoon nie die tempo van Ca^{2+} -vrystelling veel verhoog het nie. Die geringe verhoging van $t_{\frac{1}{2}}$ deur natriumpentobarbitoon is nie genoegsaam

betekenisvol om verhoging in membraandeurlaatbaarheid as 'n meganisme waarvolgens die barbituraat sy uitwerking uitoefen te verantwoord nie.

Deurdat die werking van natriumpentobarbitoon nie verklaar kan word aan die hand van membraandeurlaatbaarheid nie, moes die tweede moontlike meganisme soos genoem in 4.2.2.3 ondersoek word, naamlik dat die barbituraat die Ca^{2+} uit die Ca^{2+} -bindingsplekke verplaas en self aan die Ca^{2+} -bindingsplekke bind.

4.2.2.5 Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasies op die inhiberings- uitwerking van natriumpentobarbitoon

Om eksperimenteel te bepaal of die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon moontlik kompeterende inhibisie veroorsaak vir binding aan die Ca^{2+} -bindingsplekke op die transport-ATPase, is die invloed wat 3,0 mM natriumpentobarbitoon op Ca^{2+} -opname sal uitoefen in die teenwoordigheid van verskillende konsentrasies vrye Ca^{2+} nagegaan. Die Lineweaver-Burke-kromme van hierdie resultate (Figuur 13) toon aan dat in die afwesigheid sowel as die teenwoordigheid van 3,0 mM natriumpentobarbitoon, indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasies laag is, die tempo van Ca^{2+} -opname stadig is. Met 'n toename in die vrye Ca^{2+} -konsentrasie neem die tempo van Ca^{2+} -opname ook toe. Die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon in die reaksiemengsel verskuif egter die kromme na links, wat aandui dat die tempo van Ca^{2+} -opname in die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon stadiger is as wanneer natriumpentobarbitoon afwesig is. Natriumpentobarbitoon onderdruk dus die tempo van Ca^{2+} -opname.

Met 'n toenemende verhoging in die vrye Ca^{2+} -konsentrasie beweeg die twee krommes nader aan mekaar. Met ekstrapolering van die twee krommes, sny die krommes mekaar op die y-as, waar die V_{maks} (maksimum tempo van Ca^{2+} -opname) $5,556 \mu\text{mol Ca}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ is. Die V_{maks} word nie beïnvloed deur die teenwoordigheid van die kompeterende inhibeerder natriumpentobarbitoon nie. By die V_{maks} is die vrye Ca^{2+} -konsentrasie geweldig hoog. Hierdie resultate toon aan dat die tempo van Ca^{2+} -opname vir beide krommes dieselfde is. Die natriumpentobarbitoon onderdruk die binding van Ca^{2+} aan die Ca^{2+} -bindingsplekke op die transport-ATPase. Onder die eksperimentele toestande in dié studie vind die onderdrukking plaas met 'n Hill-konstante (n_H) van ongeveer 1, wat daarop dui dat slegs een van die moontlike twee Ca^{2+} -bindingsplekke op die ATPase deur natriumpentobarbitoon beïnvloed word.

Die invloed van natriumpentobarbitoon op skeletspier SR is soortgelyk aan die uitwerking wat dié barbituraat op rooibloedsel-membrane het, waar dit ook die Ca^{2+} uit die Ca^{2+} -bindingsplekke verplaas het (Low *et al.*, 1979). Volgens Fuchs *et al.* (1968) is die intrasellulêre vrye Ca^{2+} -konsentrasie die kritiese bepaling by kragontwikkeling vir kontraksie. In hierdie studie is aangetoon dat natriumpentobarbitoon Ca^{2+} -opname inhibeer en dus sal die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie afneem. Natriumpentobarbitoon kan dus spiersametrekking beïnvloed. Lain *et al.* (1968) het aangetoon dat die invloed van natriumpentobarbitoon op spiersametrekking groter was as sy invloed op Ca^{2+} -opname. Hierdie outeurs het voorgestel dat 'n verhoging in membraandeurlaatbaarheid die vrystelling van verdere Ca^{2+} kan veroorsaak. Lain *et al.* (1968) kan egter geen betekenisvolle veranderinge in Ca^{2+} -vrystelling in die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon waarneem nie. In dié studie is soortgelyke resultate (4.2.2.4) verkry.

Daar kan dus aanvaar word dat die vernaamste uitwerking van natriumpentobarbitoon op skeletspier SR die kompeterende inhibisie van Ca^{2+} -binding aan die Ca^{2+} -bindingsplekke op die membraan is.

OPSOMMING

Barbiturate beïnvloed die SR-membraanfunksies op verskillende wyses. Daar is aangetoon dat pentobarbitoon sowel as ander barbiturate die fase-oorgangstemperatuur verlaag (Lee, 1976) waardeur die vloeibaarheid van die membraanfosfolipiede verander mag word. Low *et al.* (1979) het aangetoon dat barbiturate die Ca^{2+} uit die Ca^{2+} -bindingsplekke in die membraan van die rooibloedsel verplaas, terwyl halotaan (Diamond & Berman, 1980) met die ATP wedywer om binding aan die SR-membraan. Resultate verkry deur Saida & Suzuki (1981) stel voor dat die prilokaïne waarskynlik in staat is om die SR-membraan te depolariseer, waardeur vinnige Ca^{2+} -vrystelling veroorsaak word. In 1968 het Lain *et al.* aangetoon dat natriumpentobarbitoon Ca^{2+} -opname deur die hartsier SR minder beïnvloed word as wat kardiaal kontraktiwiteit beïnvloed word. Dit blyk dus dat verdowingsmiddels soos natriumpentobarbitoon membrane soos die SR-membraan op verskillende wyses kan beïnvloed.

In hierdie projek is die uitwerking van natriumpentobarbitoon (sagatal^R) op gefragmenteerde skeletspier SR het, bestudeer soos well as die meganisme waardeur hierdie uitwerking uitgeoefen word. Natriumpentobarbitoon verskyn onder n reeks handelsmerke, onder meer sagatal^R, wat moontlik anti-oksidante en alkoholiese oplosmiddels bevat, wat die SR-funksies kan beïnvloed. Op grond hiervan is die eksperimente met sagatal^R sowel as natriumpentobarbitoon uitgevoer.

Natriumpentobarbitoon het nie die totale ATPase-aktiwiteit geïnhibeer nie. Hierdie resultate is in ooreenstemming met die re-

sultate verkry deur Lain *et al.* (1968). In dié studie is gevind dat die natriumpentobarbitoon selfs die ATPase-aktiwiteit effens stimuleer. Die stimulasie was meer opvallend by hoë konsentrasies natriumpentobarbitoon. Sukrose in 'n konsentrasie van 300 mM het nie die uitwerking verander nie.

In 'n dosisresponskromme van die invloed wat sagatal^R op Ca²⁺-opname het in die afwesigheid van kalsiumpresipiteringsione, is gevind dat sagatal^R by 'n lae konsentrasie (0,1 mM), die Ca²⁺-opname verhoog het, terwyl hoë konsentrasies die Ca²⁺-opname-aktiwiteit laat afneem het. In die teenwoordigheid van kalsiumpresipiteringsione het natriumpentobarbitoon die Ca²⁺-opname onderdruk. Hier het 300 mM sukrose beskerming gebied teen die uitwerking van natriumpentobarbitoon op Ca²⁺-opname. Preïnkubasie van die SR-vesikels het die Ca²⁺-opname net effens onderdruk, maar die teenwoordigheid van sagatal^R het die Ca²⁺-opname meer opvallend geïnhibeer. Die afname in Ca²⁺-opname was meer opvallend ná preïnkubasie 20 minute lank as ná vyf minute van preïnkubasie.

Uit die Arrheniusplotting van die uitwerking wat natriumpentobarbitoon onder verskillende temperature op die totale ATPase-aktiwiteit het, is dit duidelik dat die natriumpentobarbitoon nie die vorm of die hellings van die krommes sowel as die aktiveringsenergie vir ATPase-aktiwiteit veel verander het nie. Die aktiveringsenergie (E_A) in die afwesigheid van natriumpentobarbitoon is bereken op $51,36 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ en in die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon was die E_A $55,44 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die breekpunt in die Arrheniusplotting het by 20°C plaasgevind en is nie deur die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon verander nie. Die Arrheniusplotting van Ca²⁺-opname-aktiwiteit

toon 'n verskil aan in die vorm en hellings van die krommes. In die afwesigheid van sagatal^R het 'n breekpunt by 23°C plaasgevind. In die teenwoordigheid van sagatal^R vind 'n omgekeerde breekpunt by 25°C plaas, waarna die aktiveringsenergie 124,55 kJ.mol⁻¹ was.

In hierdie studie kon daar nie 'n betekenisvolle verandering in die tempo van Ca²⁺-vrystelling in die teenwoordigheid van natriumpentobarbitoon aangetoon word nie. Natriumpentobarbitoon het nie die relatiewe grootte van die vinnige vrystellingskomponent of die $t_{\frac{1}{2}}$ veel verander nie.

Om vas te stel of die natriumpentobarbitoon kompeterende inhibisie veroorsaak vir binding aan die Ca²⁺-bindingsplekke op die ATPase-molekuul, is die uitwerking wat verskillende konsentrasies Ca²⁺ op die inhibisie van Ca²⁺-opname deur natriumpentobarbitoon het, ondersoek. Die Lineweaver-Burke-plotting het dan ook aangetoon dat daar wel mededinging tussen die natriumpentobarbitoon en Ca²⁺ bestaan, en dus is die meganisme waarvolgens natriumpentobarbitoon sy invloed uitoefen, wel kompeterende inhibisie.

SUMMARY

Barbiturates influence the functions of sarcoplasmic reticulum (SR) membranes. It has been shown that pentobarbital as well as other barbiturates caused a reduction in the phase transition temperatures (Lee, 1976) and thus it may alter the fluidity of the membrane phospholipids. Low *et al.* (1979) has shown that sodium pentobarbital displaces Ca^{2+} from their binding sites in red blood cell membranes while halothane (Diamond & Berman, 1980) competes with ATP for binding to the SR membrane. Experiments performed by Saida & Suzuki (1981) suggest that pilocaine presumably is able to depolarize the SR membrane, causing rapid Ca^{2+} release. It has been documented by Lain *et al.* (1968) that pentobarbital inhibits Ca^{2+} uptake by cardiac SR less than it affects cardiac contractility. From these reports it seems that anaesthetics like pentobarbital sodium may affect membranes like the sarcoplasmic reticulum in various ways.

In this project an attempt was made to elucidate the effect that pentobarbital sodium (sagatal^R) has on fragmented skeletal muscle SR as well as the possible mechanism involved. Pentobarbital sodium is presented under various trade marks, for example Sagatal^R, which may contain anti-oxidants and alcoholic solvents that may affect the SR functions. Because of this the experiments have been done with sagatal^R but to a great extent with pentobarbital sodium.

In accordance with the results reported by Lain *et al.* (1968) pentobarbital sodium did not inhibit total ATPase activity. It was observed that pentobarbital sodium caused a mild stimulation of ATPase activity which was more prominent at higher concen=

trations. Sucrose at a concentration of 300 mM did not alter the effect.

In a dose-response curve of the effect of sagatal^R on Ca²⁺-uptake by fragmented skeletal muscle SR in the absence of calcium precipitating ions, it was found that sagatal^R, at a low concentration of 0,1 mM, caused an increase in Ca²⁺-uptake while a decrease in Ca²⁺-uptake was observed in the concentration range 0,1 mM to 15,6 mM. In the presence of calcium precipitating ions, pentobarbital sodium caused an inhibition of Ca²⁺-uptake. The presence of 300 mM sucrose gave protection against the effect of the pentobarbital sodium and Ca²⁺-uptake increased. Preincubation of the SR vesicles for different lengths of time caused only a slight decrease in Ca²⁺ uptake activity while the decrease was more prominent in the presence of sagatal^R. The decrease in Ca²⁺ uptake was more prominent at twenty minutes than at five minutes preincubation time.

From the Arrhenius plot for the effect that pentobarbital sodium and sagatal^R had on total ATPase activity at different temperatures, it was clear that pentobarbital sodium neither affected the slopes of the curves nor the activation energy for ATPase activity markedly. The E_A for ATPase in the absence of pentobarbital sodium and sagatal^R was estimated to be 51,36 kJ.mole⁻¹ and in the presence of pentobarbital sodium E_A was 55,4 kJ.mole⁻¹. The break-point in the Arrhenius plot occurred at 20°C and was not altered by pentobarbital sodium. The Arrhenius plot of Ca²⁺ uptake activity showed a difference in the shapes and slopes of the curves. In the absence of sagatal^R a break-point occurred at 23°C while the activation energy after this point was 68,98 kJ.mole⁻¹. In the presence of sagatal^R, a reversed break-point

occurred at 25°C after which the activation energy was 124,55 kJ.mole⁻¹.

This research attempt did not succeed in showing any meaningful change in the rate of Ca²⁺ efflux under the influence of pentobarbital sodium. Neither the relative size of the fast efflux component nor the $t_{\frac{1}{2}}$ was altered in the presence of pentobarbital sodium.

To establish whether the presence of pentobarbital sodium actually causes competitive inhibition for binding to the Ca²⁺ binding sites on the ATPase molecule, the effect of different concentrations of Ca²⁺ on the inhibition of Ca²⁺ uptake by pentobarbital sodium was studied. The Lineweaver-Burke plot indicated that there is indeed competitive inhibition between pentobarbital sodium and calcium.

LITERATUURLYS

- ALLEN, G. & GREEN, N.M. 1976. A 31-Residue tryptic peptide from the active site of the Ca^{++} -transporting adenosine triphosphatase of rabbit sarcoplasmic reticulum. *FEBS Letters*, 63(1):188-192.
- BARLOGIE, B., HASSELBACH, W. & MAKINOSE, M. 1971. Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate. *FEBS Letters*, 12(5): 267-268.
- BERMAN, M.C., HARRISON, G.G., BULL, A.B. & KENCH, J.E. 1970. Changes underlying Halothane-induced Malignant Hyperpyrexia in Landrace Pigs. *Nature*, 225:653-655.
- BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. 1975. A Textbook of histology. Philadelphia: W.B. Saunders. 1033 p.
- BOLAND, R., MARTONOSI, A. & TILLACK, T.W. 1974. Developmental changes in the composition and function of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(2):612-623.
- BRANDT, N.R., CASWELL, A.H. & BRUNSCHWIG, J-P. 1980. ATP-energized Ca^{2+} pump in isolated transverse tubules of skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(13): 6290-6292.
- CHALOUB, R.M., GUIMARAES-MOTTA, H., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., DE MEISS, L. & INESI, G. 1979. Sequential reactions in P_i utilization for ATP synthesis by sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(19): 9464-9468.
- DE MEIS, L. & VIANNA, A.L. 1979. Energy interconversion by the

- Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Annual Review of Biochemistry*, 48:275-292.
- DIAMOND, E.M. & BERMAN, M.C. 1980. The effect of halothane on the stability of Ca²⁺ transport activity of isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Pharmacology*, 29:375-381.
- EBASHI, S. 1976. Excitation-contraction coupling. *Annual Review of Physiology*, 38:293-313.
- EBASHI, S. & ENDO, M. 1968. Calcium ion and muscle contraction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 18:123-183.
- ELETR, S. & INESI, G. 1972. Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: Spin-label ESR and proton NMR studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 382:174-179.
- ENDO, M. TANAKA, M. & OGAWA, Y. 1970. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*, 228:34-36.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. 1979. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *Journal of Physiology Paris*, 75(5):463-505.
- FUCHS, F. 1969. Inhibition of sarcotubular calcium transport by caffeine: species and temperature dependence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 172:566-570.
- FUCHS, F. 1974. Striated muscle. *Annual Review of Physiology*, 36:461-502.

- FUCHS, F., GERTZ, E.W. & BRIGGS, F.N. 1968. The effect of quinine on calcium accumulation by isolated sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. *The Journal of General Physiology*, 52:955-968.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66(2):375-400.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. 1970. Studies of the triad: I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *The Journal of Cell Biology*, 47:488-499.
- GERGELY, J. 1974. Some aspects of the role of the sarcoplasmic reticulum and the tropomyosin - Troponin system in the control of muscle contraction by calcium ions. *Circulation Research*, 34 & 35: 111-74 - 111-82.
- HANSON, J. & HUXLEY, H.E. 1953. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature*, 172:530-532.
- HASSELBACH, W. 1964. Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry*, 14:167-222.
- HASSELBACH, W. 1978. The reversibility of the sarcoplasmic calcium pump. *Biochimica et Biophysica Acta*, 515:23-53.
- HERBETTE, L., MESSINEO, F.C. & KATZ, A.M. 1982. The interaction of drugs with the sarcoplasmic reticulum. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 22:413-434.

HO, M-M, SCALES, D.J. & INESI, G. 1983. The effect of trifluoroparazine on the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochemica et Biophysica Acta*, 720:64-70.

IKEMOTO, N. 1975. Transport and inhibitory Ca^{2+} binding sites on the ATPase enzyme isolated from the sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(18):7219-7224.

IKEMOTO, N. 1976. Behaviour of the Ca^{2+} transport sites linked with the phosphorylation reaction of ATPase purified from the sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(22):7275-7277.

IKEMOTO, N. 1982. Structure and function of the calcium pump protein of sarcoplasmic reticulum. *Annual Review of Physiology*, 44:297-317.

IKEMOTO, N., ANTONIU, B. & KIM, D.H. 1984. Rapid calcium release from the isolated sarcoplasmic reticulum is triggered via the attached transverse tubular system. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(21):13151-13158.

JOHNSON, P.N. & INESI, G. 1969. The effect of methylxanthines and local anesthetics on fragmented sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 169(2): 308-314.

KATZ, A.M., REPKE, D.I., CORKEDALĚ, S & SCHWARZ, J. 1975. Effects of local anaesthetics and calcium transport by canine cardiac microsomes (fragmented sarcoplasmic reticulum). *Cardiovascular Research*, 9:764-769.

- KATZ, A.M., REPKE, D.I. & HASSELBACH, W. 1977. Dependence of ionophore- and caffeine-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles on external and internal calcium ion concentrations. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(6):1938-1949.
- KLIP, A., REITHMEIER, R.A.F. & R. MACLENNAN, D.H. 1980. Alignment of the major tryptic fragments of the adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 225(14):6562-6568.
- KUREBAYASHI, N. & OGAWA, Y. 1982. Effect of halothane on the calcium activated ATPase reaction of fragmented sarcoplasmic reticulum in reference to the Ca-releasing Action. *Journal of Biochemistry*, 92(3):907-913.
- KUREBAYASHI, N., OGAWA, Y. & HARAFUJI, H. 1982. Effect of local anesthetics on calcium activated ATPase and its partial reaction with fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog and rabbit skeletal muscle. *Journal of Biochemistry*, 92(3):915-920.
- KWANT, W.O. & SEEMAN, P. 1969. The displacement of membrane calcium by a local anesthetic (chlorpromazine). *Biochimica et Biophysica Acta*, 193:338-349.
- LAIN, R.F., HESS, M.L., GERTZ, E.W. & BRIGGS, F.N. 1968. Calcium uptake activity of canine myocardial sarcoplasmic reticulum in the presence of anesthetic agents. *Circulation Research*, 23: 597-604.

- LEE, A.G. 1976. Interactions between phospholipids and barbiturates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455:102-108.
- LOW, P.S., LLOYD, D.H., STEIN, T.M. & ROGERS, J.A., III. 1979. Calcium displacement by local anesthetics: dependence on pH and anesthetic charge. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(10): 4119-4125.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- MACLENNAN, D.H. 1974. Isolation of a second form of calsequestrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(3):980-984.
- MACLENNAN, D.H. & WONG, P.T.S. 1971. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 68(6):1231-1235.
- MACLENNAN, D.H., ZUBRZYCKA-GAARN, E. & JORGENSEN, A.O. 1985. Assembly of the sarcoplasmic reticulum during muscle development. (In Bronner, F., Knauf, P.A. & Cook, J.S., *red(s)*. Current Topics in membranes and transport: membrane protein biosynthesis and turnover. Orlando: Academic Press Inc. p. 337-368.)
- MAKINOSE, M. 1971. Calcium efflux dependent formation of ATP from ADP and orthophosphate by the membranes of the sarcoplasmic vesicles. *FEBS Letters*, 12(5):269-270, Jan.
- MAKINOSE, M. & HASSELBACH, W. 1971. ATP synthesis by the reverse of the sarcoplasmic calcium pump. *FEBS Letters*, 12(5):271-272.

- MALAN, N.T. 1976. A study on some structural and functional properties of the sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. Potchefstroom. 157 p. (Proefskrif (D.Sc.) - PU vir CHO.)
- MALINCONICO, S.M. & MCCARL, R.L. 1982. Effect of halothane on cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase at low calcium concentrations. *Molecular Pharmacology*, 22:8-10.
- MAGRETH, A., CARRARO, U. & SALVIATI, G. 1974. Structural membrane proteins and loosely associated proteins of the sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 139:509-513.
- MARK, L.C., BRAND, L. & PEREL, J.M. 1974. Molecular approaches to mechanisms of barbiturate action. *Intra-Science Chemistry Reports*, 8(1-3):67-71.
- MARSH, B.B. 1952. The effects of adenosine triphosphate on the fibre volume of a muscle homogenate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 9:247-260.
- MARTONOSI, A.N. 1984. Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiological Reviews*, 64(4):1240-1320.
- MCFARLAND, B.H. & INESI, G. 1971. Solubilization of sarcoplasmic reticulum with Triton X-100. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 145:456-464.
- MEISSNER, G. 1975. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 389:51-68.

MEISSNER, G. CONNER, G.E. & FLEISCHER, S. 1973. Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca^{2+} -pump and Ca^{2+} -binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 298:246-269.

MICHALAK, M. & MACLENNAN, D.H. 1980. Assembly of the sarcoplasmic reticulum: biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cell cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(4):1327-1334.

MICHALAK, M. CAMPBELL, K.P. & MACLENNAN, D.H. 1980. Localization of the high affinity calcium binding protein and an intrinsic glycoprotein in sarcoplasmic reticulum membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(4):1317-1326.

MILLER, K.W. & PANG, K-Y.Y. 1976. General anaesthetics can selectively perturb lipid bilayer membranes. *Nature*, 263:253-255.

OGAWA, Y. & KUREBAYASHI, N. 1982. The Ca-releasing action of halothane on fragmented sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biochemistry*, 92(3):899-905.

OSTWALD, T.J. & MACLENNAN, D.H. 1974. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(3):974-979.

PANG, K-Y.Y., BRASWELL, L.M., CHANG, L., SOMMER, T.J. & MILLER, K.W. 1980. The perturbation of lipid bilayers by general anesthetics: A quantitative test of the disordered lipid hypothesis. *Molecular Pharmacology*, 18:84-90.

RAUCH, B., V. CHAK, D. & HASSELBACH, W. 1978. An estimate of the kinetics of calcium binding and dissociation of the sarcoplasmic reticulum transport ATPase. *FEBS Letters*, 93(1):65-68.

REINERT, J.C. & STEIM, J.M. 1970. Calorimetric detection of a membrane-lipid phase transition in living cells. *Science*, 168: 1580-1582.

SAIDA, K. & SUZUKI, A. 1981. Mode of action of prilocaine on sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 219(3): 815-820.

SANDOW, A. 1970. Skeletal muscle. *Annual Review of Physiology*, 32:87-138.

SARZALA, M.G., PILARSKA, M. ZUBRZYCKA, E. & MICHALAK, M. 1975. Changes in the structure, composition and function of sarcoplasmic-reticulum membrane during development. *The European Journal of Biochemistry*, 57:25-34.

SCALES, D. & INESI, G. 1976. Assembly of ATPase protein in sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophysical Journal*, 16:735-751.

SCHWARTZ, A. 1972. Calcium metabolism. *Cardiology*, 57:16-23.

SHAMOO, A.E., RYAN, T.E., STEWART, P.S. & MACLENNAN, D.H. 1976. Localization of ionophore activity in a 20,000 dalton fragment of the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(13):4147-4154.

- SHARPLESS, S.K. 1971. Hypnotics and sedatives: I. The barbiturates. (In Goodman, L.S. & Gilman, A., *red(s)*. The Pharmacological basis of therapeutics. London: The MacMillan Company. p. 98-120).
- SOLARO, R.J., GERTZ, E.W. & BRIGGS, F.N. 1972. Sucrose antagonism of drug and temperature effects on cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 255:751-761.
- STEWART, P.S. & MACLENNAN, D.H. 1974. Surface particles of sarcoplasmic reticulum membranes: structural features of the adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(3):985-993.
- TILLACK, T.W., BOLAND, R. & MARTONOSI, A. 1974. The ultrastructure of developing sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(2):624-633.
- TONOMURA, Y. 1973. Muscle proteins, muscle contraction and cation transport. University of Tokyo. 433 p.
- UTSUNOMIYA, T., KRAUSZ, M.M., DUNHAM, B., SHEPRO, D. & HECHTMAN, H.B. 1982. Depression of myocardial ATPase activity by plasma obtained during positive end-expiratory pressure. *Surgery*, 91(3): 322-328.
- VOLPE, P., PALADE, P., CASTELLO, B., MITCHELL, R.D. & FLEISCHER, S. 1983. Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum: effect of local anesthetics. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(20):12434-12442.

WINEGRAD, S. 1970. The intracellular site of calcium activation of contraction in frog skeletal muscle. *The Journal of General Physiology*, 55:77-88.

YAMADA, S. & IKEMOTO, N. 1980. Reaction mechanism of calcium-ATPase of sarcoplasmic reticulum: substrates for phosphorylation reaction and back reaction, and further resolution of phosphorylated intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(7): 3108-3119.

YU, B.P., MASORO, E.J. & MORLEY, T.F. 1976. Analysis of the arrangement of protein components in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 351(7): 2037-2043.

ZUCKER, J.R., DIAMOND, E.M. & BERMAN, M.C. 1982. Effect of halothane on calcium transport in isolated hepatic endoplasmic reticulum. *British Journal of Anaesthesia*, 54:981-985.

AFKORTINGS

ANSA	:	1-Amino-2-hidroksienaftaleen-4-sulfoonsuur
ATP	:	Adenosientrifosfaat
ATPase	:	Adenosientrifosfatase
CaCl ₂	:	Kalsiumchloried
EDTA	:	Etileendiamientetra-asynsuur
EGTA	:	Etileenglikol-bis-(-amino-eteleter) N, N'-te- tra-asynsuur
H ₂ SO ₄	:	Swawelsuur
KCl	:	Kaliumchloried
KO _x	:	Kaliumoksalaat
KOH	:	Kaliumhidroksied
Na ₂ CO ₃	:	Natriumkarbonaat
NaHSO ₃	:	Natriumbisulfiet
NaOH	:	Natriumhidroksied
NaSO ₃	:	Natriumsulfiet
MgCl ₂	:	Magnesiumchloried
MOPS	:	Morfolinopropaansulfoonsuur
Pi	:	Anorganiese fosfaat
SR	:	Sarkoplasmiese retikulum
TCA	:	Trichloorasynsuur
Sagatal ^R	:	dui die handelsnaam van die gekoopte handelspro- duk aan, terwyl natriumpentobarbitoon die produk verteenwoordig wat eers voor gebruik opgelos moes word.

BEDANKINGS

Graag wil ek die volgende persone en instellings bedank vir die bydrae wat elkeen tot hierdie werk gemaak het:

- Opregte dank aan my leier, prof. N.T. Malan, vir sy geduld, hulp en leiding.
- Prof. P.J. Pretorius vir sy belangstelling en aanmoediging.
- Ook my dank aan mnr. F.C. Eloff vir al sy hulp.
- Aan al die personeel van die Departement Fisiologie, maar veral aan mev. R. Taljaard vir haar ondersteuning.
- Aan my medestudente vir hulle aanmoediging.
- Aan die WNNR vir finansiële ondersteuning.
- Aan prof. A.P. Lotter vir die suiwer natriumpentobarbitoon wat hy geskenk het.
- Aan mev. A.J. van Biljon vir die netjiese tikwerk.
- Aan prof. Gert Pienaar vir die taalkundige versorging van die verhandeling.
- Aan Kitskopieë vir die uitstekende druk- en bindwerk.
- Aan my ouers vir al die liefde, ondersteuning en belangstelling deur al die jare. Dit is met diepe dankbaarheid dat ek hierdie werk aan hulle opdra.

My dank aan God, want deur Hom en tot Hom is alle dinge tot in ewigheid.