

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/107471>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-06 and may be subject to change.

1284

DE KOPPELING VAN CONTRACTIE  
EN GRENDELING AAN DE PRIKKEL  
IN DE ANTERIOR BYSSUS RETRACTOR  
VAN MYTILUS EDULIS L.

H. J. LEENDERS





DE KOPPELING VAN CONTRACTIE  
EN GRENDELING AAN DE PRIKKEL  
IN DE ANTERIOR BYSSUS RETRACTOR VAN MYTILUS EDULIS L.



DE KOPPELING VAN CONTRACTIE  
EN GRENDELING AAN DE PRIKKEL  
IN DE ANTERIOR BYSSUS RETRACTOR  
VAN MYTILUS EDULIS L.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR  
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. A.J.H. VENDRIK,  
HOGLERAAR IN DE FACULTEITEN DER GENEESKUNDE  
EN DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN,  
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN  
OP VRIJDAG 28 APRIL 1967 DES NAMIDDAGS TE 2 UUR

DOOR

HENDRIKUS JOHANNES LEENDERS

GEBOREN TE NIJMEGEN

1967

THOBEN OFFSET NIJMEGEN



Voor mijn familie





# INHOUD

blz.

## HOOFDSTUK I:

INLEIDING . . . . .	11
I.1. Het tetanisch principe . . . . .	11
I.2. Het grendelmechanisme . . . . .	12
I.2.1. De economie van de grendeling . . . . .	13
I.2.2. De structuur van de ABRM en de betekenis hier- van . . . . .	13
I.2.2.1. Het <i>sliding</i> -filamentmechanisme . . . . .	14
I.2.2.2. De betekenis van het paramyosine . . . . .	14
I.2.2.3. Spanningsrest en ' <i>active-state</i> ' . . . . .	15
I.2.2.4. In- en uitschakeling van de grendeling . . . . .	16
I.3. De <i>excitation-concentration coupling</i> . . . . .	17
I.4. Probleemstelling en programma . . . . .	18

## HOOFDSTUK II:

MATERIAAL EN ALGEMENE METHODEN . . . . .	21
II.1. Materiaal en preparatie . . . . .	21
II.2. Apparatuur en registratie . . . . .	21
II.3. Prikkeling . . . . .	23
II.4. Milieu . . . . .	24
II.5. ATPase-activiteit . . . . .	24
II.6. Verwerking van de geregistreerde opnamen . . . . .	25
II.7. Statistische aspecten . . . . .	26

## HOOFDSTUK III:

PIEKSPANNING EN SPANNINGSREST . . . . .	27
III.1. De <i>twitch</i> . . . . .	27
III.2. De contractuur met ACh . . . . .	28
III.3. De contractuur met KCl . . . . .	29
III.4. De betekenis van de S-vormige spanningscurve bij spieren . . . . .	31
III.5. De frequentie-tetanus kromme . . . . .	31
III.6. Discussie en experiment . . . . .	32

## HOOFDSTUK IV:

DE KOPPELENDE WERKING VAN Ca . . . . .	35
IV.1. Onttrekken van Ca aan de spier . . . . .	35
IV.2. Variatie van het Ca-gehalte in het milieu . . . . .	37
IV.3. De werking van Ca en de inactivering door thiourem . . . . .	39
IV.4. Discussie . . . . .	41

## HOOFDSTUK V:

PIEKSPANNING EN SPANNINGSREST BIJ GMF . . . . .	43
V.1. De werking van Ca . . . . .	44
V.2. De tijd van activering . . . . .	48
V.3. Het effect van de substraatconcentratie . . . . .	49
V.4. Het effect van de temperatuur . . . . .	51
V.5. Discussie . . . . .	52

## HOOFDSTUK VI:

DE INVLOED VAN DE GRENDELING OP DE SPANNINGSONT- WIKKELING TIJDENS CONTRACTIE VAN GMF EN SPIEREN. . . . .	55
VI.1. Het <i>release-recovery</i> fenomeen bij GMF . . . . .	56
VI.2. Het <i>release-recovery</i> fenomeen bij de ABRM . . . . .	58
VI.3. Grenseling tijdens de ACh-contractuur? . . . . .	61
VI.4. De invloed van 5-HT op de piekspanning . . . . .	62
VI.5. Discussie . . . . .	64

## HOOFDSTUK VII:

DE VERSLAPPING . . . . .	67
VII.1. De invloed van Ca op de werking van 5-HT . . . . .	68
VII.2. De werking van Ca op een getrypsineerde spier . . . . .	70
VII.3. Een verslappingsprikkel in de vorm van een lage con- centratie ACh (0,5 $\mu$ gr/ml) . . . . .	73
VII.4. Verslapping met een lage concentratie niet-gebonden ATP bij GMF . . . . .	75
VII.5. Discussie . . . . .	76

## HOOFDSTUK VIII:

DE WERKING VAN Ca IN CONTRACTUUR EN TETANUS . . . . .	79
VIII.1. De invloed van de werking van Ca in de tetanus en van de frequentie daarop . . . . .	79
VIII.2. De invloed van het Ca-gehalte op de <i>twitch</i> . . . . .	82
VIII.3. De invloed van Ca op de KCl-contractuur . . . . .	84
VIII.4. Discussie . . . . .	87

HOOFDSTUK IX:	
SLOTBESCHOUWING . . . . .	91
IX.1. De draagfunctie bij andere spieren . . . . .	91
IX.1.1. Grendelspieren . . . . .	91
IX.1.2. Gladde spieren zonder paramyosine . . . . .	93
IX.1.3. Snelle en langzame dwarsgestreepte spieren . . . . .	93
IX.2. Mechanismen van de grendeling . . . . .	94
IX.2.1. De <i>linkage</i> hypothese . . . . .	95
IX.2.2. De tropomyosinctheorie . . . . .	95
IX.2.3. Een actine-myosineparamyosinehypothese van de grendeling . . . . .	96
SAMENVATTING . . . . .	99
SUMMARY . . . . .	101
LITERATUUR . . . . .	103

## AFKORTINGEN

ABRM	anterior byssus retractor
a.c.	wisselstroom
ACh	acetylcholine
A.P.	actiepotentiaal
ATP	adenosinetrifosfaat
ATPase	adenosinetrifosfatase
d.c.	gelijkstroom
EDTA	aethyleendiaminotetraäcetaat
EGTA	aethyleenglycoldiaminotetraäcetaat
GMF	met glycerine geëxtraheerde vezelbundels
5-HT	5-hydroxytryptamine
Hz	Herz, frequentie
$L_0$	rustlengte
P	spanning
$P_0$	piekspanning
r.a.c.	pulserende gelijkstroom
s.r.	sarcoplasmatisch reticulum

# HOOFDSTUK I

## INLEIDING

De samentrekking en verslapping van spieren vormen de basis voor de beweging van mens en dier. De schuifhypothese wordt thans algemeen als grondslag voor het tot stand komen van de samentrekking aanvaard. Dit geldt voor de dwarsgestreepte en de gladde spier. Over de verslapping heerst er echter nog geen opinio communis. Fysiologisch onderzoek heeft aan het licht gebracht, dat de houdings- of draagfunctie, welke taak eveneens door spieren wordt vervuld, verband blijkt te houden met de snelheid van de verslapping. Dwarsgestreepte spieren bewerken snelle bewegingen, doch hun houdingsfunctie wordt beperkt door optredende vermoeidheid; ze verslappen snel. Een uitgesproken draagfunctie hebben vooral een aantal gladde molluskenspieren, maar hun bewegingssnelheid blijkt gering te zijn. De ABRM (*Anterior Byssal Retractor Muscle*) is een prototype van deze laatste groep. De meningen zijn lange tijd verdeeld geweest omtrent het mechanisme, waarmee spieren een eenmaal verkregen verkorting kunnen bewaren. Deze opvattingen kunnen worden ondergebracht in twee groepen. Sommige onderzoekers beschouwden de houdingsfunctie als een bijzondere vorm van beweging, terwijl anderen deze functie toeschreven aan bijzondere voorzieningen, die in de desbetreffende spieren aanwezig zouden zijn. In het kort kunnen de volgende karakteristieken van de twee zienswijzen worden weergegeven.

### I.1. Het tetanisch principe

Spieren kunnen een bepaalde verkortingsgraad vasthouden door *twitches* van door het zenuwstelsel afzonderlijk geactiveerde eenheden (*units*), die elkaar zó snel opvolgen, dat er geen verslapping kan optreden; deze zou immers spontaan volgen, wanneer de prikkeling ophoudt. De tetanus gaat gepaard met een hoog energieverbruik. Daarom zal het duidelijk zijn, dat spieren met een langzame verslapping een minder frequente reactivering nodig hebben om de verkorting te bewaren. Zo heeft de dwarsgestreepte sartorius van *Rana* bij 0°C een reactivering



van 40/sec. nodig (REICHEL, 1960), terwijl bij uitgesproken draagspieren, zoals mollusken adductoren en retractoren, slechts een frequentie (= aantal pulsen per seconde) van 2-8 Hz bij 15°C noodzakelijk is (ABBOTT en LOWY, 1958). De tetanushypothese heeft nog tot 1959 haar aanhangers gehad ter verklaring van iedere langzame verslapping.

HOYLE en LOWY (1956) hadden tijdens de toestand van langzame verslapping bij adductoren van mollusken elektrische activiteit vastgesteld. Deze tetanische activiteit zou onderhouden worden door intramusculaire ganglioncellen, die aanvankelijk door BOWDEN en LOWY (1955) werden beschreven. DEANE en TWAROG (1957) noch CAMBRIDGE et al. (1959) konden het bestaan van deze ganglioncellen bevestigen. FLETCHER (1937 c) en TWAROG (1960 a) vonden in vele gevallen ook geen elektrische activiteit. De kleine potentiaalschommelingen, die werden waargenomen, stonden in geen enkel verband met de spanning. Wel zou een periodieke heractivering op zijn plaats kunnen zijn om de verkorting of spanning te bewaren, daar de actieve spanning na afloop van de contractie natuurlijk niet gehandhaafd blijft, maar in dit geval kan met een zeer lage frequentie worden volstaan: 0,25 Hz (LOWY en MILLMAN, 1963). Het tetanisch principe is dus volgens deze opvatting van algemene aard, doch het lange handhaven van de verkorting kan hier niet aan worden toegeschreven, omdat deze, zoals gebleken is (zie I.2.2.2. en I.2.2.3.), niet actief onderhouden wordt.

## I.2. Het grendelmechanisme.

Men neemt aan, dat de verkorting in alle spieren op een gelijke wijze geschiedt, namelijk actief, maar dat de verslapping belemmerd kan worden door een zekere structurering, die tijdens deze verkorting heeft plaats gevonden. De mate van belemmering kan uiteenlopen van alleen vertraging van de verslapping tot absolute vergrendeling van de verkorting. De spier zou zo verkort kunnen blijven zonder groot energieverbruik. Het begrip vergrendeling, *Sperrung* of *catch*, werd aan het begin van deze eeuw ingevoerd door VON UEKKUPELL (1900) met betrekking tot de spiermantel, die de stekels van de zeeëgel ten behoeve van zijn afweer absoluut moet fixeren. De mollusken adductoren en retractoren hebben een overeenkomstige taak bij het gesloten houden van de schelp.

Een zeer belangrijke rol wordt dus toegekend aan de economie, waarmee spieren een verkorting kunnen vasthouden. Tevens heeft men gezocht naar de structurering, die de grendeling mogelijk moet maken.

Daarbij hebben spieren met een uitgesproken draagkarakter, zoals de ABRM, enige opheldering kunnen verschaffen.

### 1.2.1. De economie van de grendeling

De eerste onderzoeker, die zich heeft bezig gehouden met het meten van het zuurstofverbruik tijdens de grendeling, was PARNAS (1910). Het zuurstofverbruik bleek tijdens schaalsluiting niet meetbaar toege-  
nomen. Aan de uitkomst van dit experiment werd echter getwijfeld, daar de gevoeligheid van de meting niet groot bleek (RITCHIE, 1928). Uiteindelijk zijn deze zuurstofmetingen dan ook herhaald aan de geïsoleerde sluitspier van *Anodonta* door BRECHT et al. (1955) onder streng isometrische voorwaarden, waarmee de invloed van de verkorting wegvalt. Prikkeling veroorzaakte spanningstoename en vermeerderde O<sub>2</sub>-opname. Na ophouden van de prikkeling daalt het zuurstofverbruik snel tot de rustwaarde, terwijl de spanning gehandhaafd blijft. De verkorting wordt dus waarschijnlijk zonder groot energieverbruik in stand gehouden na afloop van de contractie. Ook de tetanus van de ABRM blijkt met een energieverbruik gepaard te gaan, hetgeen laag genoemd kan worden ten opzichte van het verbruik in een dwarsgestreepte spier. Een frequentie van 2 Hz veroorzaakt slechts een warmteproductie van 0,1 mcal/gr weefsel, terwijl voor de *musculus sartorius* van *Rana* (dwarsgestreept) een waarde van 2,0 mcal/gr gevonden werd (ABBOTT en LOWY, 1955).

### 1.2.2. De structuur van de ABRM en de betekenis hiervan

De ABRM is opgebouwd uit vezels, die van het ene uiteinde van de spier lopen naar het andere (FLETCHER, 1937 a). Zij zijn 2-3 cm lang en blijken 3-5  $\mu$  dik. Evenals bij de dwarsgestreepte spier bestaat in de ABRM het contractiele apparaat uit 2 soorten discontinue filamenten. In beide soorten spieren is één van de filamenten dun: 50 Å. Het bestaat uit actine. De dunne filamenten zijn waarschijnlijk gehecht aan een *dense body*, dat de plaats schijnt in te nemen van een Z-membraan, zoals deze in de dwarsgestreepte spier voorkomt. Het andere filament is veel dikker dan bij de dwarsgestreepte spier en kan een diameter hebben van wel 1000-1500 Å. De filamenten zijn tienmaal zolang als in de dwarsgestreepte spier (HANSON en LOWY, 1959 a en b). In het dikke filament is een interne structuur zichtbaar, die uit een 145 Å of 750 Å periodieke herhaling van dwarsbanden bestaat. Dit is toe te schrijven aan het aanwezige paramyosine, opgebouwd uit tropomyosine A, een proteïne zonder ATPase-activiteit (HANSON et al., 1957). Behalve het tropomyosine A

is in het dikke filament ook myosine aanwezig. Het dikke filament bestaat uit een paramyosinekern, omgeven door myosine (HANSON en LOWY, 1961, LOWY en HANSON, 1962). In de grendelspiere is minstens zoveel tropomyosine aanwezig als actomyosine (RüEGG, 1961).

I.2.2.1. Het *sliding*-filamentmechanisme. HUXLEY (1956) toonde aan, dat tijdens contractie in de dwarsgestreepte spier dunne actine-langs dikke myosinefilamenten schuiven. De bindingen tussen beide filamenten worden door interactie van actine en myosine verbroken en opnieuw gevormd (HUXLEY, 1957). De spanning wordt gegenereerd en gehandhaafd door middel van de bindingen tussen de filamenten. Men neemt nu aan, dat hetzelfde mechanisme van toepassing is ook in gladde mollusken spieren, waarin eveneens twee soorten filamenten zijn gevonden (LOWY en HANSON, 1962). Terwijl in de dwarsgestreepte spier de verslapping onmiddellijk na ophouden van de prikkeling inzet, doordat de gevormde bindingen snel verbroken worden, is de verbrekingssnelheid van deze bindingen in de grendelspiere gering, zodat ze langzaam verslappen (LOWY en MILLMAN, 1963).

I.2.2.2. De betekenis van het paramyosine. Het paramyosine blijkt een grote pH-gevoeligheid te bezitten in fysiologisch gebied. Het kristalliseert bij pH 6,4 (ionsterkte 0,05). De isotonische verkorting van zogenaamde glycerinepreparaten (dit zijn dunne bundels vezels, geprepareerd van met glycerine geëxtraheerde spieren, GMF) blijkt geremd te worden door pH-waarden en bij ionsterkten, waarbij het tropomyosine kristalliseert (JOHNSON et al., 1959). De isometrische spanning wordt minder door de pH beïnvloed; de snelheid van spanningsontwikkeling echter wel. Een meer elegante methode om dit aan te tonen werd uitgewerkt door RüEGG (1961; RüEGG et al., 1963). Hij slaagde erin de actomyosine-ATPase, de motor van de spanningsontwikkeling, te inactiveren met zogenaamde interactieremmers. Dit zijn stoffen, die het actomyosine dissociëren. De eenmaal door ATP ontwikkelde spanning in glycerinepreparaten blijft gehandhaafd (spanningsrest), ondanks de inactivering van het actomyosine. Voor parameters zoals de pH, de temperatuur en de verhouding tussen de concentratie MgATP-chelaat en de concentratie niet-gebonden ATP, die de oplosbaarheid van het paramyosine beïnvloeden, blijkt na inactivering van de actomyosine-ATPase eenzelfde invloed te bestaan op deze spanningsrest als op geprepareerde tropomyosinedraden. Wanneer de spier wordt gebracht in zeewater onder een CO<sub>2</sub>-druk van 100 mm kwik, manifesteert zich deze grendeling eveneens in een hoge weerstand tegen rek (RüEGG en WEBER,

1963). CO<sub>2</sub> beïnvloedt, naar de auteurs aannemen, de zuurgraad in de spiervezels. Deze hoge weerstand tegen rek, tengevolge van CO<sub>2</sub>, ver- toont de spier zelfs in rusttoestand. De weerstand verdwijnt, wanneer de spier met 5-HT (5-hydroxytryptamine, serotonine, een zogenaamde *relaxant* die, zoals TWAROG (1954) het eerst vaststelde, de ABRM doet verslappen) wordt behandeld. De door CO<sub>2</sub> toegenomen grendeling is ook aantoonbaar in de afgenomen verkortingsnelheid van de spieren (RÜEGG, 1964). Voordat het paramyosine door BAILEY (1942) werd ont- dekt, beschreven reeds POSTMA en KIPP dergelijke grendeffecten aan de slakkevoet en de zeeanemoon. Tijdens rekking van de slakkevoet treedt grendeling op. Prikkeling van de voet veroorzaakte een trage samentrekking, die ook in haar amplitude beperkt wordt. Deze traag- heid blijkt verdwenen, wanneer de voet vervolgens na een prikkeling van geringere intensiteit opnieuw tot contractie wordt gebracht (POST- MA, 1934). KIPP (1939) beschrijft hetzelfde van de zeeanemoon. Uit deze verschijnselen kan de conclusie worden getrokken, dat de toestand, waarin het paramyosine zich bevindt, van zeer grote invloed is op het handhaven van de spanning en tevens, dat de actieve elementen geen rol zouden spelen in de grendeling, zoals in de contractie. De toestand van het paramyosine kan blijkbaar ook zonder verandering van het CO<sub>2</sub>- gehalte in het milieu gewijzigd worden.

1.2.2.3. Spanningsrest en '*active-state*'. Als men de spier, tijdens iso- metrische contractie met ACh (acetylcholine), dat een verkorting met een langzame verslapping bewerkstelligt, toestaat zich te verkorten (*quick-release*), dan zakt de spanning onmiddellijk naar nul, om kort daarna weer te stijgen tot bijna de oorspronkelijke waarde (*recovery- spanning*). De grootte van de *recovery*spanning is volgens RITCHIE (1954) een mechanische maat voor de in de spier aanwezige bereidheid om actief te genereren. De mate, waarin de spieren deze *recovery- spanning* nog kunnen ontwikkelen, is uiting van de '*active-state*', waarin de spieren zich bevinden.

Experimenten van JEWELL (1959) en JOHNSON en TWAROG (1960) laten zien, dat de spanning tijdens prikkeling met ACh actief gevormd wordt. Vindt het *quick-release* echter plaats na prikkeling, wanneer de spier in toestand van grendeling verkeert, dan volgt er slechts een ge- ringe herontwikkeling van de spanning. Als het *quick-release* meer dan 5% van de spierlengte bedraagt, is er van spanningsontwikkeling geen sprake meer. Daarmee wordt dus bewezen, dat er tijdens grendeling na afloop van de contractie geen '*active-state*' aanwezig is, en dat hoge rekweerstand slechts gedeeltelijk actief tot stand komt. Helaas laten

de proeven niet zien, of er een invloed van de grendeling tijdens 'active-state' aanwezig is.

I.2.2.4. In- en uitschakeling van de grendeling. De ABRM geeft op a.c. (*alternating current* = wisselstroom) een contractie met een snelle verslapping en op d.c. (*direct current* = gelijkstroom) een contractie met een langzame verslapping (WINTON, 1937). De contractie met a.c. is duidelijk een tetanus. Met d.c. ontstaat een contractuur, dat wil zeggen een contractie, die door een lokaal werkzame prikkel tot stand komt en reversibel is. Een contractuur zou langer duren dan een *twitch* (GASSER, 1930). Zelfs de *twitch* van de ABRM vertoont onloochenbaar een spanningsrest, zodat het laatste gedeelte in deze definitie op de contracturen van de ABRM uiteraard niet van toepassing is. De tetanus vermoeit snel; de contractuur vermoeit nauwelijks. In dit geval zijn aan één spier het tetanisch principe en het grendelmechanisme duidelijk waartenemen. Met a.c. kan men een vergrendelde spier ontgrendelen. Een aanvulling op de reeds bekende stimuli werd verkregen door TWAROG (1954). ACh en KCl veroorzaken eveneens een contractuur, welke na uitwassen met zeewater gehandhaafd blijft. Bovendien werd waargenomen, dat 5-HT een effect op de grendeling heeft, dat vergelijkbaar is met dat van a.c. 5-HT versnelt de verslapping vanuit de isotonisch geregistreerde verkortingsrest. De met 5-HT behandelde spier blijft antwoorden op ACh, KCl, a.c. en d.c., maar de contractie of contractuur verslapt snel.

De grendeling wordt dus veroorzaakt door d.c., ACh, KCl en pH-daling in de vezels. De spier wordt ontgrendeld door a.c., r.a.c. (*rectangular current* = pulserende gelijkstroom, vergelijkbaar met a.c.) en 5-HT. Waarom reageert de spier op de verschillende stimuli niet gelijk? Volgens LOWY en HANSON (1962) en LOWY en MILLMAN (1963) wordt de verbrekingsnelheid van de bindingen tussen de dunne en dikke filamenten gecontroleerd door een zogenaamde *relaxant* (5-HT). Door r.a.c. zou deze *relaxant* vrijgemaakt worden, door d.c. of ACh niet. Deze specifieke prikkeling, die ontgrendeling veroorzaakt, is het eerst door PAVLOV (1885) met betrekking tot de adductor van *Anodonta* gevonden. VAN NIEUWENHOVEN (1947) bereikte bij de ABRM ontgrendeling, door prikkeling van het ganglion pedale, hetgeen bevestigd is door TAKAHASHI (1960). Een overeenkomstig effect is bij de voet van *Helix* waargenomen, vooral met prikkels, die nog subliminaal zijn voor de contractiele activiteit; het trad op bij prikkeling van het pedaalganglion en bij die van de zenuwen, die van dit ganglion naar de voet verlopen (JORDAN en POSTMA, 1941), alsmede bij prikkeling van de voet (met

zenuwnet) zelf (POSTMA en DE JONG, 1946). A.c. zou dus volgens LOWY et al. *relaxant* vrijmaken, doordat de zenuwen, die van het pedaalganglion naar de ABRM verlopen, impulsen afgeven, terwijl d.c. dit gevolg niet zou hebben. Het is echter niet in te zien waarom dit zo is, terwijl tevens de wijze waarop 5-HT werkt, nog onduidelijk is. Van de andere kant lijkt inschakeling van de grendeling door CO<sub>2</sub> niet zozeer het gevolg van prikkeling van het pedaalganglion, dan wel een mogelijkheid, die kan dienen ter illustratie van bepaalde paramyosine-effecten. Daar r.a.c. en ACh meer passende prikkels voor de spier zijn, lijkt het gewenst na te gaan, hoe de grootte van de grendeling aan dit soort prikkels gekoppeld is.

### 1.3. De *excitation-contraction coupling*

Uit het werk van HEILBRUNN en WIERCINSKY (1947) en NIEDERGERKE (1955) is gebleken, dat Ca een belangrijke rol speelt in de koppeling tussen membraan en contractiele machinerie. Deze onderzoekers injecteerden Ca in lage concentratie in skelet- en hartspiervezels en zagen, dat er een verkorting optrad. Ook bij glycerinepreparaten van dwarsgestreepte spieren werd gevonden, dat Ca contractie induceerde (MARSH, 1952; BENDALL, 1953). Als werkhypothese werd voorgesteld, dat een actiepotentiaal (A.P.) via depolarisatie van het sarcolemma het binnentreden van Ca in de vezel bevorderde, en dat Ca de processen, die leiden tot contractie, in werking zet (SANDOW, 1965). Deze hypothese werd ondersteund door HODGKIN en KEYNES (1957), die aantoonde, dat elke A.P. in reuzeaxonen van *Loligo* vergezeld ging van een influx van Ca. BIANCHI en SHANES (1959) bewezen hetzelfde voor de kikker-skeletspier. Reeds HILL (1948, 1949) berekende echter, dat de tijd, die verloopt tussen actiestroom en het begin van het mechanisch antwoord zo kort is, dat Ca de relatief lange weg, van de membraan naar de contractiele machinerie, niet via eenvoudige diffusie zou kunnen afleggen. Door zeer verfijnde experimenten konden HUXLEY en TAYLOR (1958) bewijzen, dat de Z-membraan is ingeschakeld in de koppeling. Door een aantal onderzoekers: BENNETT en PORTER (1953), PORTER en PALADE (1957), HUXLEY en TAYLOR (1958), werd daarom voorgesteld, dat het sarcoplasmatisch reticulum (s.r.) de weg zou zijn, waarlangs de prikkeling van het sarcolemma in het binnenste van de spiervezels wordt voortgeleid. Recent is van het s.r. gebleken, dat het actief Ca kan accumuleren in vesikels en tubuli (HASSELBACH en MAKINOSE, 1963). Minder bewijs is tot nu toe voorhanden betreffende het vrijmaken



van Ca uit het s.r. Het is echter wel bekend dat, wanneer men de duur van de A.P. verlengt door middel van zink- of nitraationen, men een snellere spanningsontwikkeling en een grotere *twitch*spanning (SANDOW en PREISER, 1964) kan constateren. Dit zou dan het gevolg zijn van een toegenomen vrijmaken van het Ca uit het s.r. Enige japanse onderzoekers verkregen op elektrische prikkeling van een vesikelsuspensie - waardoor Ca wordt vrijgemaakt - zelfs *syneresis* van myofibrillen (LEE et al., 1965).

Uit deze veronderstellingen en experimenten wordt het volgende beeld van de koppeling verkregen. In de rustende spier is het Ca sterk geconcentreerd in het s.r. De concentratie geïoniseerd Ca, in de nabijheid van het actomyosine, is te laag om contractie te veroorzaken. Als de spier wordt geprikkeld, wordt een hoeveelheid Ca (niet bekend in welke verhouding tot de A.P.) vanuit het s.r. vrijgemaakt. Ca veroorzaakt de contractie door de actomyosine-ATPase te activeren. Als de prikkeling is afgelopen, houdt het vrijmaken van Ca op en wordt het gedissocieerde Ca teruggepompt in het s.r. Daaropvolgend herstelt althans in de dwarsgestreepte spier het actomyosine de verslachte toestand. Bij de grendelspijeren kan de spanning echter nog aanwezig blijven. Uit deze beschouwing blijkt, dat de mate waarin het s.r. het Ca wegpompt, een belangrijke rol zal spelen in de snelheid van de verslapping. De hoeveelheid s.r., die in de onderscheiden spieren aanwezig is, zal daarbij van belang zijn. Hiermede zijn de mogelijkheden gegeven, om de lange duur van de verslapping te verklaren. De grendelspijeren bezitten slechts een geringe hoeveelheid s.r. (HANSON en LOWY, 1961) en de mogelijkheid, dat de langzame verslapping hieraan geweten moet worden, zou reëel zijn, ware het niet, dat de grendeling juist niet op activiteit gebaseerd is. Wel staat het echter te bezien, of Ca dezelfde koppelende werking vervult in deze gladde spieren als in de dwarsgestreepte spier.

#### I.4. Probleemstelling en programma

Zoals werd uiteengezet, wordt de mechanische activiteit in dwarsgestreepte spieren door Ca gekoppeld aan de membraanfuncties. Het leek alleszins de moeite waard na te gaan, of ook in de ABRM aan het Ca een koppelende werking toegeschreven moet worden en dit niet alleen met betrekking tot de contractiele activiteit, maar ook ten aanzien van de grendeling en ontgrendeling.

Nadat het mechanisch antwoord van de spier op verschillende stimuleringsstimulusvariaties is nagegaan (hfdst. III), wordt in hoofdstuk IV de

rol van Ca in de koppeling onderzocht. Zoals in 1.2. werd gesteld, zou de grendeling het gevolg zijn van het ontstaan van een zekere structurering tijdens de contractie. In hoofdstuk V wordt daarom nagegaan, of er een samenhang bestaat tussen contractiele activiteit en de uit de contractie voortvloeiende spanningsrest van met glycerine geëxtraheerde vezelbundels (GMF) van de ABRM. De invloed van een eventueel optredende grendeling op de spanningsontwikkeling is het onderwerp van hoofdstuk VI. Tenslotte komen de werking van enkele verslappingsprikels, de precontractiele verslapping (hfdst. VII) en de invloed van het Ca-gehalte van het zeewater op het mechanisch antwoord van de spier (hfdst. VIII) aan de orde. Een beschrijving van de methoden, die gebruikt werden in de experimenten, gaat aan het geheel vooraf (hfdst. II).



## HOOFDSTUK II

### MATERIAAL EN ALGEMENE METHODEN

#### II.1. Materiaal en preparatie

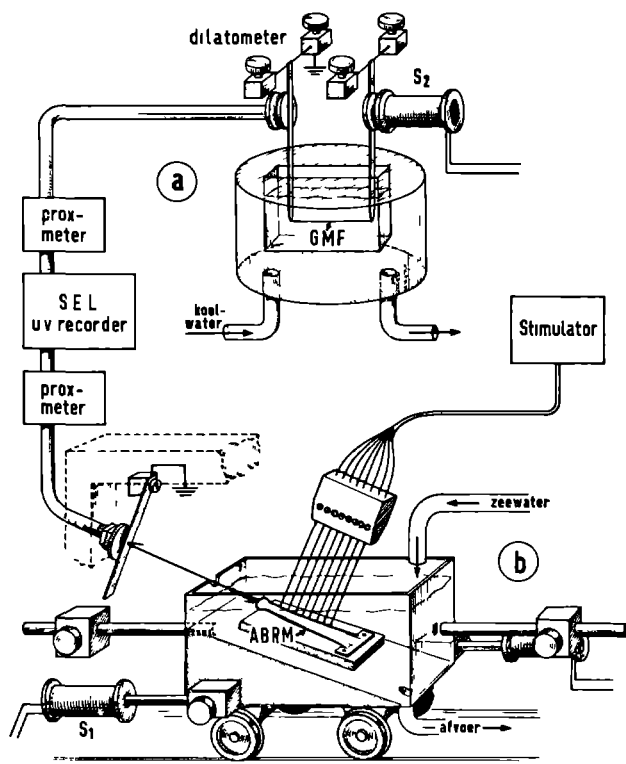
Mossels (*Mytilus edulis*) werden verkregen uit Yerseke en bewaard in een open stenen bak met gefiltreerd en geëereerd zeewater. Het dier werd geopend met het doorsnijden van de adductorspieren. De voet en de zachte organen werden verwijderd. Een byssus-retractor werd vrijgeprepareerd, waarbij de verbinding tussen spier en byssusdraden intact werd gelaten. Bij de oorsprong van de spier werd een stuk schaal losgemaakt, dat werd voorzien van twee gaatjes (JEWELL, 1959). Een aluminiumdraad werd vastgelijmd aan de byssusdraden met in chloroform opgelost perspex. Het klepdeel werd vastgemaakt op een perspexplaatje en dit werd in een kamer, waarin het milieu kon worden gevarieerd, vastgeschroefd. Vervolgens werd de spier ongeveer één à anderhalf uur voor het experiment gesuspenderd in geëereerd zeewater bij kamertemperatuur 19-25<sup>o</sup>, gemiddeld 22<sup>o</sup>C. De belasting bedroeg dan 10 gram.

Glycerinepreparaten (GMF). De vrijgeprepareerde spieren werden in situ ongeveer 4 uur bij 4<sup>o</sup>C onder omroeren van de vloeistof met de volgende oplossing geëxtraheerd (RüEGG en WEBER, 1963): 1 deel glycerine en 1 deel water met 0,1 M KCl, 0,02 M histidine pH 7,0, 0,003 M MgCl<sub>2</sub>, en 0,004 M EDTA (aethyleendiaminotetraäcetaat). Daarna werden de spieren van byssus en schaal losgesneden en nogmaals circa 6 uur geëxtraheerd in verse oplossing van de bovenstaande samenstelling. GMF van ongeveer 0,3 mm dikte werden in 90% glycerine bij -20<sup>o</sup>C bewaard tot kort voor het experiment. In het experiment werden GMF van 50-90  $\mu$  diameter gebruikt.

#### II.2. Apparatuur en registratie

Voor het begin van een experiment werd de aluminiumdraad, welke vastzit aan het byssale einde van de spier, bevestigd aan een bladveer, die geaard werd. De bladveer en een electrode van een *proximity*meter

zijn evenwijdig aan elkaar ingebouwd in een aluminium arm (fig.1b). De afstand tussen beide condensatorplaten bedroeg 1 mm. Voor meting werd een FIELDEN *proximity*meter gebruikt van het type PM 4 A. Registratie geschiedde via een d.c.-versterker op een S.E.L. U.V.-galvanometer-*recorder* SE 2000. Galvanometertype A300. Op de meest gevoelige stand van de versterker kunnen nog enige milligrammen spanning worden waargenomen. Isotonische registraties worden gemaakt met een Kippschrijver op een beroete trommel (KIPP, 1939).



Figuur 1  
 Meet- en *quick-release*-apparaat voor a) de GMF en b) de ABRM.  
 Nadere verklaring zie tekst.

Een isometrische registratiemethode werd ook gebruikt om de spanning van GMF te meten. De dilatometer volgens WEBER (1951) werd zodanig omgebouwd, dat op de hefboom, die vastzit aan de torsiedraad, een condensatorplaatje is aangebracht, dat tegenover de electrode van de *proximity*meter is opgesteld, zodat de meting capacitatief kan ge-

schieden (zie fig. 1a).

*Release* met constante snelheid werd, wat betreft de spier, gedaan met behulp van dezelfde meet- en registratietechnieken, die in het voorgaande werden beschreven. De spier kon zich tijdens *release* verkorten, doordat de milieukamer (op wielen) snel verplaatst werd in de lengterichting van de spier. De verkorting bedroeg ca. 2 mm. De snelheid van het *release* kon worden geregeld door middel van de stroom, die door een spoel ( $s_1$ ) werd geleid, welke een aan de milieukamer bevestigde spil naar binnen trok (fig. 1b). *Releasesnelheid* in deze experimenten: 2 cm/sec. Het tijdstip, waarop het *release* plaats vond na het begin van de prikkeling, is vermeld bij de experimenten.

Voor *release-recovery* experimenten met GMF werd de andere hefboom, die deel uitmaakt van de dilatometer, voorzien van een plaatje, dat door een ijzerkern in een spoel ( $s_2$ ) werd aangetrokken, wanneer daar stroom doorheen werd geleid. Bij gesloten stroomcircuit werd de GMF tussen beide hefboompjes gelijkmd. Wanneer de GMF tot contractie was gebracht, werd de stroom verbroken en kon de GMF zich verkorten. *Releasesnelheid*: 2,5 cm/sec.

### II.3. Prikkeling

Prikkeling van de spier geschiedde via een multiëlectrode, voorzien van 8 platina electroden, die langs de gehele lengte van de spier werden geplaatst. Een pulserende gelijkstroom van variabele duur, voltage en frequentie (r.a.c.) werd uit een SD 5 GRASS stimulator verkregen, welke ook d.c. afgeeft. (Afleiden van actiepotentialen (A.P.) geschiedde met dezelfde multiëlectrode, nu voorzien van 8 gechlloreerde zilverdraden, rechtstreeks op een TEKTRONIX oscilloscoop type 502). Het is niet mogelijk de spier elektrisch te prikkelen, zonder het zeewater eerst te laten weglopen. Daartoe is de kamer onder een hoek van  $45^\circ$  stevig aan de aluminium arm bevestigd om het leegstromen te bevorderen. 5-HT (10 mgr/ml) ( $10^{-3}$  gr/ml =  $2,5 \times 10^{-3}$  M) en ACh (50 mgr/ml) ( $10^{-3}$  gr/ml =  $1,3 \times 10^{-2}$  M) werden opgelost in gedestilleerd water en bewaard in een koelkast. Voor gebruik werden de stoffen verdund met zeewater tot de gewenste concentratie. ACh en KCl werden gedurende 30 sec. toegediend aan de spier door de gehele kamer (ongeveer 30 ml te vullen. De prikkeling werd beëindigd door de ACh of KCl weg te laten lopen en de spier te wassen met 2 volumens zeewater. In het algemeen werd gedurende het experiment de spier na iedere contractie een rust gegund van 5 à 10 minuten.



## II.4. Milieu

Alle experimenten met spieren werden gedaan in kunstmatig zeewater, waarvan de samenstelling als volgt was: 0,38 M NaCl, 0,008 M KCl, 0,024 M MgCl<sub>2</sub>, 0,025 M MgSO<sub>4</sub>, 0,003 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,006 M CaCl<sub>2</sub> en 1<sup>o</sup>/oo glucose (CAMBRIDGE et al., 1959). De concentraties van de stoffen werden echter ontleend aan ENTROP (1956), maar verminderd met tien procent. Het soortelijk gewicht van dit zeewater bedroeg 1,023 bij 15°C. Er werd geen verschil tussen het gedrag van de spier geconstateerd in dit kunstmatig zeewater en natuurlijk zeewater. Voor variaties in het gehalte Ca- en K-zouten werd de osmolariteit van het zeewater constant gehouden. Toeneming van Ca of K ging ten koste van het Na-gehalte en omgekeerd.

GMF hebben ATP en geïoniseerd Ca nodig om tot contractie te komen. De oplossingen met ATP werden door toevoegen van 0,1 M KCl op een ionsterkte van 0,13 $\mu$  gebracht (totaal 6 ml). De pH werd met histidine op 7,0 gehandhaafd. Behoudens in één experiment, werd de concentratie geïoniseerd Ca bepaald door de verhouding tussen de concentratie Ca<sub>tot.</sub> en die van de buffer EDTA. De samenstelling van de oplossingen is, waar nodig, vermeld bij de experimenten. De concentraties van de verschillende componenten werden berekend volgens het systeem van BRIGGS en FUCHS (1964).

## II.5. ATPase-activiteit

De ATPase-activiteit werd bepaald door van brokstukken ABRM-GMF (10 mgr) de fosfaatafsplitsing per mgr eiwit bij kamertemperatuur na te gaan. Daartoe werden brokstukken GMF in dezelfde oplossingen (totaal 6 ml) gebracht als die, welke gebruikt werden om de GMF tot contractie te brengen (zie tabel III). De ATPase-reactie werd gestopt met trichloorazijnzuur. Van één ml reactiemengsel werd na verwijderen van het eiwit het trichloorazijnzuur geneutraliseerd met histidine en het fosfaatgehalte bepaald volgens WAHLER en WOLLENBERG (1958). Het natriumfosfomolybdaatcomplex werd echter naar BERENBLUM en CHAIN (1938) met isobutanol geëxtraheerd, in plaats van met isopropylacetaat, zoals WAHLER en WOLLENBERG voorschrijven. De extinctie van het met tinchloride gereduceerde natriumfosfomolybdaatcomplex werd gemeten met een KIPP colorimeter bij 720 m $\mu$ . Eiwit werd bepaald met micro-Kjehldahl. De in GMF aanwezige grote hoeveelheid paramyosine, dat geen ATPase-activiteit bezit, wordt op deze wijze meebepaald. In feite meet men dus niet de fosfaatafsplitsing per mgr

actomyosine, doch per mgr vezeleiwit. Een correctie is echter vooralsnog niet aan te brengen.

## II.6. Verwerking van de geregistreerde opnamen

Het spanningsverval na contractie werd bepaald, door de verhouding tussen de spanning  $P$  na constante tijd en de piekspanning  $P_0$  te meten. De piekspanning  $P_0$  is de maximale spanning, die op een bepaalde gedefinieerde prikkel ontstaat. Deze definitie van  $P_0$  wijkt af van die, welke door LOWY en MILLMAN (1963) wordt gebruikt. De definitie van de  $L_0$  (rustlengte) is wel van deze auteurs overgenomen. De  $L_0$  wordt bepaald door de minimumlengte van de spier, waarbij rustspanning kan worden waargenomen. Met de boven gegeven definitie kan men alle spanningsvervalcurven definiëren, omdat het spanningsverval exponentieel verloopt. ABBOTT en LOWY (1956) gebruikten ook wel de halfwaarde tijd om het verloop te karakteriseren, terwijl voor dit doel soms eveneens de verslappingsconstante wordt gehanteerd (JOHNSON, 1965). Het is duidelijk, dat al deze parameters samenhangen. Het verband uitgedrukt in een formule luidt:

$$P = P_0 \times 10^{-kt}$$

waarin  $P$  de spanning op tijdstip  $t$ ,  $P_0$  de piekspanning en  $k$  de verslappingsconstante voorstellen. Omvormen van de formule leidt tot:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-kt}$$

Wanneer de tijd nu constant gehouden wordt, b.v. op 30 sec., varieert  $\log P/P_0$  omgekeerd evenredig met  $k$ . Als  $t$  de halfwaarde tijd voorstelt dan is  $P/P_0 = 0,50 = 10^{-kt \frac{1}{2}}$ , dus  $t \frac{1}{2} = \frac{0,3010}{k}$ .

Bij zeer langdurige spanningsdalingen is  $P/P_0$  te prefereren boven  $t \frac{1}{2}$ , omdat  $t \frac{1}{2}$  dan niet wordt bereikt. Daar wij zowel met langdurige als kortstondige spanningsdalingen te doen hebben, wordt  $P/P_0$  consequent als maat voor het spanningsverval gebruikt. Voor het gemak wordt  $P/P_0$  met 100 vermenigvuldigd, zodat  $P/P_0$  in % kan worden uitgedrukt. Als de spanningsdaling na 30 sec. nog 100 % is, dan betekent dat, dat er geen verslapping is opgetreden, en als deze waarde 0% was, dat de verslapping volledig was.

## II.7. Statistische aspecten

Een statistische benadering van de verkregen gegevens is met spieren als de ABRM zonder meer een groot probleem, vanwege de grote variabiliteit van de spieren onderling. Bruikbaar zijn alleen toetsen, waarin gepaarde waarnemingen met elkaar vergeleken kunnen worden. Eendergelijke bruikbare toets is de t-toets van STUDENT. Daarmee wordt de nulhypothese getoetst, dat n.l. de verschillen tussen overeenkomstige gepaarde waarnemingen als gemiddelde de waarde 0 hebben. Deze toets is bruikbaar, wanneer de verschillen normaal verdeeld zijn met dezelfde spreiding. Door deze beperking is het niet verantwoord deze toets toe te passen en zal men moeten omzien naar een verdelingsvrije toets. Een dergelijke toets is de symmetrietoets van WILCOXON, waarmee de hypothese getoetst wordt, dat n.l. de waarnemingen uit een bepaalde reeks gepaarde metingen symmetrisch verdeeld zijn ten opzichte van 0. Ook verschillen uit twee reeksen waarnemingen zijn op deze wijze te behandelen (VAN ELTEREN en VERBEEK, 1960). Op deze wijze is in dit werk enige malen van deze toets gebruik gemaakt, om waarnemingen aan één spier te toetsen.

## HOOFDSTUK III

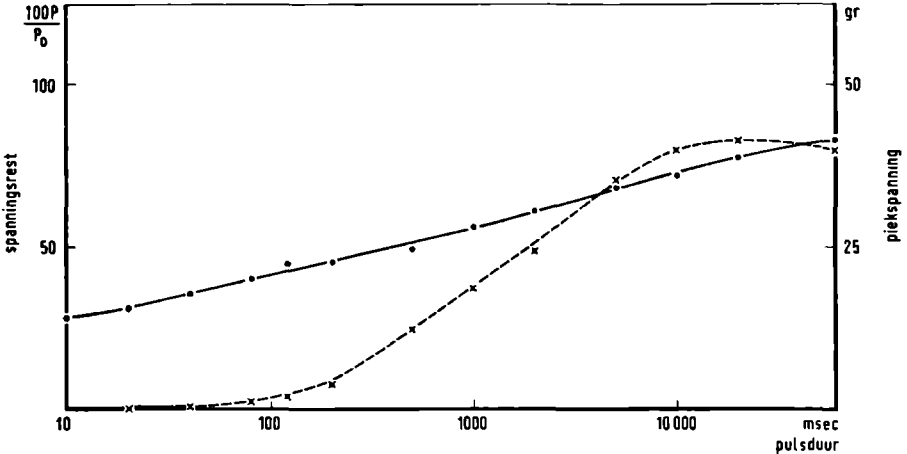
### PIEKSPANNING EN SPANNINGSREST

De grendeling zou het gevolg zijn van gebeurtenissen, die tijdens de contractie plaats vinden (1.2., zie ook VI.5.). Het gevolg van een prikkel, de koppeling buiten beschouwing gelaten, is een contractie. De contractie kan gekarakteriseerd worden door de maximale spanning, die op één bepaalde gedefinieerde prikkel ontstaat, de  $P_0$  of de piekspanning. Nu is de vraag, die wij ons moeten stellen: hangt de op een contractie volgende spanningsrest samen met  $P_0$ ?  $P_0$  wordt als indicatie gebruikt voor de in de contractie optredende gebeurtenissen, die de grendeling veroorzaken. Een opmerking van HOYLE en LOWY (1956) doet vermoeden, dat de piekspanning en de spanningsrest nogal gecompliceerd samenhangen. Deze opmerking luidt: '*It was found that a direct-current voltage of only 1 or 2 V applied for 3-4 sec. is usually adequate to produce complete contraction of the muscle. Further stimulation adds nothing to the height, although it frequently increases the subsequent duration of the contraction*' (pag. 298). Door op eenvoudige wijze  $P_0$  te variëren (verandering van de pulsduur, de concentratie ACh of KCl), moet het nu mogelijk zijn een indruk te verkrijgen van de samenhang tussen piekspanning en spanningsrest. Bovendien blijkt ook de frequentie in de tetanus een rol te spelen in de grootte van  $P_0$ .

#### III.1. De *twitch*

Op één enkele puls ontstaat een contractie, die een *twitch* genoemd wordt. De grootte van de piekspanning is bij de ABRM afhankelijk van de gebruikte pulsduur. Belangrijk is uiteraard ook de stimulussterkte, welke doorgaans op 8 V wordt gehandhaafd. Alle variaties van de pulsduur, van 10 msec. tot 60 sec., worden aan één spier getest. De pulsduur wordt opgevoerd van lagere naar hogere waarden, waarbij de lange pulsen in feite d.c. van een bepaalde tijdsduur zijn. Pulsduurverlenging blijkt een S-vormig verband tussen piekspanning en pulsduur tot gevolg te hebben, terwijl de spanningsrest na 30 sec., uitgedrukt in  $100 P/P_0$ , bijna evenredig aan de logaritme van de pulsduur toeneemt

(zie fig. 2, waarin de weergegeven waarden gemiddelden zijn van 13 spieren). De piekspanning en de spanningsrest blijken niet gelijkvormig met de pulsduur toe te nemen, vooral niet bij zeer lange pulsen. Hier blijkt dus de geciteerde opmerking van HOYLE en LOWY op te gaan. Het langer voortduren van de prikkeling komt niet tot uiting in een stijging van de piekspanning, doch doet de spanningsrest in grootte toenemen.



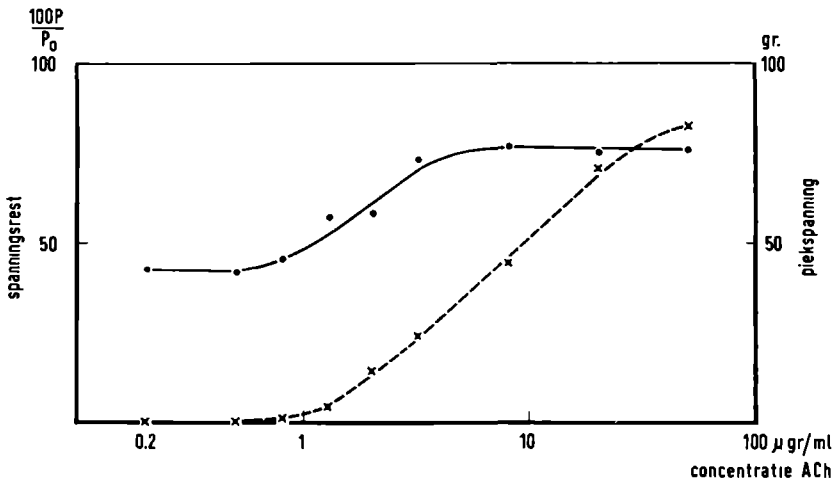
Figuur 2

De piekspanning en de spanningsrest als functie van de pulsduur.  
 Piekspanning: x-----x, spanningsrest: ●——●. Milieu: normaal zeewater.

### III.2. De contractuur met ACh

Een andere methode om  $P_0$  te variëren is, met verschillende concentraties ACh een contractuur op te wekken, hetgeen uitloopt op een zogenaamde dosis-effectcurve. Deze is met ACh van de ABRM bekend uit het onderzoek van CAMBRIDGE et al. (1959). Het verband tussen concentratie ACh en spanning komt hierin tot uitdrukking. Het spanningsverloop, ten gevolge van toedienen van verschillende concentraties ACh, is door ons opnieuw gemeten, met inbegrip van de spanningsrest (fig. 3). Alle concentraties ACh werden bij een spier toegepast. Eerst werden de lage concentraties van 0,2 tot 0,8  $\mu$ gr/ml gegeven; daarna de hoge concentraties in een verdunningsreeks, vanaf 50,0  $\mu$ gr/ml omlaag tot 3,2  $\mu$ gr/ml. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden van 8 spieren.

Voor de piekspanning werd dezelfde kromme gevonden als welke CAMBRIDGE et al. verkregen; een S-vormige toeneming van de piekspanning. Opmerkelijk is het verloop van de spanningsrest met de concentratie ACh. De kromme is wel S-vormig, doch bereikt reeds haar maximum bij  $3,2\mu\text{ gr/ml}$ , terwijl de piekspanning slechts tot circa  $1/3$  van de waarde bij  $50,0\mu\text{ gr/ml}$  gestegen is. Met hoge concentraties ACh verkrijgt men het tegenovergestelde van het resultaat met lange pulsen. Ondanks de toeneming in concentratie ACh, vermeerderde de spanningsrest nauwelijks, terwijl de piekspanning voortgaat te stijgen. Bespreking van dit resultaat vindt later in dit hoofdstuk plaats, nadat de KCl-contractuur behandeld is (III.4.).



Figuur 3

De piekspanning en de spanningsrest als functie van de concentratie ACh. Piekspanning: x-----x, spanningsrest: ●——●. Milieu: normaal zeewater.

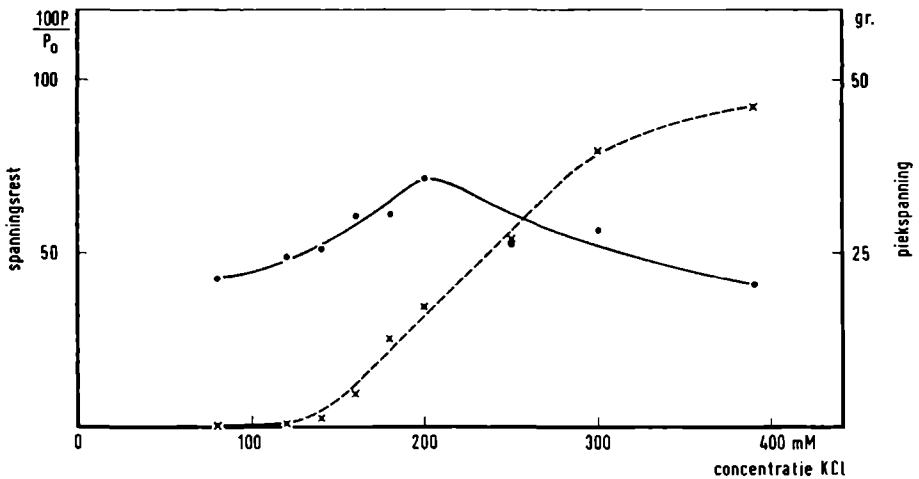
### III.3. De contractuur met KCl

Evenals alle andere spieren, wordt de ABRM door KCl gedepolariseerd, hetgeen een contractuur oplevert met een grote spanningsrest (TWAROG, 1954). Voor zover bekend, is er met KCl nooit onderzocht, hoe de spanningsrest bij de ABRM samenhangt met de opgewekte piekspanning. De verschillende concentraties KCl werden in de volgorde 80 mM naar 391 mM aan één spier getest. Het gehalte van KCl en NaCl werd in het kunstmatig zeewater gewijzigd, zoals tabel I laat zien.



T a b e l I  
HET GEHALTE VAN KCl EN NaCl IN ZEEWATER  
MET EEN HOGE K-CONCENTRATIE

KCl in mM	8	80	120	140	160	180	200	250	300	391
NaCl in mM	383	311	271	251	231	211	191	141	91	0
		norm zeew.								



Figuur 4

De piekspanning en spanningsrest als functie van de concentratie KCl (zie tabel I).  
Piekspanning: x-----x, spanningsrest: ●——●.

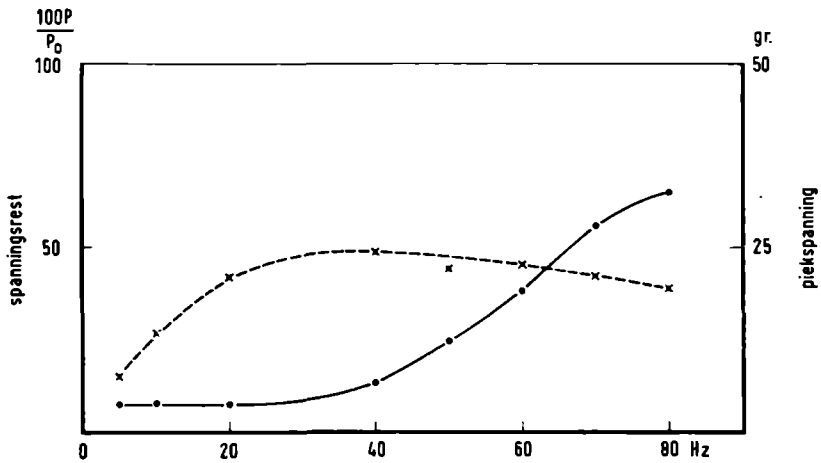
De piekspanning neemt bij stijgende concentratie KCl S-vormig toe (fig. 4) volgens een curve, die zeer gelijk op de dosis-effectkromme, zoals deze met ACh wordt verkregen. De gemiddelde waarden van 6 spieren zijn weergegeven. De spanningsrest neemt tot 200 mM KCl gelijkvormig met de piekspanning toe, maar daarna treedt er een verrassende daling van de spanningsrest op. De spanningsrest is met 391 mM KCl weer even groot als met 80 mM KCl, de eerste concentratie, die toegepast werd. Met hogere concentraties KCl blijken de krommen van piekspanning en spanningsrest dus evenmin gelijkvormig te verlopen.

### III.4. De betekenis van de S-vormige spanningscurve bij spieren

De S-vormige dosis-effectkromme (piekspanning) wordt dus ook bij de ABRM gevonden, zowel met ACh als met KCl. Behalve aan de ABRM, zijn deze curven reeds vele malen waargenomen. Aan de hand van twee illustratieve voorbeelden wordt nu nagegaan wat deze curve te betekenen heeft. Het verband tussen membraanpotentiaal of concentratie KCl enerzijds en de spanning anderzijds bij de dwarsgestreepte teenspier van *Rana* is bekend als een S-vormige kromme (FOULKES en PERRY, 1965). Een dergelijk resultaat verkreeg ook HINKE (1965) met een ring, geprepareerd uit rattearterie, die tot contractie gebracht wordt met noradrenaline respectievelijk KCl. Door de contractie van de ring wordt de snelheid van de doorstromende vloeistof verminderd. Laat men echter bij één bepaalde concentratie KCl (50 mM) het Ca-gehalte van 0 tot 2 mM in het milieu stijgen, dan ziet men een afnemende in de stroomsnelheid ontstaan, die S-vormig samenhangt met de concentratie Ca (HINKE, 1965). PORTZEHL et al. (1965) hebben het universeel karakter van deze dosis-effectcurve aan het licht gebracht. Deze auteurs vonden een S-vormige toeneming in de spanning van één enkele pootspiervezel van *Maia squinado* door injectie in de vezel van Ca-buffers met een stijgende concentratie geïoniseerd Ca. Bovendien werd aangetoond, dat de spanning van een glycerinepreparaat, de superprecipitatie en de ATPase-activiteit alle in een gelijk S-vormig verband toenemen met de concentratie geïoniseerd Ca. Dit zou erop wijzen, dat KCl, ACh of elektrische depolarisatie van het membraan, Ca vrijmaakt uit het s.r., terwijl het Ca op zijn beurt de spanning opwekt door de actomyosine-ATPase te activeren. De S-vormige kromme moet dus worden toegeschreven aan de interactie van het Ca met het actomyosine. Wanneer de grendeling nu een gevolg zou zijn van gebeurtenissen tijdens de samentrekking, zou de spanningsrest een samenhang moeten vertonen met de activiteit tijdens de contractie. De gevonden resultaten bewijzen tot op zekere hoogte, dat een dergelijk verband inderdaad bestaat, maar laten tevens zien, dat de krommen van piekspanning en spanningsrest slechts ten dele gelijkvormig zijn. Alvorens nu nader op het koppellende karakter van Ca in te gaan, willen we eerst onderzoeken of ook de frequentie in een tetanus een soortgelijke invloed heeft.

### III.5. De frequentie-tetanus kromme

Een r.a.c. van 10 msec., 4-5 Hz veroorzaakt bij de ABRM reeds een gladde tetanus. Door frequentietoename wordt de piekspanning ten



Figuur 5

Piekspanning en spanningsrest als functie van de frequentie in de tetanus.  
 Piekspanning: x----x, spanningsrest: ●—●. Milieu: normaal zeewater.

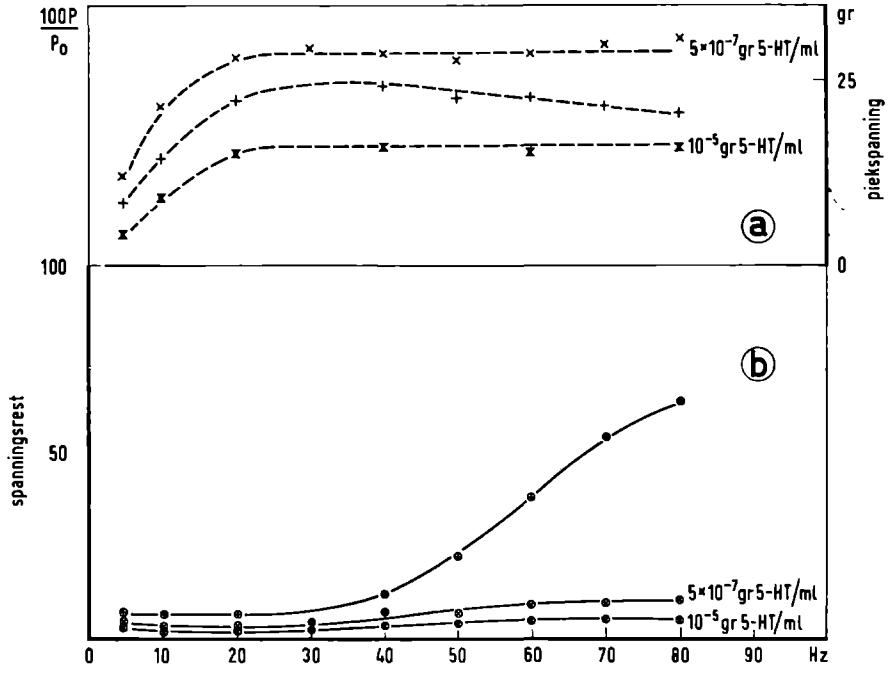
gevolge van summatie groter. Opnieuw kunnen we dan onderzoeken, welk verband er bestaat tussen  $P_0$  en de eventueel optredende spanningsrest. Fig. 5 (gemiddelde waarden van 14 spieren) laat zien, dat de piekspanning stijgt, totdat bij 40 Hz een optimum bereikt wordt, om daarna weer af te nemen. Deze daling van de piekspanning boven 40 Hz is volgens de symmetrietoets van WILCOXON significant (onbetrouwbaarheidsgrens:  $\alpha = 0,05$ ). De spanningsrest begint juist boven 40 Hz sterk toe te nemen, hetgeen in het werk van LOWY en MILLMAN (1963) niet tot uiting komt, doordat slechts frequenties tot 10 Hz werden gebruikt om de ABRM in tetanus te brengen. De spanningsrest blijkt S-vormig toe te nemen. Hiermede is aangetoond, dat ook in de tetanus een spanningsrest kan ontstaan, mits de frequentie maar hoog genoeg is. Bovendien blijkt de overgang geleidelijk te zijn van contracties met een snelle verslapping (geringe spanningsrest) naar contracties met een langzame verslapping (grote spanningsrest). Dit betekent, dat ook in tetani de grendeling niet geheel afwezig is.

### III.6. Discussie en experiment

Het verband tussen piekspanning en spanningsrest in de tetanus is om twee redenen opmerkelijk. Op de eerste plaats ziet men boven 40 Hz de piekspanning dalen, terwijl tegelijk de spanningsrest, dus de grendeling gaat toenemen. Men zou zich kunnen afvragen of de piekspanning

daalt t e n g e v o l g e van het toenemen van de grendeling.

Nu is het mogelijk de grendeling te verminderen met 5-HT (TWAROG, 1954), welke stof de grendeling doet afnemen. Men moet dus verwachten, dat men door de grendeling weg te nemen, de piekspanning zodanig kan beïnvloeden, dat deze toeneemt of maximaal blijft. Inderdaad blijkt de piekspanning in een zeewaterbad met  $5 \times 10^{-7}$  gr 5-HT/ml vrijwel maximaal te blijven, terwijl bovendien de piekspanning bij alle frequenties volgens de symmetrietoets van WILCOXON significant (onbetrouwbaarheidsdrempel:  $\alpha = 0,05$ ) ligt boven die, welke zonder 5-HT gemeten werd (fig. 6). Uit dit experiment blijkt, dat de piekspanning daalt ten gevolge van het toenemen van de grendeling. Hieruit volgt, dat de grendeling één van de factoren is, die het verder stijgen van de piekspanning belet.



Figuur 6

Vergelijking van tetanus-frequentie krommen in normaal zeewater, zeewater met  $5 \times 10^{-7}$  gr 5-HT/ml en zeewater met  $10^{-5}$  gr 5-HT/ml.

De in het voorgaande beschreven invloed van 5-HT op de piekspanning in de r.a.c.-contractie werd ook door BAGUET et al. (1962) en in de ACh-contractuur door TWAROG (1960) vastgesteld. Deze onderzoekers

gebruikten allen  $2,5 \times 10^{-7}$ - $2,5 \times 10^{-6}$ gr 5-HT/ml om de ABRM te ontgrendelen. LOWY en MILLMAN (1963) behandelden de spier echter met  $10^{-5}$ gr 5-HT/ml en constateerden slechts een afneming in de snelheid van spanningsstijging in het begin van de r.a.c.-contractie. Wij vonden echter, dat  $10^{-5}$ gr 5-HT/ml wél de grootte van de piekspanning vermindert, zoals fig.6 laat zien. De piekspanning ligt bij alle frequenties significant lager dan die, welke zonder 5-HT gevonden werd. Hieruit blijkt dus, dat vooral lage concentraties 5-HT de spanningsontwikkeling bevorderen of ondersteunen, terwijl hogere concentraties een tegengesteld effect hebben. Geringe ontgrendeling leidt dus tot ondersteuning van de spanningsontwikkeling, terwijl door totale ontgrendeling ( $10^{-5}$ gr 5-HT/ml) de spanningsontwikkeling ondergraven wordt. Het begrip ondersteuning (VON KRIES, 1880) verwijst dus vooral naar het effect op de bevordering van de contractiliteit, terwijl het begrip grendeling vooral de nadruk zal leggen op de hinder daarvan. In dit verband komen wij later nog eens op de werking van 5-IIT terug.

Eentweede opmerkelijk feit is de S-vormige toeneming van de spanningsrest met oplopende frequentie. Het blijkt, dat de spanningsrest toeneemt volgens hetzelfde patroon, dat in de contracturen met verschillende concentraties ACh of KCl, of door pulsduurverlenging verkregen wordt. Volgens het onder III.4. gehouden betoog zou de concentratie van het uit het s.r. vrijgemaakt Ca samenhangen met de duur van de depolarisatie of de concentratie ACh of KCl. Dit wordt opnieuw duidelijk door een nadere beschouwing van het effect van de frequentie in een r.a.c.-prikkeling. Elke puls in een r.a.c. voorziet in het vrijmaken van een bepaalde concentratie Ca uit het s.r. Eindigt de puls, dan krijgt het s.r. gelegenheid om, in de pauze tussen twee pulsen, het ion opnieuw te binden of weg te pompen. Bij frequentieverandering wordt het aantal pulsen per tijdseenheid, en daarmee de duur van de pauze tussen de pulsen, gevarieerd. Een r.a.c. van hoge frequentie begint reeds op een d.c. te gelijken. Naarmate de frequentie stijgt, neemt de terugpomp-pauze snel af. Het gevolg zal zijn, dat de concentratie vrijgemaakt Ca bij hoge frequentie gehandhaafd blijft of zelfs toeneemt. Door interactie van dit Ca met de actomyosine-ATPase wordt spanning gegenereerd. Dat de toeneming van de spanning S-vormig met de concentratie Ca plaats vindt, moet aan andere oorzaken worden toegeschreven (zie hfdst. V).

Als koppelende factor is nu reeds enige malen het Ca ter sprake gekomen en in het volgende hoofdstuk willen we ons een oordeel vormen over deze werking van Ca.

## HOOFDSTUK IV

### DE KOPPELENDE WERKING VAN Ca

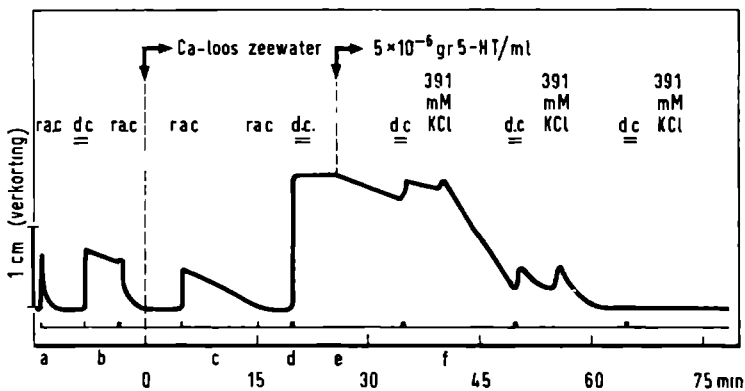
Onder normale prikkelverhoudingen is het de taak van Ca de membraanfunctie aan de mechanische activiteit te koppelen. Hoe men zich dat proces voorstelt in de dwarsgestreepte spier, is in de inleiding beschreven (1.3.). In dit kader en in verband met de uiteenzetting in het vorige hoofdstuk, moeten we ons afvragen of Ca dezelfde koppelende werking in de ABRM vervult. Een gedeeltelijk antwoord hierop werd reeds gegeven door RÜEGG et al. (1963), die aantoonde, dat onttrekken van Ca het vermogen tot het ontstaan van de ACh- en KCl-contractuur doet verdwijnen. Van meer belang is voor ons de rol van Ca in de verslapping. We vermoeden immers, dat de gebeurtenissen in de contractiele fase, die tot grendeling leiden, zullen worden beïnvloed door Ca.

Er zijn twee methoden, die inzicht kunnen verschaffen omtrent de werking van Ca in spieren. Volgens de eerste methode onttrekt men Ca aan de spier door deze te dompelen in een medium zonder Ca. Deze methode werd vooral toegepast door FRANK (1958, 1960) bij de teenspier van *Rana*. De andere methode maakt gebruik van het fenomeen, dat de spanning afhankelijk is van de in het milieu aanwezige concentratie Ca. Het effect van één bepaalde prikkel wordt nagegaan bij verschillende concentraties Ca. Deze methode werd door HINKE (1965) gebruikt. We zullen beide methoden nu op de ABRM toepassen.

#### IV.1. Onttrekken van Ca aan de spier

Door onttrekken van Ca wordt de spier ontkoppeld, d.w.z. na verloop van tijd geeft de teenspier in een milieu zonder Ca geen mechanisch antwoord meer op welke prikkel dan ook (FRANK, 1960). Het effect van Ca-loos zee water op het mechanisch antwoord van de ABRM, dat ten gevolge van het toedienen van prikkels normaal aanwezig is, ziet men in fig. 7. Het mechanogram werd isotonisch geregistreerd op een beroete trommel. Allereerst ziet men het effect van 5 sec. r.a.c. 16 Hz, 10 msec., een contractie met een snelle verslapping (a); vervolgens het effect van 5 sec. d.c. met een langzame verslapping (b), welke na enkele

minuten werd versneld met r.a.c. Wordt nu Ca uit het zeewater verwijderd, dan heeft een na 5 minuten toegediende r.a.c. een kleinere verkorting tot gevolg, maar tevens is de snelheid van verslappening geringer geworden (c). Een r.a.c. heeft na 15 minuten Ca-loos zeewater geen effect meer. Dient men hierna d.c. toe, dan verkrijgt men bij het sluiten van de stroom nauwelijks enig antwoord; verbreekt men echter de stroom, dan komt er een enorme contractuur tot stand, die niet meer verslapt (d). Nu kan men bij de ABRM verkortingsresten altijd elimineren door 5-HT toe te voegen aan het zeewater. Bij toepassen daarvan blijkt, dat 5-HT echter nauwelijks enige verslappening veroorzaakt (vergelijk (e) met de door r.a.c. versnelde verslappening in (b)). Hieruit volgt dus, dat de werking van 5-HT afhankelijk is van de aanwezigheid van Ca. Een contractie, opgewekt met 391 mM KCl, geeft nog slechts een geringe verkorting, terwijl er nu onder invloed van 5-HT wèl een versnelling van de verslappening optreedt (f). Dit kan erop wijzen, dat door KCl Ca wordt vrijgemaakt. Na 60 minuten is er geen antwoord op ACh, KCl of d.c. meer te verkrijgen.



Figuur 7

Het effect van onttrekken van Ca aan de spier.

Boven het mechanogram zijn de toegediende prikkels weergegeven.

Belasting 5 gr. Nadere verklaring: zie tekst.

Nader onderzoek, dat we naar het elektrisch gedrag van de membranen deden, leerde ons, dat in Ca-loos zeewater de A.P. (uitwendig afgeleid 1 mV) na 15 minuten verdwijnt; hiermee gepaard verdwijnt eveneens het antwoord op r.a.c. en dat op het sluiten van d.c. Hieruit blijkt, dat het Ca, dat verantwoordelijk is voor de antwoorden op KCl, ACh en stroomverbreken, sterker gebonden is dan in het voorgaande geval. Dit Ca is wellicht afkomstig van meer naar binnen gelegen delen van

de spier. Uiteindelijk verdwijnen ook deze antwoorden, zodat we de conclusie kunnen trekken, dat Ca in ieder geval in de koppeling moet zijn betrokken. Men moet dus constateren, dat er twee *sites* zijn, waar Ca kan ingrijpen: 1. aan de membraan en 2. in een deel van de koppeling. 1. Er wordt in nauw verband met het optreden van de A.P. Ca vrijgemaakt, zodat bij verdwijnen van de A.P. de aansluitende schakels in de koppelingsketen niet meer kunnen responderen. Het is echter ook mogelijk, dat dit Ca rechtstreeks tijdens membraandepolarisatie de spiervezel binnenkomt, vanuit de interstitiële vloeistof. De vezels zijn immers slechts 3-5 $\mu$  dik. De moeilijkheden met betrekking tot de diffusie van Ca, welke door HILL (1948) werden geopperd, behoeven hier niet tegelden (zie inleiding). 2. De tweede Ca-*site* zou het s.r. zijn. ACh of KCl zouden dit Ca zelfs zonder membraandepolarisatie vrij kunnen maken, waaruit blijkt, dat deze stoffen niet alleen membraandoorslag veroorzaken, doch ook dieper in de koppeling ingrijpen. Bovendien bevat deze *site* na 15 minuten onttrekken van Ca nog een aanzienlijke hoeveelheid Ca, gezien de enorme contractuur, die na het verdwijnen van de A.P. op het verbreken van d.c. ontstaat. Het verdwijnen van dit Ca uit de spier heeft ook tot gevolg, dat de verslapping niet meer intreedt (zie eveneens IV.3.). Vooral technische moeilijkheden blijken te verhinderen, dat men thans een beter inzicht in de onderscheiden effecten van Ca verkrijgen kan.

De cafeïnecontractuur zou echter door onttrekken van Ca, zelfs na toevoegen van 0,1 M natriumcitraat aan het zeewater, niet beïnvloed worden (RüEGG et al., 1963). FRANK (1962) was in staat deze contractuur te doen verdwijnen in een medium zonder Ca door het opwekken van de contractuur enige malen te herhalen. Het zeer sterk aan het s.r. gebonden Ca in de teenspier van Rana moet blijkbaar eerst door cafeïne vrijgemaakt worden, voordat het aan de spier kan worden onttrokken. RüEGG et al. hebben in hun experiment de cafeïnecontractuur slechts eenmaal opgewekt. Uit een experiment dat door ons gedaan werd, blijkt inderdaad, dat de ABRM in aanwezigheid van 0,1 M natriumcitraat nog op cafeïne reageert, nadat de ACh- en KCl-contractuur reeds uitgeschakeld waren. Nadat de contractuur echter tweemaal was opgewekt, had een derde maal toedienen van cafeïne geen effect meer, zodat we tot de conclusie moeten komen, dat alle antwoorden van de spier op prikkels via Ca-koppeling tot stand komen.

## IV.2. Variatie van het Ca-gehalte in het milieu

Een aanvullend beeld omtrent de werking van Ca verschaft de spier

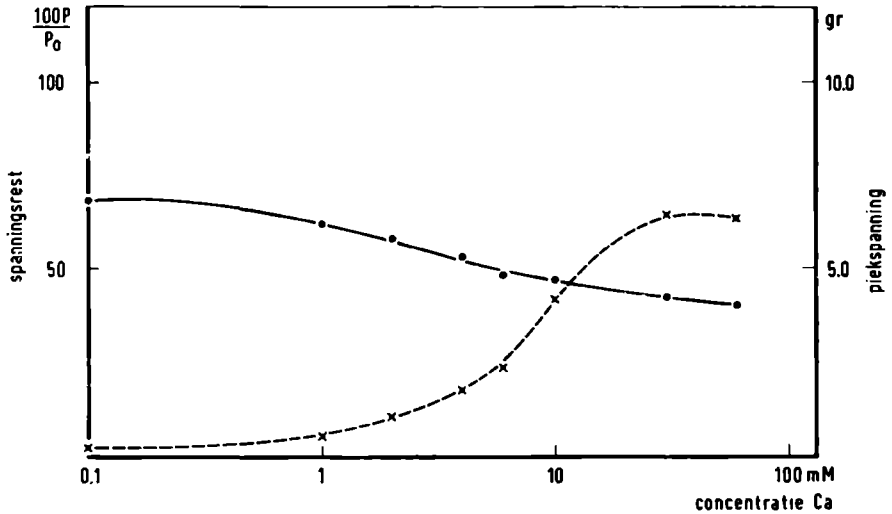


onder invloed van verschillende concentraties Ca in het zeeewater. De spier werd tot contractie gebracht met een 200 msec. puls van 8 V. Het Ca-gehalte werd gevarieerd van 0,1 mM tot 60 mM volgens onderstaande tabel II.

T a b e l II

SAMENSTELLING VAN HET ZEEWATER MET VERSCHILLENDE Ca-GEHALTE  
Concentratie in millimolair

CaCl <sub>2</sub>	0	0,1	1	2	4	N=6	10	30	60
NaCl	392	392	390	389	386	383	377	347	293



Figuur 8

De piekspanning en spanningsrest op een puls van 200 msec. als functie van de concentratie Ca (zie tabel II) van het zeeewater.

Piekspanning: x-----x, spanningsrest: ●——●.

Men ziet in fig. 8 (gemiddelde waarden van 6-8 spieren), dat met stijgend Ca-gehalte weer een S-vormige toeneming in de piekspanning van de *twitch* optreedt. Eenzelfde resultaat verkreeg ook HINKE (1965) met rattearterie. Bovendien werd een, na het voorgaande niet meer zo verrassende, afneming van de spanningsrest waargenomen. In een milieu met lagere concentraties Ca dan in normaal zeeewater (6 mM) is er minder verslapping, terwijl door hogere concentraties Ca de verslapping gaat toenemen.

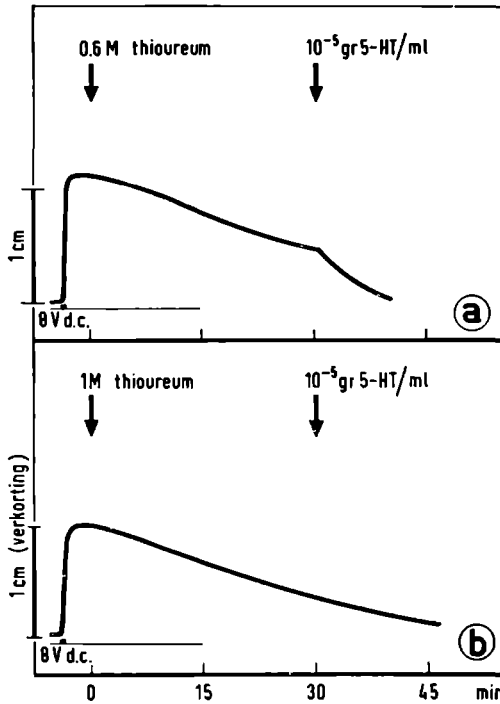
### IV.3. De werking van Ca en de inactivering door thiourem

Nu gebleken is, dat Ca betrokken is bij de koppeling in de ABRM en tevens de verslapping beïnvloedt, kan men dit gegeven ook vanuit een ander standpunt bezien. Immers Ca blijkt een activator van de actomyosine-ATPase te zijn (WEBER et al., 1964; PORTZEHL et al., 1965). Men bereikt dus door het onttrekken van de activator hetzelfde effect als met thiourem, dat een interactieremmer is (RÜEGG et al., 1963). Hiermede wordt bevestigd, dat juist remming van de actomyosine-ATPase, in dit geval door de activator te onttrekken, de verkortingsrest in stand doet blijven. Maar er zijn ook verschillen tussen het inactiveren van de actomyosinewerking door het onttrekken van Ca en het inactiveren door middel van thiourem. Door onttrekken van Ca verslapt de spier niet, terwijl dit tijdens het indringen van het thiourem, zonder bijzondere voorzorgen, wel het geval is. Dit is volgens RÜEGG et al. (1963) te wijten aan de plasticerende invloed, die thiourem op het paramyosine heeft. Wanneer de spier door thiourem geïnactiveerd werd, bleek er aan de werking van 5-HT weinig veranderd (RÜEGG, 1965), terwijl wij konden vaststellen, dat de werking van 5-HT door onttrekken van Ca achteruit gaat. Ingaande op dit laatste punt kan men stellen, dat 5-HT ofwel helemaal niets van doen heeft met de interactie tussen het actine en het myosine, ofwel dat de interactieremming niet volledig was.

Aangaande de volledigheid van inactivering van de actomyosine-ATPase door middel van thiourem is recent echter enige twijfel gerezen (LOWY et al., 1964). De situatie is wellicht vergelijkbaar met die van de inactivering door ureum, waarmee remming onder bepaalde condities wel volledig lijkt, doch het in feite niet is. Aan de semitendinosus (dwarsgestreept) van *Rana* wordt de cafeïnecontractuur na 26 minuten incuberen met ureum wel verkregen met 1 gram belasting, echter niet met 5,2 gram of onder isometrische condities (BARANY et al., 1965). Dit geeft ons aanleiding om de verslapping door 5-HT van de spier na inactivering door thiourem nogmaals aan een onderzoek te onderwerpen.

Zelfs na 66 minuten blijkt er in normaal zeewater op 8 V d.c. met dedoor RÜEGG et al. (1963) gebruikte concentratie thiourem (0,6 M) nog een spanning van enige milligrammen op te treden, terwijl de cafeïnecontractuur dan reeds verdwenen is. Het achterwege blijven van deze contractuur blijkt dus geen betrouwbare indicatie voor de volledigheid van de inactivering van de spier. Bovendien schijnt het Ca-gehalte in normaal zeewater (6 mM) de tijd te verlengen, waarbinnen de inactivering volledig wordt. Om aan alle onzekerheid een einde te maken, werd

het Ca-gehalte tot 1 mM (tabel II) teruggebracht (RüEGG en WEBER, 1963) en aan het zeewater 1 M thiourem toegevoegd. Een vergelijking van de werking van 5-HT bij 0,6 M thiourem met die bij 1 M thiourem ziet men in fig. 9 a en b. De spier werd met d.c. tot contractuur gebracht en daarna gekoeld tot 10°C om het verkortingsverlies ten gevolge van het binnendringen van thiourem tegen te gaan. De verslapping door 5-HT treedt na 30 minuten niet meer op als de spier geïnactiveerd wordt met 1,0 M thiourem, terwijl dit met 0,6 M in geringe mate nog wel het geval is. Wanneer dus de interactieremming vollediger is, blijkt de werking van 5-HT even goed uitgeschakeld te worden als door onttrekken van Ca. De inactivering door thiourem is, wat dit punt betreft, volkomen vergelijkbaar met de inactivering, verkregen door onttrekken van Ca.



Figuur 9

De invloed van thiourem op de verslapping door 5-HT.

a) Inactivering met 0,6 M thiourem en b) met 1,0 M thiourem.

Spier tot contractuur gebracht met 8 V d.c. Belasting 5 gr. Temperatuur 10°C.

Zeewater met 1 mM Ca (zie tabel II).

#### IV.4. Discussie

In vergelijking met het gedrag van de onderzochte dwarsgestreepte en gladde spieren, gedraagt de ABRM zich onder invloed van een verschillend Ca-gehalte in het zeewater zó frappant gelijk, dat men tot de conclusie moet komen, dat Ca ook in deze spier een koppelende werking vervult. Het waargenomen verband tussen de piekspanning op een 200 msec. puls en de verhoging van het Ca-gehalte rechtvaardigt alleszins het denkbeeld, dat een stijgende concentratie KCl of ACh tot gevolg heeft, dat de vrijgemaakte concentratie Ca eveneens toeneemt. Deze verhoging van de concentratie Ca wordt op haar beurt weer gevolgd door een stijging van de spanning. Dat deze toeneming van de spanning S-vormig plaats vindt, heeft andere oorzaken, zoals in het volgende hoofdstuk zal blijken.

Het trekken van een conclusie betreffende de werking van Ca op de verslapping is echter niet zo eenvoudig geworden. Enerzijds verloopt de toeneming van de spanningsrest ten dele gelijkvormig met de groei van de piekspanning. Anderzijds doet de stijging van de concentratie Ca in het zeewater de spanningsrest afnemen. Als men nu de boven gehouden redenering ten aanzien van de invloed van Ca op de grootte van de piekspanning wil doortrekken, dan zou men ten gevolge van een stijgende concentratie ACh - dus een toegenomen vrijmaking van Ca - een dalende spanningsrest verwachten en geen gedeeltelijke parallel met de piekspanning. Aangezien men deze wel waarneemt, moet men tot de conclusie komen, dat men te doen heeft met 2 verschillende werkingen van Ca. Eén van deze werkingen van Ca houdt verband met het opwekken van de spanning in de contractie. Dit is de normale koppelingsfunctie van het Ca. De tweede Ca-invloed is waar te nemen in de verslapping.

Het gemakkelijkst kan men de werking van Ca op de verslapping, ten gevolge van processen in de contractie, bestuderen aan glycerinepreparaten, omdat in deze GMF de koppeling is uitgeschakeld. De tweede werking van Ca komt later aan de orde.



## HOOFDSTUK V

### PIEKSPANNING EN SPANNINGSREST BIJ GMF

GMF, die van dwarsgestreepte skeletspieren geprepareerd worden, ontwikkelen in een Mg-houdende zoutoplossing met ATP een even grote maximumspanning en contraheren even snel als de levende spieren (PORTZEHL, 1951). De energiebron voor de contractie is het ATP, dat door chemische interactie van het actine en myosine, d.w.z. door de actomyosine-ATPase gesplitst wordt (CAIN en DAVIES, 1962). Wordt de actomyosine-ATPase echter geremd door een interactieremmer, dan houdt de contractie op en imiteert de GMF de verslapping en de rustfase van de spier.

Ook in de levende spier berust het in- en uitschakelen van de contractiefase op de uit- en inschakeling van een interactieremming van actine en myosine. Want het uit de spier geëxtraheerde s.r. behoort tot de interactieremmers, omdat het de activator Ca opneemt. Variaties in het Ca-niveau beheersen dus het in- en uitschakelen van de contractiefase. Er is aangetoond, dat ureum en nog beter thioureum goede interactieremmers zijn, behalve het reeds bekende EDTA en EGTA (aethyleenglycoldiaminotetraäcetaat). De werking van de laatste stoffen komt enigszins overeen met die van het s.r., omdat deze stoffen het Ca binden, hetgeen voor thioureum niet geldt (RÜEGG, 1963).

Volgens RÜEGG en WEBER (1963) is de opvatting betreffende de interactie van het actine en myosine, verkregen uit onderzoek van dwarsgestreepte GMF, volkomen van toepassing op het actomyosine van de zogenaamde paramyosinespieren; de opvatting betreffende de verslapping echter niet, omdat interactieremmers bij deze spier de aanwezige spanning niet doen verdwijnen, sterker nog, dat de spanningsrest reageert op parameters, die het tropomyosine en niet het actomyosine beïnvloeden.

Omdat we hebben vastgesteld, dat in de ABRM het Ca zowel in de contractie alsook in de verslappingsfase een invloed doet gelden, is het noodzakelijk om na te gaan of het ontstaan van de spanningsrest in GMF door dezelfde factoren, met name de ATPase-activiteit en de concentratie geïoniseerd Ca, wordt gecontroleerd (LEENDERS, 1966),

temeer daar membraan en koppeling door de extractie met glycerine buiten werking worden gesteld.

### V.1. De werking van Ca

GMF kunnen slechts tot contractie komen, wanneer er sporen geïoniseerd Ca in de vezels aanwezig zijn. Deze concentratie geïoniseerd Ca blijkt de *trigger* van de contractie te zijn. Elke GMF bevat enig Ca, zodat men een contractie verkrijgt, wanneer men de GMF incubeert met ATP. Deze concentratie Ca bedraagt ongeveer  $5 \times 10^{-6} \text{M}$  (PORTZEHL et al., 1965). Men kan nu, door de GMF eerst in een oplossing te incuberen, welke 2 mM EDTA en 3,45 mM ATP bevat, vrijwel alle Ca wegvangen en men verkrijgt dan ook geen contractie. Tevens wordt de GMF verrijkt met ATP, daar ATP immers door middel van diffusie de GMF moet binnendringen. Doorgaans zal de concentratie in de kern in een 60-70 $\mu$  dikke GMF minder hoog zijn als de concentratie buiten de GMF (PORTZEHL et al., 1965). Met deze GMF kunnen toch zeer hoge spanningen worden verkregen, wel tot 5 à 10 kg/cm<sup>2</sup>. Deze spanningen zijn vergelijkbaar met die, welke van de levende spier verkregen worden.

Om de concentratie geïoniseerd Ca te kunnen variëren, werd een Ca-EDTA-buffer gebruikt. Omdat EDTA ook Mg bindt, terwijl ATP eveneens Ca en Mg bindt, is een stelsel van 8 vergelijkingen nodig om de vereiste samenstelling van een oplossing te kunnen berekenen (BRIGGS en FUCHS, 1964). De bestanddelen zijn: niet-gebonden ATP, (MgATP), (CaATP), (MgEDTA), (EDTA), (CaEDTA) en tot slot geïoniseerd Mg en Ca. De samenstelling van de oplossing kan men vinden in tabel III.

De concentratie niet-gebonden ATP, waarschijnlijk het substraat van de ATPase (MÜHLRAD et al., 1965), werd constant gehouden (0,66 mM). Dit had tot gevolg, dat in op twee na alle oplossingen de concentraties ATP<sub>tot.</sub> en Mg<sub>tot.</sub> gelijk bleven, zodat de gemeten piekspanningen - ook al zou (MgATP) het substraat van de actomyosine-ATPase zijn, hetgeen tot nu toe als gemeengoed werd beschouwd - niet teruggevoerd kunnen worden op een eventueel verschil in substraatconcentratie. Wijziging in de concentraties ATP<sub>tot.</sub> en Mg<sub>tot.</sub> moest in oplossing I worden aangebracht vanwege de volgende overweging. Omdat de actomyosine-ATPase met 8 mM EDTA reversibel geremd wordt, kunnen aan één GMF 5 concentraties Ca getest worden. Deze remconcentratie EDTA, welke binnen bepaalde tijd (30 sec.) de grootste verslapping gaf, hetgeen het geval is met 8 mM EDTA. Wanneer nu de concentraties ATP<sub>tot.</sub> en Mg<sub>tot.</sub> gehandhaafd zouden worden in oplossing I, dan zou deze oplossing

T a b e l   I I I  
 SAMENSTELLING VAN DE OPLOSSINGEN  
 OM GMF TOT CONTRACTIE TE BRENGEN MET VERSCHILLENDE Ca-GEHALTE \*  
 Concentraties van stoffen, ionen en chelaten in mM.

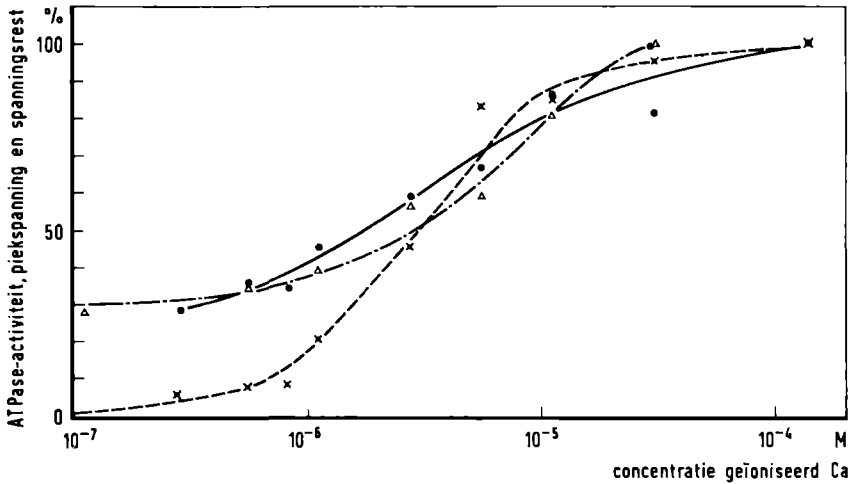
Kolom	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Ca ionen in M	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^{-6}$	$2,75 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$8,2 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$2,75 \times 10^{-7}$	Rem- oplossing **
Ca <sub>tot.</sub>	0,50	2,73	1,00	0,50	0,25	0,10	0,075	0,05	0,025	0
ATP <sub>tot.</sub>	7,78	3,45	3,45	3,45	3,45	3,45	3,45	3,45	3,45	0,79
Mg <sub>tot.</sub>	7,78	4,68	4,68	4,68	4,68	4,68	4,68	4,68	4,68	5,08
EDTA <sub>tot.</sub>	0	4,14	2,48	2,00	1,76	1,62	1,59	1,57	1,54	8,00
KCl	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
histidine	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
(MgATP) niet-gebonden	6,75	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79	0,13
ATP	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
Mg ionen	1,02	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,03
(MgEDTA)	0	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	4,92
(EDTA)	0	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	3,10
(CaEDTA)	0	2,62	0,96	0,48	0,24	0,096	0,072	0,048	0,024	0
(CaATP)	0,36	0,079	0,029	0,015	0,007	0,003	0,002	0,002	0,001	0

\* Deze tabel geeft de samenstelling van de oplossingen (omraamde deel in de tabel), alsmede de berekende concentraties ionen en chelaten, waarbij: Ca<sub>tot.</sub> = geïoniseerd Ca + (CaATP) + (CaEDTA); ATP<sub>tot.</sub> = niet-gebonden ATP + (MgATP) + (CaATP); Mg<sub>tot.</sub> = geïoniseerd Mg + (MgATP) + (MgEDTA) en EDTA<sub>tot.</sub> = (EDTA) + (MgEDTA) + (CaEDTA). In het systeem van BRIGGS en FUCHS zijn de gebruikte constanten: log K<sub>MgATP</sub> = 4,0; log K<sub>CaATP</sub> = 3,6; log K<sub>MgEDTA</sub> = 4,9 en log K<sub>CaEDTA</sub> = 6,3.

\*\* De remoplossing (kolom X) dient om de ATPase te inactiveren na afloop van de contractie, zodat het mogelijk wordt de spanningsrest te meten.



13,76 mM EDTA moeten bevatten, welke concentratie uitgaat boven die van de remoplossing. Restanten van deze hoge concentratie EDTA, samen met de concentratie EDTA in de remoplossing, vertragen de verslapping, waarschijnlijk door een vertraging in de remming van de ATPase-activiteit. Daarom werd besloten het EDTA uit de oplossing weg te laten. De remoplossing (kolom X) bevat geen Ca, zodat ook in deze oplossing - om het gehalte niet-gebonden ATP constant te kunnen houden - de concentraties ATP<sub>tot.</sub> en Mg<sub>tot.</sub> verschillen van die van andere oplossingen.



Figuur 10

De piekspanning, spanningsrest en ATPase-activiteit van GMF als functie van de concentratie geïoniseerd Ca (zie tabel III). De piekspanning, spanningsrest en ATPase-activiteit zijn uitgedrukt in procenten van de maximale waarde (zie tekst).

Piekspanning: x---x, spanningsrest: ●—●, ATPase-activiteit: Δ---Δ.

In fig. 10 ziet men het resultaat van het incuberen van de GMF met de verschillende Ca-oplossingen (gemiddelden van 14 waarden per punt). 1. De piekspanning, uitgedrukt in procenten van de bij  $1,4 \times 10^{-4}$  M Ca optredende maximale piekspanning, neemt met een stijgende concentratie geïoniseerd Ca S-vormig toe. De drempel van de contractie ligt bij circa  $10^{-7}$  M Ca, welk resultaat ook bij de pootspier-GMF van Maia verkregen werd (PORTZEHL et al., 1965). De grootste stijging van de piekspanning bevindt zich tussen  $10^{-6}$  en  $10^{-5}$  M Ca, hetgeen ook SCHÄDLER (1966) vaststelde. Deze stijging treedt bij de GMF van Maia

op tussen  $10^{-7}$  en  $10^{-6}$  M Ca. De oorzaak van dit verschil is niet duidelijk.

2. De spanning s r e s t, uitgedrukt in procenten van de maximale  $P/P_0$  bij  $1,4 \times 10^{-4}$  M Ca, die na inactivering aanwezig blijft, neemt - gelijkvormig aan de piekspanning - met de concentratie geïoniseerd Ca toe. De spanningsresten bij lage concentratie Ca zijn relatief hoog, hetgeen overeenkomt met de bij de spier gevonden relatief hoge waarden van  $100 P/P_0$  met lage concentratie KCl of ACh en korte pulsen. De mogelijkheid moet niet uitgesloten geacht worden, dat deze relatief hoge  $P/P_0$  te wijten zou zijn aan de geringe uitwendige kracht, die bij lage spanningen door de bladveer of torsiedraad op de spier of de GMF wordt uitgeoefend. In feite zou deze spanningsrest dus kleiner kunnen zijn.

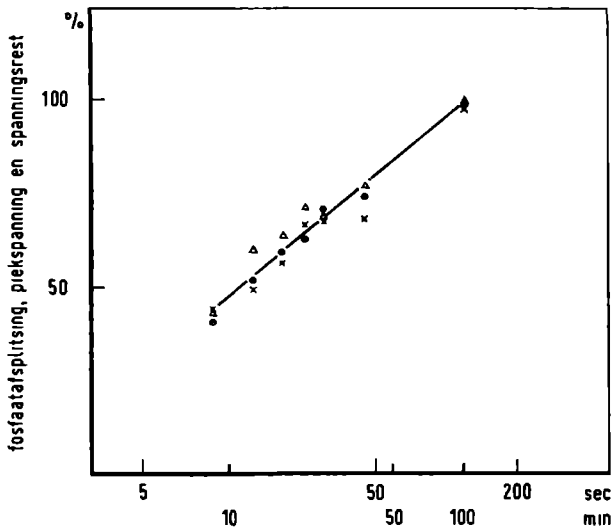
3. Tot slot werd de ATPase-activiteit gemeten, eveneens uitgedrukt in procenten van de maximale waarde. Hiervoor werd 10 mgr zeer fijn verdeelde GMF in dezelfde oplossingen gebracht, die gebruikt werden om de spanning te meten. Na afloop van de reactie werd het fosfaatgehalte bepaald. In 10 mgr GMF bevindt zich ongeveer 1 mgr eiwit (bepaald met micro-Kjehldahl), hetgeen goed overeenstemt met de gegevens uit de literatuur (PORTZEHL et al., 1965). De ATPase-activiteit is echter hoog, - van  $1,13 \times 10^{-6}$  M Pi per mgr eiwit en per minuut bij  $10^{-7}$  M geïoniseerd Ca tot  $4,09 \times 10^{-6}$  M Pi/minuut per mgr eiwit bij  $3,0 \times 10^{-5}$  M geïoniseerd Ca -. Aangezien men bij het meten van de ATPase-activiteit tot voor kort geen Ca aan het reactiemengsel toevoegde (RÜEGG, 1965), is deze hoge activiteit wellicht toe te schrijven aan de activering van de actomyosine-ATPase door het Ca. Bovendien blijkt de ionsterkte de ATPase-activiteit te beïnvloeden. Deze invloed valt echter volgens PORTZEHL et al. weg, wanneer de ATP-splitsing wordt uitgedrukt in procenten van de maximale splitsing. De ATPase-activiteit neemt gelijkvormig met de piekspanning en spanningsrest toe, wanneer de concentratie geïoniseerd Ca stijgt. De ATPase-activiteit blijft zelfs onder  $10^{-8}$  M Ca aanwezig. Men mag volgens PORTZEHL et al. echter een correctie aanbrengen van circa 10% van de maximale activiteit, omdat deze activiteit, die bij zeer lage concentratie Ca aanwezig blijft, niet aan het actomyosine toegeschreven moet worden, maar aan het door Ca geactiveerde myosine. De drempel voor de ATPase-activiteit komt hierdoor bij ongeveer  $10^{-8}$  M geïoniseerd Ca te liggen (PORTZEHL et al., 1965).

Omdat kennelijk de ATPase-activiteit de ontwikkeling van de spanningsrest bepaalt, zullen ook enige ATPase-karakteristieken kenmerkende invloed moeten hebben op de grootte van de spanningsrest. De parameters van de ATPase-activiteit, zoals: tijdsduur, substraatcon-

concentratie en temperatuur (naast de concentratie aanwezig Ca), moeten dus eveneens gelden voor de ontwikkeling van de spanningsrest.

## V.2. De tijd van activering

Aangezien de tijd een factor is, die van belang bleek voor de ontwikkeling van de piekspanning en spanningsrest in de *twitch* (pulsduur) en de tijd tevens de grootte van substraat omzetting door een enzym bepaalt, is het gewenst de invloed van deze factor te onderzoeken op de ontwikkeling van de spanningsrest bij GMF van de ABRM.



Figuur 11

Het effect van de tijd op de grootte van de piekspanning, spanningsrest en fosfaatafsplitsing.

De piekspanning, spanningsrest en fosfaatafsplitsing zijn uitgedrukt in procenten van de waarde bij 120 sec. en 100 min. respectievelijk.

Piekspanning x, spanningsrest ● en fosfaatafsplitsing △.

Concentratie Ca  $5,5 \times 10^{-6}$  M (zie tabel III, kolom IV).

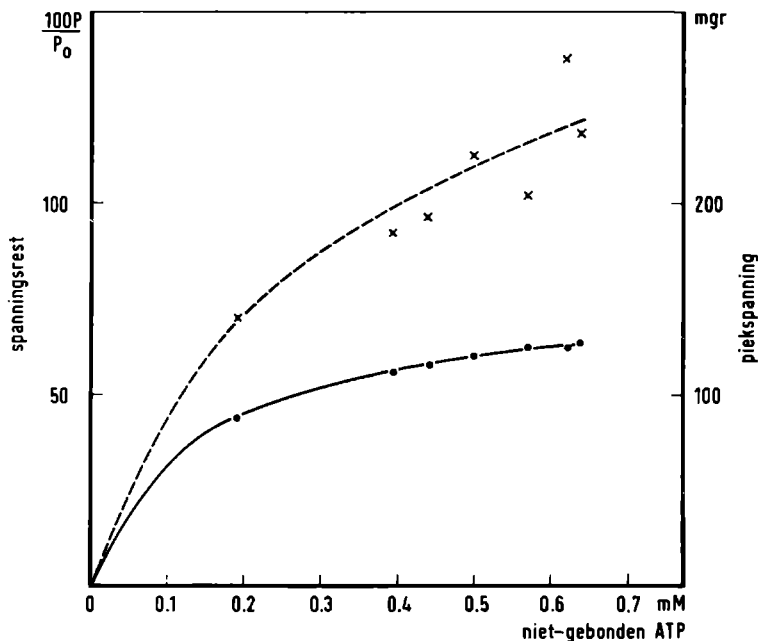
Daartoe werden GMF in een oplossing gebracht met een concentratie geïoniseerd Ca van  $5,5 \times 10^{-6}$  M (zie tabel III, kolom IV). De piekspanning, die door activering van de GMF (0,2 mgr per vezelbundel) ontstond en de spanningsrest, die na inactivering aanwezig bleef, werden vergeleken met de door de actomyosine-ATPase (10 mgr GMF) afgesplitste hoeveelheid fosfaat. Daarvoor werd de activeringsduur, die voor de spanningsmeting bij GMF varieerde van 10 tot 120 sec., met een

factor 50 vermenigvuldigd, omdat de gewichtsverhouding 1:50 was. De gemiddelde waarden gemeten bij 120 sec. werden, wat de spanning en de spanningsrest betreft, op 100% gesteld. Dit geschiedde ook ten opzichte van de fosfaatafsplitsing bij 100 minuten.

Het resultaat is weergegeven in fig. 11 (elke waarde is een gemiddelde van 5 metingen). Er blijkt een rechtlijnig verband te bestaan tussen de logaritme van de tijd enerzijds en de piekspanning, spanningsrest en fosfaatafsplitsing anderzijds. We moeten dus vaststellen, dat ook de tijd van omzetting van het substraat gecorreleerd blijkt te zijn met de grootte van de piekspanning en spanningsrest.

### V.3. Het effect van de substraatconcentratie

In een enzymatische reactie heeft de substraatconcentratie eveneens een invloed op de snelheid van de omzetting van het substraat zelf. De snelheid van omzetting is een hyperbolische functie van de substraatconcentratie (DIXON en WEBB, 1959).



Figuur 12

Het effect van de substraatconcentratie (niet-gebonden ATP) op piekspanning en spanningsrest van GMF.

Piekspanning: x-----x, spanningsrest: •——•. Gebruikte oplossingen: zie tabel IV.

Gewoonlijk wordt hiertoe de totale concentratie van het substraat gewijzigd. Het substraat van de ATPase is volgens MÜHLRAD et al. (1965) het niet-gebonden ATP. Omdat Ca ATP bindt, kan men op eenvoudige wijze de concentratie niet-gebonden ATP wijzigen door de concentratie  $Ca_{tot.}$  in de oplossingen te variëren. De concentratie  $Mg_{tot.}$  en  $ATP_{tot.}$  kunnen zodoende in gelijke verhouding gehandhaafd blijven op 5,0 mM, hetgeen volgens RÜEGG en WEBER (1963) een waarborg zou zijn voor een optimale activiteit en een optimale spanning. Het EDTA werd vanzelfsprekend uit de oplossingen weggelaten. De samenstelling van de oplossingen kan men vinden in tabel IV.

T a b e l   I V  
S A M E N S T E L L I N G   V A N   D E   O P L O S S I N G E N  
O M   G M F   T O T   C O N T R A C T I E   T E   B R E N G E N   Z O N D E R   E D T A   \*  
C o n c e n t r a t i e s   d e r   s t o f f e n   i n   m M .

Kolom	I	II	III	IV	V	VI	VII
niet-gebonden ATP	0,64	0,62	0,57	0,50	0,44	0,39	0,19
$Ca_{tot.}$	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	2,50
$ATP_{tot.}$	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
$Mg_{tot.}$	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
KCl	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
histidine	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
(MgATP)	4,32	4,31	4,26	4,17	4,08	3,99	3,28
$Mg_{ionen}$	0,68	0,69	0,75	0,83	0,92	1,01	1,72
(CaATP)	0,036	0,071	0,174	0,33	0,48	0,61	1,08
$Ca_{ionen}$ in M	$1,4 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-5}$	$7,6 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$
Remoplossing: niet-gebonden ATP: 4,53 ; $ATP_{tot.}$ : 5,00 ; $Mg_{tot.}$ : 5,00 ; (MgATP): 0,47 ; geïoniseerd Mg: 0,01 ; $EDTA_{tot.}$ : 10,00 ; (MgEDTA): 4,52 ; (EDTA): 5,48.							

\* Deze tabel geeft de samenstelling van de oplossingen (omraamde deel in de tabel), alsmede de berekende concentraties ionen en chelaten.

Men ziet uit de tabel, dat de concentratie Ca ver boven de optimale waarde om een maximale spanning te verkrijgen werd verhoogd. De afnemng van de spanningsrest en de piekspanning berust dan ook niet op de verhoging van de concentratie Ca, maar moet worden toegeschreven aan een verlaging van de concentratie niet-gebonden ATP. Wanneer men aanneemt, dat het verloop van de ATPase-activiteit door dat van de piekspanning en spanningsrest weerspiegeld wordt, dan is de verkregen kromme (zie fig. 12, weergegeven waarden zijn gemiddelden van 6 bepalingen aan verschillende GMF) karakteristiek voor de enzymacti-

viteit bij verschillende substraatconcentraties. Opnieuw hebben we hier dus een aanwijzing verkregen, dat de ATPase-activiteit zowel de grootte van de piekspanning als van de spanningsrest bepaalt.

#### V.4. Het effect van de temperatuur

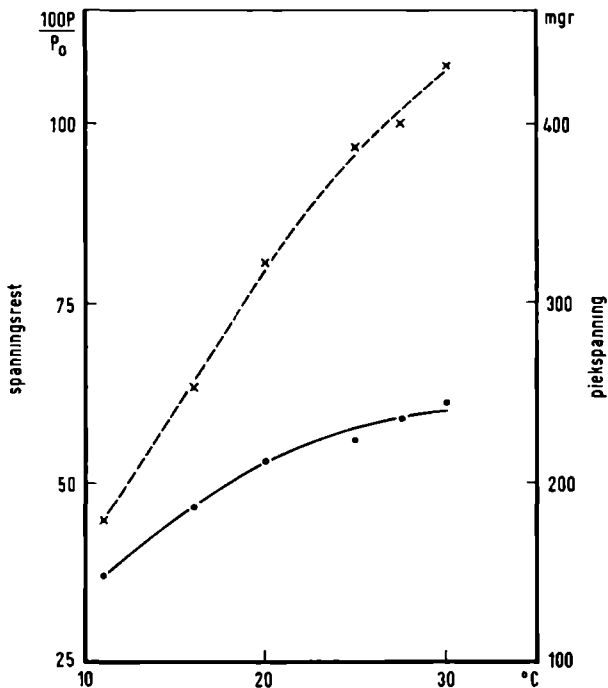
Door RÜEGG (1965) werd vastgesteld, dat na inactivering van de ATPase, temperatuursverhoging de aanwezige spanningsrest sneller doet verdwijnen dan bij lagere temperatuur. Dit verschijnsel werd toegeschreven aan een plasticerende werking van de temperatuurstoename op het paramyosine. Aangezien de temperatuur echter ook de enzymwerking beïnvloedt, in dit geval van de ATPase, moet men in het licht van de voorgaande experimenten verwachten, dat de met de ATPase-activiteit samenhangende spanningsrest eveneens een invloed zal ondergaan. De enzymatische activiteit zal onder invloed van temperatuursverhoging tot de optimumtemperatuur toenemen en dus ook de spanningsrest, die tijdens contractie van de GMF ontwikkeld wordt.

Het temperatuureffect bij enzymen is echter zeer gecompliceerd. Er kan een invloed bestaan op de affiniteit voor het substraat, op de ontleding van het enzymsubstraatcomplex (DIXON en WEBB, 1959) en, boven de optimumtemperatuur, op het enzymeiwit zelf. Het gaat voor ons doel te ver om dit complex van factoren geheel te analyseren en we maken slechts gebruik van de algemene tendens, die aan het einde van de vorige alinea werd aangegeven.

De piekspanning en de spanningsrest worden bij verschillende temperaturen gemeten aan één GMF. In fig. 13 zijn de gemiddelde metingen aan 6 GMF weergegeven. De GMF werd geactiveerd met een oplossing, welke  $5,5 \times 10^{-6}$  M geïoniseerd Ca bevatte (zie tabel III, kolom IV). De met de temperatuur toenemende piekspanning begint boven  $20^{\circ}\text{C}$  af te buigen, hetgeen het door RÜEGG en WEBER (1963) verkregen resultaat bevestigt. Hetzelfde geldt, hoewel in mindere mate, voor de spanningsrest. Deze spanningsrest neemt gelijkvormig aan de piekspanning toe met stijgende temperatuur. De ATPase-activiteit stijgt echter volgens RÜEGG en WEBER (1963) van 0 tot  $30^{\circ}\text{C}$  vrijwel evenredig met de temperatuur. Dit schijnt karakteristiek voor het actomyosine te zijn, maar aangezien piekspanning en spanningsrest gelijkvormig verlopen met stijgende temperatuur, kan men toch blijven vasthouden aan het ingenomen standpunt, dat de ATPase-activiteit spanning en spanningsrest genereert.

De GMF gedraagt zich ten aanzien van de temperatuur echter anders dan de spier. JOHNSON (1965) nam waar, dat de verslapping van de

spier toeneemt met stijgende temperatuur. Boven 27°C neemt de ver-  
slapping nog veel sneller toe dan onder 27°C. Dit werd door ons  
tijdens rekproeven eveneens gevonden (LEENDERS, 1964). JOHNSON  
(1965) kon echter bij GMF deze knik bij 27°C niet terugvinden, hetgeen  
ook door onze gegevens en die van RÜEGG en WEBER (1963) bevestigd  
wordt. Overeenstemming in de resultaten vinden we ook in het feit, dat  
GMF bij hoge temperatuur (30°C) na contractie slecht in staat zijn naar  
hun begintoestand terug te keren. Om deze contradictie tussen het ge-  
drag van de GMF en van de spier naar behoren te kunnen interpreteren,  
zou men eerst na moeten gaan, welke rol de koppeling in het gedrag  
van de spier bij temperatuursverandering speelt.



Figuur 13

De invloed van de temperatuur op piekspanning en spanningsrest van GMF.

Piekspanning: x-----x, spanningsrest: ●——●.

Concentratie Ca:  $5,5 \times 10^{-6}$  M (zie tabel III, kolom IV).

## V.5. Discussie

De ATPase, dus de activiteit van het actomyosine, genereert, zoals

we zagen, zowel de spanning alsook de spanningsrest. Beide gehoorzamen de karakteristieken van de ATPase, zoals de invloed van de activeringstijd, de concentratie niet-gebonden ATP en de temperatuur, hetgeen de bovenstaande conclusie bevestigt. De ATPase-activiteit is in de GMF en de spier afhankelijk van het beschikbare geïoniseerd Ca. Daardoor bepaalt de hoeveelheid Ca, die in de spier wordt vrijgemaakt, de grootte van de spanningsrest, welke na afloop van een contractie behouden blijft. Er ontstaat immers in aanwezigheid van een lage concentratie Ca slechts een kleine spanning, maar eveneens een geringe spanningsrest. In een r.a.c., die 'puls' Ca naar het actomyosine stuurt, is in elke 'puls' slechts een geringe grendeling verdisconteerd, waarschijnlijk juist voldoende om reeds bij lage frequentie (4 Hz) een gladde tetanus te doen ontstaan, hetgeen in de dwarsgestreepte spier pas bij hogere frequentie het geval is. In een r.a.c.-contractie zal het Ca niet onderbroken bij het actomyosine aanwezig blijven, hetgeen zeer belangrijk is, omdat de factor tijd een grote rol speelt in de ontwikkeling van de spanningsrest. De door een 'puls' ontstane grendeling is weer grotendeels verdwenen, voordat de volgende 'puls' arriveert, althans bij lage frequentie. Na een r.a.c.-contractie zal de verslapping dus groot zijn, omdat er slechts een geringe grendeling werd veroorzaakt. Door d.c. wordt de gevormde concentratie geïoniseerd Ca echter aan de actomyosine-ATPase gehandhaafd, hetgeen de ontwikkeling van een grote spanningsrest tot gevolg heeft. Hetzelfde treedt op, wanneer ACh of KCl worden gebruikt om een contractuur op te wekken. De beslissing of er in de spier na afloop van de contractie wel of géén spanningsrest aanwezig blijft, is hiermede dus verschoven naar de *excitation-contraction coupling*. Deze redenering vormt een plausibele verklaring voor het verschil in verslapping tussen de r.a.c.-contractie enerzijds en de d.c.-, ACh- en KCl-contractuur anderzijds.

In GMF is aangetoond, dat de ATPase-activiteit en hiermee de spanning en spanningsrest afhankelijk zijn van de concentratie geïoniseerd Ca. Verhoging van de concentratie geïoniseerd Ca boven  $3 \times 10^{-5}$  M veroorzaakt echter nog nauwelijks een toeneming in de spanning. De ATPase-activiteit blijkt dan maximaal te zijn. Het actomyosine heeft zijn maximumcapaciteit bereikt. Ook de tijdsduur van de activering speelt een rol van betekenis in de grootte van de bereikbare spanning (fig. 11). Bij GMF is de werkelijk gemeten spanning of spanningsrest het resultaat van de grootte van de activiteit en de tijd, waarin deze activering plaats heeft.

In spieren hebben we eveneens een S-vormig verband tussen spanning en prikkelverandering kunnen constateren (hfdst. III). In hoofdstuk IV is



gebleken, dat deze prikkels via Ca aan de contractiele machinerie gekoppeld zijn. Prikkelvariatie zou uiteindelijk verandering in de concentratie vrijgemaakt Ca tot gevolg hebben. De door ons gevonden S-vormige krommen (tussen spanning enerzijds en pulsduur en concentratie ACh of KCl anderzijds) zijn echter niet congruent. Ze verschillen in steilheid en maximaal bereikbare spanning. Behalve de aan de actomyosine-werking inherente beperkingen (maximumcapaciteit en de concentratie Ca) wordt de ontwikkeling van de spanning vooral in de spier nog door andere factoren begrensd:

1. Per afzonderlijke prikkel, die nodig is om een maximaal effect te bereiken, wordt slechts een totale hoeveelheid Ca vrijgemaakt, die gelegen is onder de concentratie Ca, welke maximale activiteit veroorzaakt.

2. De tijd, gedurende welke een bepaalde concentratie Ca bij het actomyosine gehandhaafd wordt. Door de verschillende prikkels wordt Ca met een andere snelheid ter beschikking van het actomyosine gesteld. KCl maakt Ca via depolarisatie snel vrij, zodat een S-vormige kromme met grote steilheid verschijnt. ACh moet eerst in de spier binnendringen en heeft dus meer tijd nodig om dezelfde hoeveelheid Ca beschikbaar te stellen.

3. Omdat de ATPase de grootte van de spanningsrest bepaalt, zal de grendeling reeds tijdens de contractie in werking zijn. Deze grendeling beïnvloedt zowel de steilheid van de S-vormige krommen alsook de maximaal bereikbare piekspanning.

Vooraf over deze laatste beperking zal het volgende hoofdstuk handelen. In hoofdstuk VIII wordt tenslotte nog een poging gedaan de maximaal bereikbare concentratie Ca te beïnvloeden door het Ca-gehalte van het zeewater te variëren.

## HOOFDSTUK VI

### DE INVLOED VAN DE GREDELING OP DE SPANNINGSONTWIKKELING TIJDENS CONTRACTIE VAN GMF EN SPIEREN

We hebben in het vorige hoofdstuk aangetoond, dat de spanningsrest door de ATPase-activiteit gegenereerd wordt. Uit dit feit kan men afleiden, dat het grendelmechanisme reeds tijdens activiteit, tijdens spanningsontwikkeling in werking treedt. Dit zal bevestigd dienen te worden door het verschijnsel, dat er tijdens contractie een zekere belemmering van de spanningsontwikkeling te constateren moet zijn. Reeds WINTON (1937) meende een dergelijke invloed op de contractie te kunnen vaststellen. De amplitude van de aan de spier opgedrongen sinusoidale lengteveranderingen verschilde afhankelijk van de toegepaste prikkeling. WINTON vond, dat de 'visceuse' invloed (wellicht overeenkomend met ons begrip grendeling) na voorafgaande d.c. het grootst was en het kleinst gedurende a.c. De 'visceuse' invloed was intermediair gedurende d.c. en na voorafgaande a.c. De door WINTON gevolgde methode ondervindt echter kritiek van LOWY en MILLMAN (1963). Zij merkten op, dat de amplitude van de lengteveranderingen afhangt van de gebruikte oscillatiefrequentie en minder het gevolg is van de toegepaste prikkeling. Trouwens PRYOR (1950) verkreeg met de dwarsgestreepte gastrocnemius soortgelijke resultaten als WINTON met de ABRM. Het lijkt daarom gewenst naar een andere wijze van benadering om te zien. Wanneer er tijdens de contractie al grendeling optreedt, dan kan men verwachten, dat deze grendeling de *recovery*-spanning na *quick-release* beïnvloedt. Als de grendeling, die tijdens contractie ontstaat, groot is, zal de *recovery*spanning en de snelheid van spanningsstijging na *quick-release* kleiner zijn dan bij geringe grendeling het geval is. LOWY en MILLMAN (1963) hebben deze methode gebruikt om de r.a.c.-contractie en de ACh-contractuur met elkaar te vergelijken. Zij vonden geen verschil in de snelheid van spanningsstijging na *quick-release*. Hieruit zou volgen, dat er tijdens contractie geen invloed van de grendeling te zien is. Een waarneming, die precies het tegenovergestelde demonstreert, is door RÜEGG (1964) naar voren gebracht. Er bestaat volgens hem verschil tussen de verkortingsnelheid, *recovery*spanning en de snelheid van spanningsstijging

na *release* van met ACh tot contractuur gebrachte spieren, waarvan de grendeling in werking werd gezet met behulp van CO<sub>2</sub>-houdend zee-water (100 mm Hg), en spieren, die zich in hetzelfde milieu bevinden, maar in aanwezigheid van 5-HT (zie I.2.2.2.). Dit zou erop duiden, dat de grendeling wel invloed uitoefent op de snelheid van spanningsstijging na *release*.

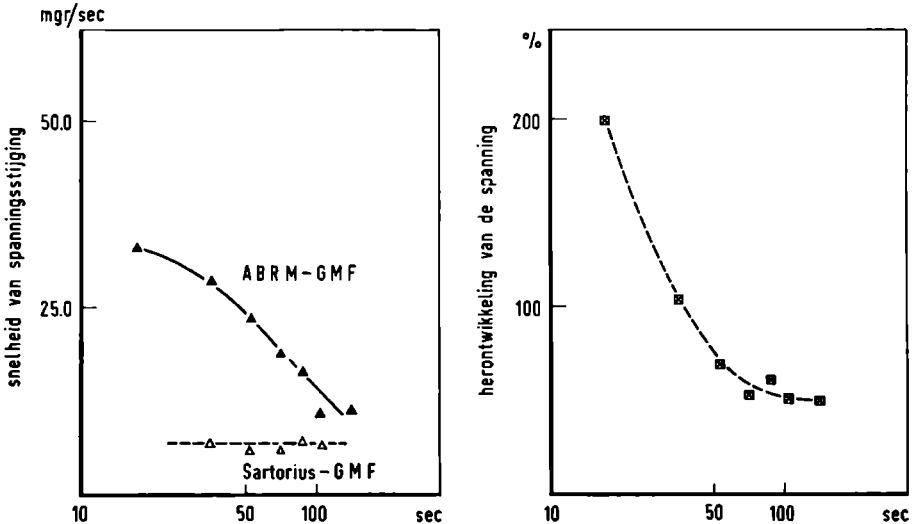
In verband met onze eigen waarneming, dat de ATPase-activiteit de grendeling in werking zet, dienen we nu na te gaan, hoe de *recovery*-spanning zich ontwikkelt onder invloed van de aanwezige grendeling. Dan zal blijken bij welke opvatting onze resultaten aansluiten.

### VI.1. Het *release-recovery*fenomeen bij GMF

GMF vertonen, evenals de spier, het *release-recovery*fenomeen (RüEGG en WEBER, 1963). De maatstaf, die men voor de mate van grendeling kan aanleggen, is de herontwikkeling van de spanning na *release*, dus de grootte van P na bepaalde tijd (waarvoor wij 10 sec. aanhielden) ten opzichte van de spanning P<sub>0</sub> vóór het *release*. Men kan ook de snelheid van spanningsstijging gebruiken. Deze varieert immers met de grootte van de grendeling. Om de grendeling tijdens activiteit te doen toenemen, maken we gebruik van het fenomeen, dat de tijdsduur van de activering de mate van grendeling beïnvloedt (zie hfdst. V.2.). Met langere activering neemt de spanningsrest, dus de grendeling toe, hetgeen tot gevolg zal hebben, dat de snelheid van spanningsstijging en de herontwikkeling van de spanning afnemen.

De GMF werden in een oplossing gebracht met een concentratie geïoniseerd Ca van  $5,5 \times 10^{-6}$  M (tabel III, kolom IV) om contractie te bewerkstelligen, waarna het *release* op verschillende tijdstippen plaats vond. Het *release* bedroeg 0,07 L<sub>0</sub>. We vinden nu, dat de stijgsnelheid van de *recovery*spanning inderdaad afneemt, naarmate het tijdsinterval tussen het begin van de activering en het *release* voortduurt (fig. 14, gemiddelden van 5 afzonderlijke GMF per punt). Gezien de rechtlijnige toeneming van de spanningsrest met de logaritme van de tijd in fig. 11 mocht men verwachten, dat ook de afnemende stijgsnelheid rechtlijnig met de logaritme van de tijd zou verlopen. De afwijking van het rechtlijnig verband, die optreedt bij de kortste *releasetijd* (17 sec.) is wellicht te wijten aan een nog niet volledig tot ontplooiing gekomen spanningsontwikkeling. Dit laatste wordt geadstrueerd door uitstijgen van de *recovery*spanning boven de spanning P<sub>0</sub>, die vlak voor het *release* aanwezig was (zie fig. 15). Aan de daling in de herontwikkeling van de spanning is eveneens te zien, dat de grendeling tijdens '*active-state*'

toeneemt. Men kan dus stellen, dat de grendeling tijdens de activiteit van de actomyosine-ATPase groter moet worden, omdat de stijgsnelheid van de *recoveryspanning* evenals de herontwikkeling van de spanning na *release* afnemen, tenzij deze grootheden kleiner zouden worden door een daling van de '*active-state*'.



Figuur 14

De invloed van de duur van het tijdsinterval tussen het begin van de activering en het *release* op de snelheid van spanningsstijging na *quick-release* bij GMF. Concentratie geïoniseerd Ca met ABRM-GMF:  $5,5 \times 10^{-6}$  M (zie tabel III, kolom IV). Concentratie geïoniseerd Ca met sartorius-GMF:  $1,4 \times 10^{-4}$  M (zie tabel III, kolom I).

Figuur 15

De invloed van de duur van het tijdsinterval tussen het begin van de activering en het *release* op de herontwikkeling van de spanning na *quick-release* bij ABRM-GMF. Concentratie Ca:  $5,5 \times 10^{-6}$  M (zie tabel III, kolom IV).

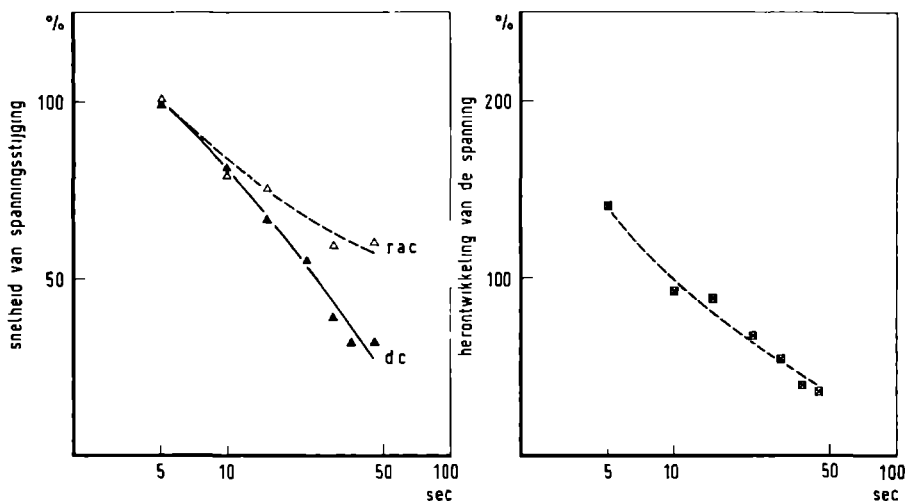
Volgens de oorspronkelijke opzet van RITCHIE (1954) is de grootte van *recoveryspanning* na *release* een maat voor de in de spier aanwezige bereidheid om actief spanning te genereren, dus van de '*active-state*'. Zou nu de '*active-state*' in GMF afnemen, naarmate de tijd van activering voortschrijdt? Dit is aan ABRM-GMF met behulp van de *quick-releasemethode* moeilijk te controleren, omdat er grendeling optreedt. We moeten dus zoeken naar een preparaat, waarin de '*active-state*' onder dezelfde condities als in de ABRM-GMF gerealiseerd wordt,

echter zonder dat deze door optredende grendeling vertroebeld wordt. Men mag verwachten, dat GMF van de dwarsgestreepte sartorius van Rana een verschijnsel als grendeling niet vertonen (zie inleiding). De dwarsgestreepte spieren bevatten actomyosine, maar niet het voor de grendeling verantwoordelijke tropomyosine  $\Lambda$ . In dit geval moet dus een eventueel optredende afnemng van de stijgsnelheid van de *recovery*-spanning na *quick-release* aan een daling van de '*active-state*' worden toegeschreven.

We hebben nu het boven beschreven *release*-experiment uitgevoerd met GMF van de sartorius. Dezelfde extractieprocedure als voor de ABRM werd gebruikt om deze GMF te vervaardigen. De sartorius-GMF vormen echter een veel moeilijker preparaat om mee te experimenteren, daar ze snel breken en moeilijk te splitsen zijn. Deze GMF zijn vóór het experiment ook niet te incuberen met een EDTA-ATP oplossing, daar ze in deze oplossing tot contractie komen. Zij zijn dus niet te gebruiken om er verslappingeffecten aan waar te nemen, maar wel om tijdens de contractie de stijgsnelheid van de *recovery*spanning na *release* te meten. De GMF werden tot contractie gebracht met een oplossing zonder EDTA en met een concentratie geïoniseerd Ca van  $1,4 \times 10^{-4}$  M (zie Tabel III, kolom I). Het resultaat van het experiment was, dat de stijgsnelheid van de *recovery*spanning op verschillende tijdstippen tijdens de contractie gelijk bleef na een *release* van 0,08  $L_0$  (zie fig. 14). De '*active-state*' neemt in sartorius-GMF dus blijkbaar niet af. Onder vergelijkbare omstandigheden komt nu de '*active-state*' in ABRM-GMF tot stand, waaruit volgt, dat de afnemng van de stijgsnelheid van de *recovery*spanning in ABRM-GMF het gevolg van optredende grendeling moet zijn.

## VI.2. Het *release-recovery*fenomeen bij de ABRM

Nu vastgesteld is, dat de grendeling bij GMF een belemmerende invloed heeft op de spanningsontwikkeling, willen we in het licht van de gegevens van RÜEGG (1964) en LOWY en MILLMAN (1963) nagaan of de grendeling dezelfde invloeden laat onderkennen in de contractuur van de spier. Hierbij wordt evenals in het geval van de GMF gebruik gemaakt van het effect van de factor tijd op de grendeling. Er werd reeds aangetoond, dat verlenging van de pulsduur in de *twitch* (fig.2) een grotere spanningsrest tot gevolg heeft. De spier werd met d.c. (circa 8 V) tot contractuur gebracht. Tegen de d.c.-contractuur heeft JEWELL (1959) bezwaren, omdat deze contracturen slecht reproduceerbare gegevens opleveren. Dit valt echter in de praktijk nogal mee. Pas in de vijfde



Figuur 16

Invloed van de duur van het tijdsinterval tussen begin van de prikkel en het *release* op de snelheid van spanningsstijging na *quick-release* bij spieren.

De snelheid van spanningsstijging na *release*, dat 5 sec. na begin van de prikkel gegeven werd, is op 100% gesteld. Milieu normaal zeewater.

Figuur 17

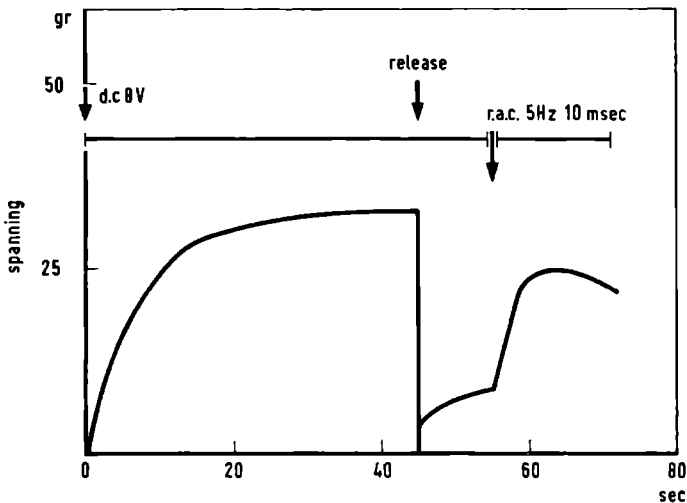
Invloed van de duur van het tijdsinterval tussen begin van de prikkel en het *release* op de herontwikkeling van de spanning na *quick-release* bij de ABRM.

Milieu normaal zeewater.

d.c.-contractuur produceert de spier een herontwikkeling van de spanning, die bij benadering 10% lager is dan in de eerste contractuur. Daarom werd de d.c.-prikkel op elke spier slechts viermaal toegepast. De in fig. 16 gegeven waarden zijn gemiddelden van 5-10 metingen per punt. De stijgsnelheid van de *recovery*spanning na het *release* ( $0,07 L_0$ ) op 5 sec. na het begin van de prikkeling werd voor de afzonderlijke spieren op 100% gesteld. (Deze stijgsnelheid bedroeg 4,33 gr/sec. gemeten over 10 sec., terwijl de grootste snelheid van spanningsstijging overeenkomt met de waarde gevonden door LOWY en MILLMAN (1963) ongeveer de helft van de spanning vóór het *release* per sec.). Het verband tussen de afnemende van de stijgsnelheid van de *recovery*spanning en de logaritme van de tijd stemt goed overeen met het in fig. 14 gevonden verband bij GMF. Zelfs de geringe afwijking van het rechtlijnig verband bij *release* na korte duur blijkt ook in de spier voor te komen.

Met de tijd neemt ook de herontwikkeling van de *recovery*spanning af (zie fig. 17). *Release* na 5 sec. geeft een herontwikkeling van de span-

ning boven 100% te zien, maar de spanningsontwikkeling in de spier verloopt sneller dan bij de GMF. Daarom gaat de herontwikkeling minder ver uit boven de spanning  $P_0$  vóór het *release* als bij de GMF. Onze bevindingen zijn dus, dat ook in de spier het *release-recovery* fenomeen laat zien, dat de grendeling tijdens contractie wordt ingezet, mits ook de '*active-state*' daarin niet terugloopt naarmate de contractie voortduurt. Om hier een indruk van te verkrijgen kan men de spier, nadat de *recovery* spanning zich na *release* op 45 sec. na het begin van de prikkeling heeft ontwikkeld, r.a.c. toedienen. R.a.c. elimineert de aanwezige grendeling. De snelheid van spanningsstijging zou opnieuw moeten toenemen, hetgeen ook inderdaad het geval blijkt te zijn (fig.18).



Figuur 18

De invloed van r.a.c. op de *recovery* spanning, nadat deze zich 10 sec. na *quick-release* heeft ontwikkeld. *Release* 45 sec. na begin van de prikkeling. Milieu: normaal zeewater.

Ontgrendeling doet de spanning ineens toenemen, maar dit kan ook het gevolg zijn van het stijgen van de '*active-state*' door het andere karakter van de toegepaste prikkel. Een tweede mogelijkheid, die openstaat om te kunnen vaststellen of de afneming van de stijgsnelheid toe te schrijven is aan grendeling, is de snelheid van de spanningsstijging te meten na *quick-release* in een r.a.c.-contractie (10 Hz, 10 msec.). Het *release* wordt gegeven op dezelfde tijdstippen als in de d.c.-contractuur. De spanningsstijging na *quick-release* gedurende de r.a.c.-contractie weerspiegelt waarschijnlijk niet de '*active-state*' van de

d.c.-contractuur, daar r.a.c. de spier sneller vermoeit dan d.c. De *recovery* na *quick-release* in een r.a.c.-contractie (fig.16), die langer duurt dan 10 sec., laat zien, dat de stijgsnelheid groter is dan die gedurende de d.c.-contractuur, omdat de grendeling gering is. Er blijkt ook uit, dat de '*active-state*' aanzienlijk afneemt, naarmate de r.a.c.-contractie voortduurt. Daar de grootte van de '*active-state*' in een d.c.-contractuur waarschijnlijk gunstiger uitvalt en de stijgsnelheid na *release* kleiner is ten opzichte van de r.a.c.-contractie, kan men tot de conclusie komen, dat de ontwikkeling van de *recovery*spanning door de toenemende grendeling gehinderd wordt, naarmate de d.c.-contractuur voortduurt.

### VI.3. Grendeling tijdens de ACh-contractuur?

Zonder bijzondere ingrepen, zoals pH-daling in de spiervezels door middel van CO<sub>2</sub>-houdend zeewater (RüEGG, 1964), zou er volgens LOWY en MILLMAN (1963) niets van een grendeling in de ACh-contractuur te bespeuren zijn. De stijgsnelheid van de spanning na *quick-release* is (zie tabel 2 van LOWY en MILLMAN, 1963) zowel in de r.a.c.-contractie als in de ACh-contractuur gelijk. Daarom werden deze metingen nog eens herhaald (tabel V).

**T a b e l V**  
 VERGELIJKING VAN DE SNELHEID VAN SPANNINGSSTIJGING  
 NA *QUICK-RELEASE* GEDURENDE R.A.C.-CONTRACTIE, ACh-  
 EN D.C.-CONTRACTUUR

*Quick-release* na 15 sec. vanaf begin prikkeling.

	I	II	III	IV
	piekspanning voor <i>release</i>	snelheid van spannings- stijging na <i>release</i>	snelheid van spannings- stijging II op basis piekspanning I = 100%	aantal spieren
r.a.c. 10 msec., 10 Hz	100%	100%	100%	7
ACh-prikkeling 3,0 µgr/ml	130%	99%	76%	7
d.c. 8 V	114%	97%	82%	7

De tabel geeft de relatieve waarden, die verkregen worden door de piekspanning en de snelheid van spanningsstijging in de r.a.c.-contractuur.



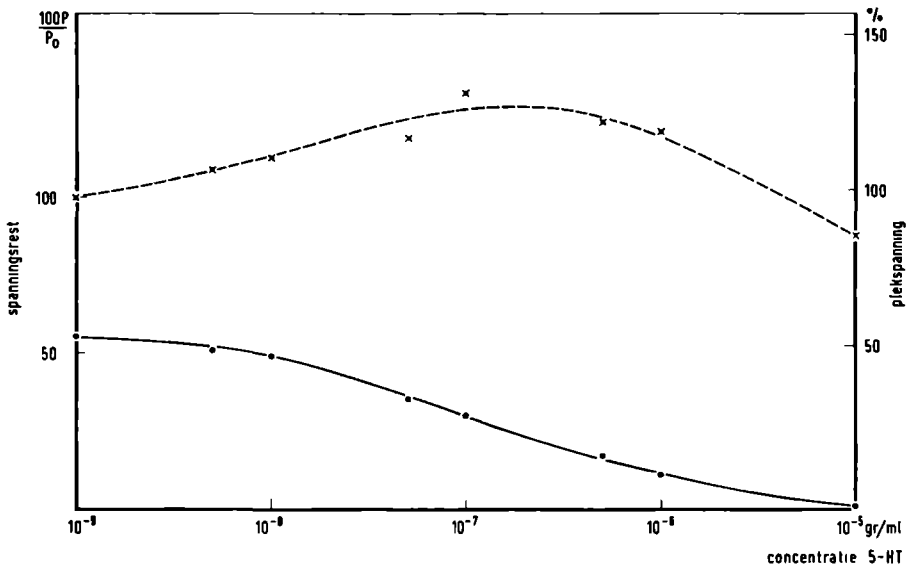
tie op 100% te stellen. Zoals kolom II van de tabel laat zien, is de stijgsnelheid van de *recovery*spanning zowel met r.a.c. als ACh en d.c. vrijwel gelijk. Dit resultaat stemt essentieel met dat van LOWY en MILLMAN overeen. Dit geldt evenzeer met betrekking tot het v e r s c h i l in piekspanning tussen de r.a.c.-contractie en de ACh-contractuur. Dit duidt erop, dat de '*active-state*' in de r.a.c.-contractie niet gelijk is aan die van de contracturen. De piekspanning vóór het *release* is immers evenzeer een uiting van de '*active-state*', welke op een bepaald moment in een spier heerst. Aangezien er in de ACh- en d.c.-contractuur meer piekspanning ontwikkeld wordt dan in de r.a.c.-contractie, moet men verwachten, dat de '*active-state*' in de contracturen groter is. De consequentie hiervan zou zijn, dat de snelheid van spanningsstijging na *release* in de contracturen moet toenemen, hetgeen echter niet het geval is.

In kolom III van tabel V is nu de snelheid van spanningsstijging uit kolom II weergegeven op basis van een gelijke '*active-state*' vóór het *release*, waarbij de piekspanning uit kolom I (maat voor deze '*active-state*') als 100% genomen werd. De op deze wijze berekende snelheid van de spanningsstijging is in de r.a.c.-contractie volgens de symmetrietoets van WILCOXON significant groter (onbetrouwbaarheidsdrempel  $\alpha = 0,05$ ) dan in de ACh- of d.c.-contractuur. Wanneer men er rekening mee houdt, dat de piekspanning in de ACh- en d.c.-contractuur groter zou moeten zijn dan ze in feite door toegenomen grendeling is, zou de uitkomst van de redenering zelfs nog gunstiger uit kunnen vallen dan de cijfers in kolom III van de tabel aangeven. Uit dit alles blijkt, dat de spanningsontwikkeling in de ACh-contractuur evenzeer door toenemende grendeling gehinderd kan worden.

#### VI.4. De invloed van 5-HT op de piekspanning

We hielden ons in bovenstaande experimenten bezig met de invloed van de grendeling tijdens contractie. Men kan nu de grendeling geheel of gedeeltelijk wegnemen met 5-HT. Ontgrendeling moet een gunstige invloed op het ontwikkelen van de spanning met zich meebrengen.

Dat dit inderdaad het geval is, bewijst fig. 19. De in de grafiek weergegeven waarden zijn gemiddelden van 6 spieren. De piekspanning is uitgedrukt in procenten, waarbij de piekspanning bij  $10^{-9}$  gr 5-HT/ml op 100% werd gesteld. Tussen twee opeenvolgende concentraties 5-HT werd de spier gewassen met 2 volumens normaal zeewater. Het 5-HT-gehalte werd in de volgorde  $10^{-9}$  gr 5-HT/ml tot  $10^{-5}$  gr/ml opgevoerd.



Figuur 19

De invloed van 5-HT op de piekspanning en spanningsrest van een *twitch*, opgewekt met een puls van 200 msec.

De piekspanning bij 10<sup>-9</sup> gr 5-HT/ml werd op 100% gesteld.

Piekspanning: x-----x en spanningsrest: ●——●. Milieu: normaal zeewater.

De *twitch*, die met een puls van 200 msec. werd opgewekt, verslapt meer naarmate de concentratie 5-HT toeneemt. Met de concentratie 5-HT neemt nu de piekspanning toe tot een optimum bij ongeveer 10<sup>-7</sup> gr 5-HT/ml, waarna weer een daling van de piekspanning volgt. Dit optimum varieert voor de afzonderlijke spieren van 5 × 10<sup>-7</sup> gr 5-HT/ml tot 5 × 10<sup>-8</sup> gr 5-HT/ml. In het algemeen kan men zeggen, dat ontgrendeling, mits niet te sterk, ten gunste van de spanningsontwikkeling werkt. Wordt de spier echter volledig ontgrendeld, dan ondervindt de spanningsontwikkeling een te geringe ondersteuning (III.6.). Met ondersteuning wordt bedoeld, dat de spier door middel van een geringe vergrendeling in staat is de eenmaal ontwikkelde spanning vast te houden tijdens de contractie, terwijl de hinder, die de vergrendeling zou veroorzaken, minimaal is. Neemt men ook deze ondersteuning door een grotere concentratie 5-HT weg, dan is de ABRM niet meer in staat die grote spanningen te leveren, welke met optimale ondersteuning gevonden worden.

## VI.5. Discussie

De tot nu toe uitgevoerde onderzoeken hebben laten zien, dat de ATPase-activiteit tijdens de contractie de grendeling in werking zet. De grendeling op haar beurt hindert de spanningsontwikkeling. Deze hinder treedt nog duidelijker aan het licht, wanneer een pH-daling in de spiervezels wordt veroorzaakt door  $\text{CO}_2$  (RüEGG, 1964). Hieruit moet volgen, dat de grendeling toegeschreven moet worden aan een verandering in de toestand van het in deze spier aanwezige paramyosine, dat immers pH-gevoelig is (zie inleiding). Men moet dus aannemen, dat de spier tijdens contractie vergrendeld wordt, doordat ten gevolge van de optredende activiteit de toestand van het paramyosine gewijzigd wordt. Er is geen sprake van, dat alleen het actomyosine voor deze grendeling verantwoordelijk zou zijn, gezien het gedrag van de uit de ABRM geprepareerde actomyosinedraden (RüEGG, 1965). Ons *release*-experiment met de sartorius-GMF, welke geen tropomyosine A bevatten, wijst in dezelfde richting. Het langzame verbreken van de bindingen in het *sliding*-filamentmechanisme moet dus toegeschreven worden aan de aanwezigheid van het paramyosine in combinatie met het actomyosine. De toestand van het paramyosine in een bepaald filament zou dus de verbrekingssnelheid van de bindingen bepalen, terwijl de interactie tussen het actine en het myosine de vormingssnelheid van de bindingen beheerst. Het gevolg hiervan is, dat reeds vergrendelde bindingen de contractie kunnen hinderen.

Een zekere mate van grendeling blijkt noodzakelijk om de spier in staat te stellen haar maximale spanning te ontwikkelen. Bij maximale activiteit moet men een optimale grendeling verwachten, echter geen maximale piekspanning. Deze verkrijgt men met een lagere activiteit, wanneer de grendeling een optimale ondersteuning geeft, dus geringer is.

De mate van grendeling bepaalt ook de grootte van de spanningsrest na afloop van de contractie. De spanning wordt na het verdwijnen van de contractiele activiteit blijkbaar zonder tussenkomst van de ATPase in het actine-myosineparamyosinecomplex vastgehouden. Men zou dus in overeenstemming met de bij de GMF verkregen resultaten verwachten, dat ook bij de spier een S-vormige toeneming van de spanningsrest samen zou gaan met een overeenkomstige toeneming van de spanning. Dit blijkt echter slechts ten dele juist, daar piekspanning en spanningsrest in de spier blijkbaar niet geheel gelijk S-vormig verlopen. Behalve de in de contractie aanwezige intrinsieke factoren blijken nog andere invloeden de grootte van de verslapping te bepalen, zoals bijvoorbeeld

het Ca-gehalte van het zeewater (zie hfdst. IV). In het volgende hoofdstuk wordt nu getracht aan de hand van de werking van verschillende verslappingsprikkelers na te gaan, welke invloed er uitgaat van de zo belangrijke koppelingsfactor Ca op de verslapping.



## HOOFDSTUK VII

### DE VERSLAPPING

De verslapping van de ABRM wordt beperkt door de mate van grendeling, waarin deze verkeert. De verslapping van een in grendeling verkerende spier wordt versneld door r.a.c. toe te passen of 5-HT aan het zeewater toe te voegen. De verslapping wordt ook beïnvloed door de in het zeewater aanwezige concentratie Ca (hfdst.IV.2.). Ca-gebrek laat de spanningsrest langer bestaan dan in normaal zeewater en verhoging van de concentratie Ca boven het normale zeewatergehalte versnelt de verslapping (fig.8). Er zijn een drietal mogelijkheden ter verklaring van dit resultaat:

1. Volgens RÜEGG (1961)hardt Ca tropomyosinedraden door een che-laat te vormen met niet-gebonden ATP, dat een weekmakende werking op deze draden heeft. Als dit de door Ca in de spier op de verslapping uitgeoefende werking zou zijn, zou men door verhoging van de concentratie Ca een verlangzaming van de verslapping verwachten. Dit blijkt niet het geval te zijn.

2. Vervolgens zou deze werking van Ca gerealiseerd kunnen worden door hyperpolarisatie van de vezelmembraan, maar dat is eveneens uitgesloten door het werk van JOHNSON en TWAROG (1960), die konden vaststellen, dat hyperpolarisatie de spier na afloop van de contractie niet sneller doet verslappen.

3. Ca zou, evenals in de contractie, ook in de verslapping als activator kunnen werken. Dan moet men aannemen, dat de verslapping gepaard gaat met, weliswaar geringe, ATPase-activiteit. Naarmate dus deze activiteit door verhoging van de concentratie Ca in het milieu enigszins zou toenemen, zou de verslapping versneld worden. Dit beeld komt overeen met de zichtbare werking van Ca, die wij in IV.2. konden vaststellen. Deze activiteit moet gering zijn, wil er tenminste nog een verslapping ontstaan. Er moet dus een grens gesteld zijn aan deze activiteit, omdat, zoals we zagen, de spanning niet wordt gehandhaafd door Ca, maar juist afneemt. Om de gedachte te bepalen betreffende de concentratie Ca, waar het in de verslapping om gaat, kan men ervan uitgaan, dat na afloop van een contractie de concentratie Ca bij het actomyosine daalt

tot de rustwaarde. Deze waarde ligt waarschijnlijk onder de mechanische drempel (ongeveer  $10^{-7}$  M Ca). Verhoging van de concentratie Ca in het zeewater leidt immers niet tot overschrijding van de mechanische drempel, anders zou de verslapping afnemen in plaats van toenemen. In dit hoofdstuk wordt getracht aan de hand van verschillende verslappingsprikkelers na te gaan of bij de verslapping geringe activiteit een rol speelt.

### VII.1. De invloed van Ca op de werking van 5-HT

Verslapping van een reeds aanwezige spannings- of verkortingsrest kan men verkrijgen met r.a.c. Zoals we zagen, zou de aanwezige spanningsrest in dit geval door intermitterende activiteit, vergezeld van een geringe ontwikkeling van de grendeling, worden geëlimineerd. Het opwekken van de grendeling tijdens deze prikkeling is dus gering. Volgens TWAROG (1954) moet een met r.a.c. vergelijkbare werking aan 5-HT worden toegeschreven. 5-HT komt werkelijk in de spier voor en tevens werd een amino-oxydase gevonden, die het eventueel gevormde 5-HT kan afbreken (BLASCHKO en HOPE, 1957). 5-HT wordt aangezien voor een zogenaamde *relaxant*, d.w.z. een stof, die de verslapping van de spier onder controle houdt. Het is goed mogelijk, dat deze stof door de vanuit het pedale ganglion naar de spier verlopende zenuw wordt overgedragen. Als deze zenuw in werking treedt, zou door afscheiding van 5-HT de spier verslappen. (Zoals we zagen, is de afscheiding van 5-HT in de r.a.c.-contractie overbodig, omdat de ontwikkelde grendeling slechts gering is (zie ook I.2.2.4.)). De vraag, die ook LOWY en MILLMAN (1963) interesseert, is: hoe bewerkt 5-HT de verslapping? We hebben reeds kunnen zien (fig.7), dat de werking van 5-HT afhangt van de aanwezigheid van Ca. Wanneer we Ca beschouwen als de activator van het actomyosine (hfdst.IV en V) kan men veronderstellen, dat de verslapping met 5-HT tot stand komt, gepaard met ATPase-activiteit. Is er bewijs voorhanden, dat er activiteit plaats vindt tijdens de verslapping door 5-HT?

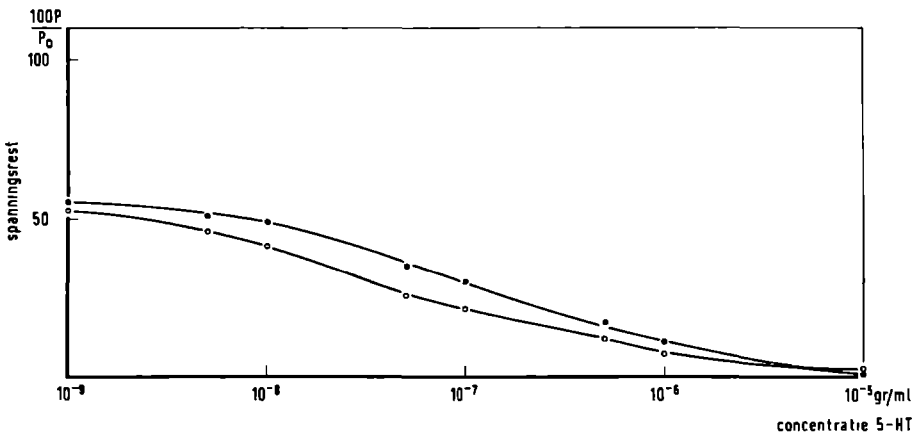
1. Volgens MINIHAN en DAVIES (1965) is er gedurende de verslapping door 5-HT een fosfaatafsplitsing van  $0,2 \mu\text{M Pi/gr}$  waar te nemen.

2. Bovendien is volgens dezelfde auteurs, gepaard aan de verslapping, een vrijmaken van Ca uit de spier te constateren. Na het toevoegen van het 5-HT ( $4 \times 10^{-5}$  gr/ml) blijft het vrijgemaakte Ca wel 5 minuten aanwezig, welke periode met bijvoorbeeld ACh veel korter is. 5-HT mobiliseert kennelijk sterk-gebonden Ca.

3. Wij zagen reeds (fig. 7), dat de werking van 5-HT afhankelijk is van

de aanwezigheid van Ca. Het effect van het onttrekken van Ca op de verslapping door 5-HT laat zich pas demonstreren ter hoogte van het verdwijnen van de d.c.-contractuur, hetgeen dus eveneens duidt op het mobiliseren van sterk-gebonden Ca. Deze waarneming bevestigt het experiment van MINIHAN en DAVIES.

4. Tenslotte blijken, zoals fig. 20 laat zien, 5-HT en toeneming van het Ca-gehalte tot 30 mM in dezelfde richting te werken. De spier werd met een 200 msec. puls tot contractie gebracht in aanwezigheid van verschillende concentraties 5-HT. De opgegeven waarden stellen gemiddelden voor van 5-6 spieren. Verhoging van de concentratie Ca versterkt de werking van 5-HT, zoals Ca-gebrek haar verzwakt.



Figuur 20

De invloed van toeneming van het Ca-gehalte op de verslapping met verschillende concentraties 5-HT in normaal zeewater: ●—● en in zeewater met 30 mM Ca: ○—○.

Dit zijn de argumenten ten gunste van activiteit tijdens verslapping door 5-HT. Een resultaat, hiermee in tegenspraak, n.l. de waarneming van RÜEGG (1965), dat er ondanks inactivering van de actomyosine-ATPase door 0,6 M thiourem een verslapping met 5-HT kan worden verkregen, is reeds behandeld in IV.3. Door meer volledige inactivering met 1,0 M thiourem bleef de verslapping door 5-HT achterwege. We willen nu enige aandacht schenken aan de grootte van de activiteit, waarmee de werking van 5-HT gepaard gaat. Er blijkt volgens MINIHAN et al. (1965) ongeveer 0,40  $\mu$ M Pi/gr spier te worden afgesplitst van argininefosfaat tijdens de ACh-contractuur en 0,20  $\mu$ M Pi/gr in de ver-



slapping met 5-HT, waarin ongeveer 0,05  $\mu\text{M}$  Pi/gr werd gereserveerd voor de werking van de Ca-pomp. Wanneer we aannemen, dat er ongeveer 30 sec. arbeid wordt verricht om de spier 30% te doen verkorten, terwijl de verslappingsarbeid met  $4 \times 10^{-5}$  gr 5-HT/ml zeker één minuut in beslag neemt, verkrijgt men voor het opwekken van de contractuur een waarde van de ATPase-activiteit van 0,8  $\mu\text{M}$  Pi/gr/minuut en voor de verslapping 0,15  $\mu\text{M}$  Pi/gr/minuut. Daar men mag aannemen, dat de gebruikte concentratie ACh ( $3,8 \times 10^{-4}$  gr/ml) optimale activiteit geeft, ligt de ATPase-activiteit, die de verslapping begeleidt, ruimschoots onder de mechanische drempel (zie fig. 10). De ATPase-activiteit gedurende de verslapping is dus zó laag, dat er geen mechanische activiteit in de vorm van spanning te registreren zal zijn. Een tweede argument, dat de tijdens verslapping met 5-HT optredende activiteit onder de mechanische drempel blijft, is, dat er in aanwezigheid van 30 mM Ca in het zeewater geen contractiepiek met de hoogste concentratie 5-HT optreedt. De inductie van de verslapping met r.a.c. heeft immers wel een contractiepiek tot gevolg voordat de verslapping intreedt.

De conclusie lijkt dus gerechtvaardigd, dat de verslapping door 5-HT gepaard gaat met onderdrempelige activiteit. Deze verslapping is duidelijk een werking van de vezelmembranen of de koppeling, daar 5-HT de GMF niet doet verslappen, terwijl TWAROG (1960 b) aanzienlijke elektrische activiteit tijdens verslapping met 5-HT heeft waargenomen. Niettemin is het nog niet duidelijk welke invloed 5-HT precies op de membraan of de koppeling heeft, temeer daar hoge concentraties 5-HT de grendeling irreversibel teniet doen. Als 5-HT alleen maar een geringe hoeveelheid Ca zou vrijmaken bij het actine-myosineparamyosine-complex, dan zou 5-HT de '*active-state*' doen toenemen, hetgeen niet in overeenstemming met alle resultaten is (zie III.6.). De specifieke werking van 5-HT is echter nog duister.

Om de veronderstelling, dat de verslapping in de ABRM gepaard gaat met geringe activiteit of dat versnelling van de verslapping volgt na geringe activiteit, enigszins te ondersteunen, worden onder VII.2., 3. en 4. nog enige experimenten beschreven, waarbij de geringe activiteit wordt opgewekt door middel van Ca, een lage concentratie ACh bij spieren en een lage concentratie niet-gebonden ATP bij GMF.

## VII.2. De werking van Ca op een getrypsineerde spier

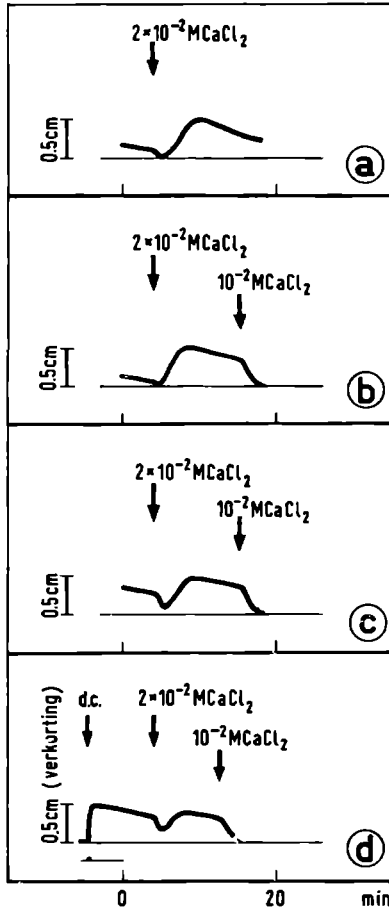
Zoals reeds in de inleiding werd beschreven, is de ontdekking van Ca als koppelingsfactor gevolgd op de waarneming, dat injectie van Ca in een spiervezel een contractie veroorzaakte. Door ons werd een derge-

lijk experiment nuttig geacht om het effect van injectie van lage concentraties Ca op de verslapping te bestuderen. Omdat de diameter van de spiervezels van de ABRM slechts enkele microns bedraagt, is een injectie van Ca niet mogelijk. We deden daarom een poging de membraan te openen met trypsine, want trypsinervertering veroorzaakt volgens HOLTZMAN en AGIN (1965) een daling van de rustpotentialiaal van de membraan bij de sartorius van Rana. Uit dit feit zou men kunnen vermoeden, dat de vezelmembraan gedeeltelijk door trypsine wordt afgebroken, waardoor een gedeelte van de spier gemakkelijker toegankelijk zou worden voor Ca.

Het experiment werd nu als volgt uitgevoerd: met een pasteurs pipetje werd 1 druppel 0,1 mgr/ml trypsine op de ABRM gelegd. We lieten de trypsine 1 minuut inwerken. Het restant van de trypsinedruppel werd daarna met zeewater gewassen. Op het trypsinevenster, dat zo ontstaan was, werd  $\text{CaCl}_2$  gedruppeld. We zagen nu op  $2 \times 10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$  een contractuur ontstaan met een grote verkortingsrest (zie fig. 21a). Op een lagere concentratie  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-2}$  M) werd de verslapping versneld (b). Als er nog een grote verkortingsrest aanwezig was, dan veroorzaakte toedienen van  $2 \times 10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$  vóór het inzetten van de verkorting eerst een gedeeltelijke eliminatie van deze verkortingsrest (c). Aan de verkorting blijkt dus een verslapping vooraf te gaan.

Een dergelijk verschijnsel werd het eerst door YEO (1888) bij dwarsgestreepte spieren waargenomen; RAUH (1922) was de eerste die het verschijnsel nader bestudeerde, terwijl het door SANDOW (1944-1952) uitvoerig is onderzocht. De precontractiele verslapping werd door SANDOW *latency relaxation* genoemd. SANDOW liet zich echter niet uit over het mechanisme en de naam *latency relaxation* liet de interpretatie toe, dat er een remming door restanten contractiele activiteit in het geding zou zijn. POSTMA (1956) veronderstelde, dat de kleine verslapping voor de contractie toe te schrijven zou zijn aan ontgrendeling. Tijdens rekking van het pedaalpreparaat (cerebraalganglia verwijderd) van de voet van *Helix pomatia* treedt *latency relaxation* zeer frequent en spontaan op. Naarmate de *latency relaxation* toenam, werd de daaropvolgende verkorting groter. POSTMA interpreteerde dit verschijnsel als een ontgrendeling ten gunste van de contractiliteit van de voet. De spier zou dus eerst ten gevolge van beginnende activiteit enige belemmeringen voor de contractie wegnemen, zodat de verkorting onder de gegeven omstandigheden maximaal zou kunnen zijn. Wat betreft de dwarsgestreepte spier kan men zich met betrekking tot deze interpretatie voorstellen, dat de beginnende activiteit zo gering is, dat het verbreken van de bindingen tussen het actine en myosine nog de overhand

heeft op het vormen van de bindingen. Dit zou dan een kleine verslapping tot gevolg hebben. Zeer recent komt SANDOW op de *latency relaxation* terug en wijst een verbreken van de bindingen van de hand (1966). Hij schrijft het verschijnsel toe aan een spanningsverandering van de *longitudinal columns* van het s.r., dus van een structuur parallel aan de filamentaire contractiele actomyosinecomponent. Ca-afgifte door de laterale cisternae zou via osmotische werking een spanningsverlies veroorzaken en aanleiding geven tot een inleidende verslapping.



Figuur 21

De werking van Ca in een trypsinevenster van de spier.

In de figuur is aangegeven op welk tijdstip 1 druppel  $\text{CaCl}_2$  op het trypsinevenster werd gebracht en in welke concentratie.

Belasting 5 gr. Milieu: normaal zeewater. Nadere verklaring: zie tekst.

In de ABRM is er slechts weinig s.r. aanwezig, zodat de laatste interpretatie van SANDOW waarschijnlijk niet de juiste is om de verslapping vóór de verkorting te kunnen verklaren. Ons experiment, waarbij  $\text{CaCl}_2$  op een trypsinevenster wordt gedruppeld, is duidelijk een argument ten gunste van de interpretatie, welke POSTMA aan de *latency relaxation* geeft. De beginnende lage activiteit ten gevolge van het binnendringen van het Ca elimineert eerst de grendeling gedeeltelijk om daarna, wanneer de concentratie Ca toeneemt, over te gaan tot een grotere activiteit, hetgeen leidt tot contractuur. Blijkbaar heeft dus een lage activiteit een ontgrendelende werking.

### VII.3. Een verslappingsprikkel in de vorm van een lage concentratie ACh (0,5 $\mu\text{gr/ml}$ )

Een grote concentratie ACh veroorzaakt een aanzienlijke activiteit, waaraan gepaard een grendeling optreedt. Een lagere concentratie ACh veroorzaakt een geringere activiteit, waardoor minder grendeling wordt opgewekt. We hebben nu een poging gedaan om de spanningsrest, die na een contractuur met 1,28  $\mu\text{gr ACh/ml}$  aanwezig blijft, sneller te doen verdwijnen door het toedienen van een verslappingsprikkel. Het mechanogram in fig. 22 laat een contractuur zien, welke met 1,28  $\mu\text{gr ACh/ml}$  werd opgewekt. Na uitwassen van de ACh blijft een spanningsrest aanwezig. Dienen we na 470 sec. 0,5  $\mu\text{gr ACh/ml}$  toe, dan ontstaat een geringe contractuur, die na uitwassen van de ACh sneller blijkt te verslappen dan de contractuur, welke met de grotere concentratie ACh werd opgewekt. In het mechanogram wordt ook het verloop van de verslapping weergegeven, zonder dat er een verslappingsprikkel werd gegeven. Door de gemiddelde verslappingsconstante te bepalen (zie II.6.) van de laatste vijf waarden van de spanning vóór het toedienen van de verslappingsprikkel, konden we de nog te verwachten waarden berekenen. Van een lage concentratie ACh wordt verondersteld, dat zij een geringe concentratie Ca uit het s.r. vrijmaakt, welke op haar beurt een geringe activiteit bewerkt. Dit leidt tot een contractuur, die echter gepaard blijkt te gaan met opwekken van minder grendeling dan er oorspronkelijk aanwezig was, met het gevolg, dat de spier na afloop van de prikkeling sneller gaat verslappen. Er zij met nadruk op gewezen, dat deze activiteiten boven de mechanische drempel liggen.

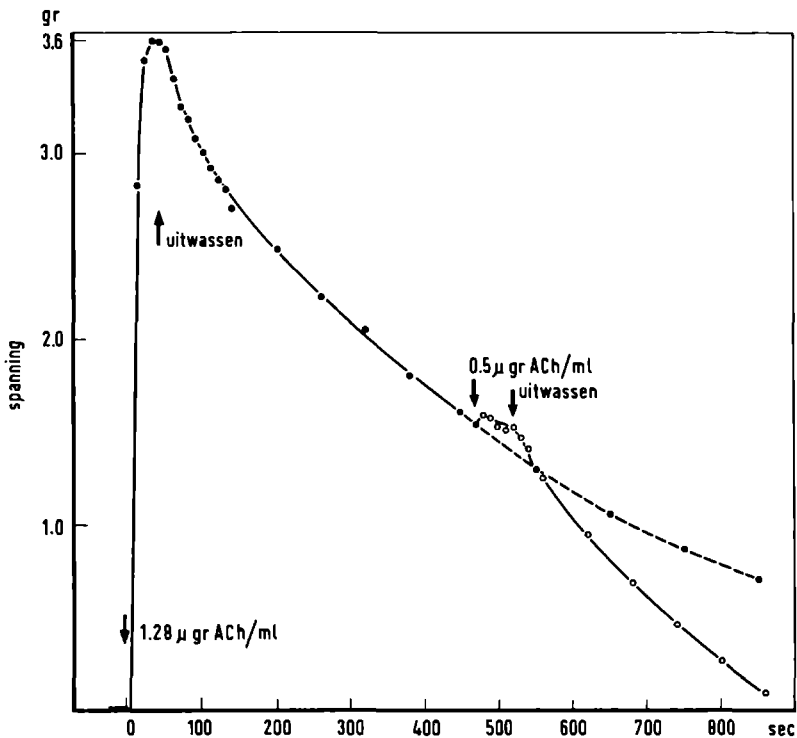
Bovendien biedt dit experiment een alternatief voor de wijze, waarop de verslapping door de zenuw, die de ABRM innerveert, geregeld kan worden.

1. Zoals we reeds zagen, is het mogelijk, dat deze zenuw 5-HT vrij-

maakt, waardoor de spier verslapt (zie I.2.2.4. en VII.1.).

2. De tweede mogelijkheid nu bestaat daarin, dat de concentratie van het door deze zenuw overgedragen ACh door middel van bijvoorbeeld de ontladingsfrequentie geregeld zou worden. Als de zenuwimpulsen laagfrequent bij de spier arriveren, dan zal de spier, wanneer zij in grendeling verkeert, gaan verslappen. Is de ontladingsfrequentie echter hoog, hetgeen een grotere overdracht van ACh tot gevolg zou hebben, dan ontstaat er een contractie met grote grendeling.

Welke van de twee mogelijkheden echter de voorkeur verdient, is op dit moment niet te beslissen.



Figuur 22

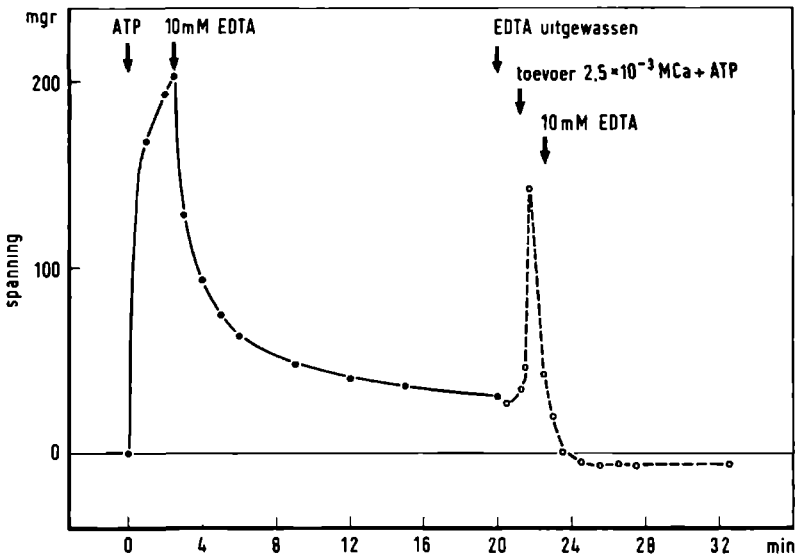
De invloed van 0,5 µgr ACh/ml op de verslapping na een contractuur, opgewekt met 1,28 µgr ACh/ml.

Verslapping na contractuur met 1,28 µgr ACh/ml: ●—●.

Verslapping na toedienen van 0,5 µgr ACh/ml: ○—○.

Berekend verder verloop van de verslapping na 1,28 µgr ACh/ml: ●- - - -●.

VII.4. Verslapping met een lage concentratie niet-gebonden ATP bij GMF



Figuur 23

De werking van een lage concentratie niet-gebonden ATP op een bestaande spanningsrest bij een GMF.

Contractie en spanningsrest, voordat de lage concentratie niet-gebonden ATP werd toegediend: ●—●. Contractie en verslapping na toedienen van de lage concentratie niet-gebonden ATP: o-----o.

Wij hebben aan de spier gevonden, dat een na grote activiteit overgebleven spanningsrest door een verslappingsprikkel in de vorm van een lagere activiteit sneller verdwijnt. We willen nu nagaan of dit fenomeen ook bij GMF optreedt, waarbij we de grootte van de activiteit beter in de hand hebben. Daartoe veroorzaken we eerst op de gewone wijze (EDTA-ATP oplossing met een concentratie geïoniseerd Ca van  $5,5 \times 10^{-6}M$ , zie tabel III, kolom IV) een contractie van de GMF, waaruit een behoorlijke spanningsrest resulteert (zie fig. 23). Na 20,5 min. werd de 10 mM EDTA, welke diende om na de eerste contractie de ATPase te inactiveren, uitgewassen. Het resultaat hiervan was, dat er een geringe spanningsontwikkeling optrad. Daarna werd op 21,5 min. de verslappingsprikkel in de vorm van een lage concentratie niet-gebonden ATP toegediend in aanwezigheid van een concentratie  $Ca_{tot.}$  van  $2,5 \times 10^{-3}M$  (zie tabel IV, kolom VII). Dit leidt tot een contractie van

de GMF, die reeds begint te verdwijnen, voordat na 22,5 min. de ATPase met 10 mM EDTA wordt geïnactiveerd. Nadat deze inactivering haar beslag heeft gekregen, blijkt de spanning zelfs tot onder het basisniveau van de spanning in de eerste contractie te zijn gedaald. Het verdwijnen van de spanning reeds tijdens de contractie, voordat de ATPase geïnactiveerd wordt, kan men toeschrijven aan de verlaging van de concentratie niet-gebonden ATP van 0,66 mM, welke tevoren aanwezig was, tot 0,19 mM door de grote hoeveelheid Ca, welke de GMF binnendringt. Hierdoor neemt immers de ATPase-activiteit af, hetgeen nog tijdens de contractie resulteert in een daling van de spanning. De verslappingsprikkel in de vorm van een lage concentratie niet-gebonden ATP veroorzaakt een veel geringere activiteit dan in de eerste contractie met een hoge concentratie niet-gebonden ATP het geval was. De opgewekte grendeling is daardoor veel lager in de contractie, die tot verslapping moet induceren. Dit leidt nu na inactivering van de ATPase tot een meer dan volledige verslapping van de GMF. We kunnen dus vaststellen, dat men ook ten aanzien van de GMF kan laten zien, dat een lagere activiteit de grendeling vermindert, hetgeen tot een grotere verslapping leidt.

## VII.5. Discussie

De verslapping van de ABRM hangt op de eerste plaats af van de mate, waarin de spier vergrendeld wordt tijdens contractie. De toestand van het paramyosine zou beslissend zijn voor de snelheid, waarmee de bindingen tussen het actine en het myosineparamyosinefilament verbreken (zie vorige hfdst.). Volgens de contractietheorie van DAVIES (1963) zou de verbreking van de bindingen gepaard moeten gaan met splitsing van ATP, dus ATPase-activiteit. Aangezien deze activiteit afhangt van de aanwezige concentratie Ca, moet toeneming van het Ca-gehalte in het milieu een verslappende werking hebben, mits aan twee voorwaarden is voldaan. De eerste voorwaarde is, dat Ca de spier kan binnendringen, hetgeen blijkbaar het geval is, gezien de waargenomen effecten. Het in de ABRM schaars aanwezige s.r. en de vezelmembraan mogen het Ca dan ook niet zo snel wegpompen als het binnendringt. De tweede voorwaarde is, dat het s.r. ervoor zorgt, dat de concentratie Ca niet zó hoog wordt, dat de mechanische drempel wordt overschreden. In dit licht kan men de lange aanloop, die de concentratie Ca van circa  $10^{-8}$  M tot  $10^{-7}$  M moet nemen, verdisconteren, voordat er een meetbare spanningsontwikkeling komt. Er is dus sprake van, dat ook de koppeling een rol speelt in de verslapping. Bij een bepaald Ca-gehalte van het zeewater is de ATPase-activiteit tijdens de verslapping continu en

constant, zodat in dit geval de verslapping voornamelijk zal afhangen van de grendeling van de spier.

Ook de verslappingsprikkelers veroorzaken een bepaalde mate van ATPase-activiteit, welke vrijwel altijd boven de mechanische drempel ligt. Als de activiteit, die met deze prikkels gepaard gaat, lager is dan de activiteit, waardoor een bepaalde grendeling veroorzaakt werd, volgt er na afloop van de prikkeling een grotere verslapping. Deze geringere activiteit zal de vergrendelde bindingen verbreken en een nieuwe toestand van vergrendeling in het leven roepen, die beantwoordt aan het lagere niveau van deze activiteit. Duidelijke voorbeelden hiervan zijn de verslapping na  $0,5 \mu\text{g}$  ACh/ml en de verslapping van de GMF door middel van een lage concentratie niet-gebonden ATP.

Ofschoon de werking van 5-HT overigens onduidelijk is, blijkt deze wel gepaard te gaan met activiteit. Deze activiteit is waarschijnlijk van het continue onderdrempelige type, wanneer de stof eenmaal de spier is binnengedrongen.

De spier doorloopt verschillende activiteitsfasen, wanneer Ca via het trypsinevenster de spier binnenkomt. Eerst is de activiteit gering en worden de bindingen gesplitst zonder weer vergrendeld te worden. Daarna wint de activiteit veld, waardoor zij boven de drempel stijgt en de contractuur inzet, terwijl de grendeling dan eveneens begint toe te nemen.

Al deze werkingen worden beheerst door de ATPase-activiteit en men ziet een invloed van de parameters, die de grootte van de ATPase-activiteit bepalen. Ca is één van die parameters. Een hoge concentratie Ca in het milieu van de spier zal tijdens de contractie een grote grendeling veroorzaken, doordat er meer Ca per bepaalde prikkel vrijgemaakt wordt. Na afloop van de contractie wordt onder deze omstandigheden een grotere verslapping teweeggebracht, doordat de verslappingsactiviteit is toegenomen als gevolg van een verhoogde penetratie van Ca. Het is daarom noodzakelijk de verschillende werkingen, die het gevolg zijn van toe- of afneming van het Ca-gehalte in het zee-water, zorgvuldig te analyseren om te kunnen vaststellen welk van de bovengenoemde processen de grootte van de verslapping bepaalt. Wij gaan dit doen in het volgende hoofdstuk.





## HOOFDSTUK VIII

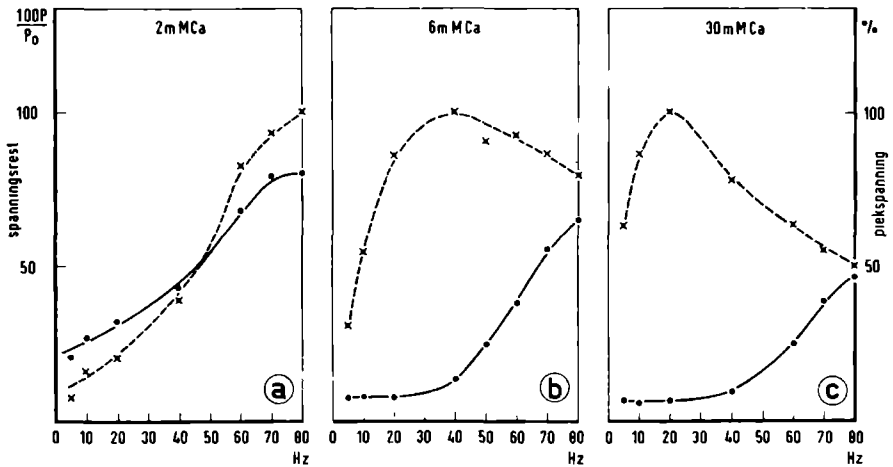
### DE WERKING VAN Ca IN CONTRACTUUR EN TETANUS

De vorige hoofdstukken hebben ons het benodigde materiaal verschaft om de verschijnselen, die samenhangen met de werking van Ca in tetanus, *twitch* en KCl-contractuur, beter te begrijpen. De elementen, die de grootte van de piekspanning bepalen, zijn 1. de in de contractie ontwikkelde grendeling, 2. de concentratie Ca, 3. de tijdsduur van activering en 4. de temperatuur. De temperatuur is in alle volgende experimenten constant, zodat deze factor buiten beschouwing kan blijven. De elementen, die de grootte van de spanningsrest bepalen, zijn dezelfde als welke gelden voor de piekspanning, alleen vervult Ca hierbij een dubbele functie. De concentratie Ca is immers van belang, zowel in de contractie (hfdst.V) als tijdens de verslapping (hfdst.VII). Het gehele samenspel van deze elementen treedt in elke contractiecyclus op. Met deze gegevens gewapend, kunnen wij nu trachten een inzicht te verkrijgen in de reactie van de spier in 3 milieus met een gehalte van 2 mM, 6 mM (normaal) en 30 mM Ca. Deze concentraties Ca zijn zodanig gekozen, dat de spier tijdens de experimenten goed handelbaar blijft. Wanneer het Ca-gehalte daalt onder 2 mM, verslapt de spier slecht, terwijl concentraties Ca boven 30 mM Ca de spier mogelijk depolariseren.

#### VIII.1. De invloed van de werking van Ca in de tetanus en van de frequentie daarop

In normaal zeewater (6 mM Ca) vindt men met oplopende frequentie eenduidelijke S-vormige toeneming van de spanningsrest (fig. 5), terwijl de piekspanning snel stijgt tot een optimum bij 40 Hz om daarna weer af te nemen. Aan de afnemende van de piekspanning boven 40 Hz is de grendeling debet, die tijdens de contractie ontwikkeld wordt (fig. 6). De S-vormige kromme ontstaat, zoals we hebben gezien, doordat een toenemende frequentie globaal een stijging van de concentratie Ca bewerkstelligt (zie ook V.5.). De vraag, waarom de piekspanning en de spanningsrest niet gelijkvormig toenemen, werd in hoofdstuk III onbeantwoord gelaten, maar kan nu aan de orde worden gesteld. In fig. 24

zijn de gemiddelden weergegeven van 6 spieren in zeewater met 2 mM Ca(a) en vergeleken met de desbetreffende waarden van deze zelfde spieren met 6 mM (b). Hetzelfde geldt ook voor de waarden bij 30 mM Ca (c). De grootste piekspanning bij iedere concentratie Ca werd op 100% gesteld, terwijl de spanningsrest is opgegeven als 100 P/P<sub>0</sub>. Fig. 24a laat zien dat, wanneer het Ca-gehalte 2 mM bedraagt, zowel de spanningsrest als de piekspanning S-vormig toenemen. De bijdrage van iedere puls aan het totale Ca-gehalte bij het actomyosine is in zeewater met 2 mM Ca verminderd ten opzichte van de concentratie vrijgemaakt Ca in normaal zeewater. Dit heeft tot gevolg, dat de piekspanning met 2 mM Ca minder snel toeneemt dan met 6 mM Ca. De spanningsrest is ondanks de geringere ontwikkeling van de grendeling groter (spanningsrest bij 80 Hz vergeleken met die bij 5 Hz is 4, terwijl deze verhouding in zeewater met 6 mM Ca 9 is), omdat de verslappende activiteit is afgenomen. De toeneming van de spanningsrest beslaat daardoor ook een breder frequentiegebied.



Figuur 24

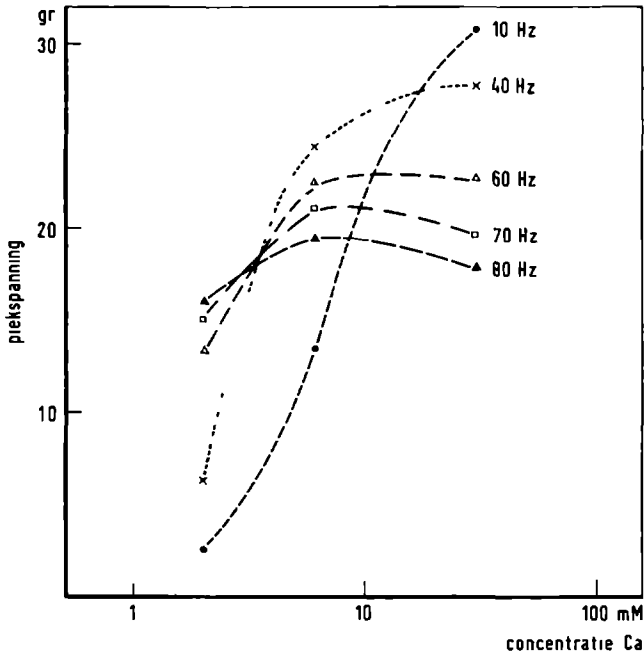
De invloed van het Ca-gehalte van het zeewater (zie tabel II) op de tetanus-frequentie kromme.

De piekspanning is uitgedrukt als percentage van de optimale waarde.

Piekspanning: x----x, spanningsrest: ●——●.

Wanneer nu de concentratie Ca op 6 mM wordt gebracht, zal de piekspanning sneller naar de maximaal bereikbare spanning stijgen. Bij

een bepaalde frequentie wordt de ontwikkeling van de grendeling zo groot, dat deze de spanningsontwikkeling gaat hinderen, waardoor een optimum in de piekspanning ontstaat (fig. 24b). Door toegenomen verslappingsactiviteit wordt de grendeling, die tijdens contractie in zeewater met 6 mM Ca weliswaar is gestegen, sneller verminderd, zodat de uiteindelijke spanningsrest toch is afgenomen. Door de concentratie Ca nog verder te doen toenemen, worden de reeds bij 6 mM Ca aanwezige tendensen versterkt. De piekspanning bereikt met 30 mM Ca haar optimum bij 20 Hz, omdat de grendeling reeds bij een lagere frequentie zo sterk is geworden, dat toeneming van de spanning verder tegengehouden wordt (fig. 24c). De spanningsrest is opnieuw afgenomen door de gestegen activiteit tijdens de verslapping.



Figuur 25

De tetanische piekspanning als functie van de concentratie Ca van het zeewater.

We zien dus dat, naarmate de concentratie Ca hoger wordt, het optimum in de piekspanning naar een lagere frequentie verschuift. De spanningsrest daarentegen neemt ondanks de toegenomen grendeling met hogere concentratie Ca af door de gestegen verslappingsactiviteit. Naarmate de concentratie Ca toeneemt, schuiven de krommen van de

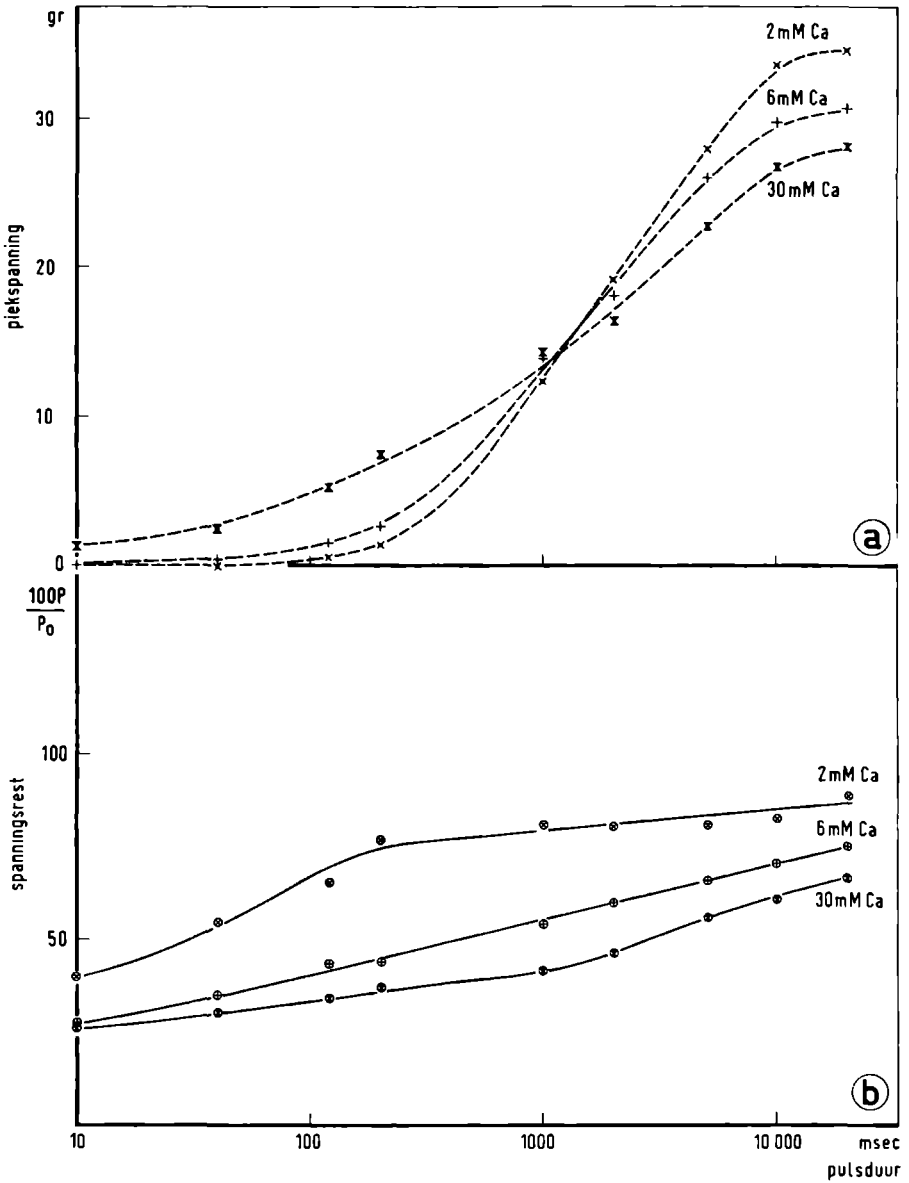
piekspanning en de spanningsrest, die bij 2 mM Ca nog S-vormig verlopen, uiteen, zodat de gelijkvormigheid verloren gaat.

De top in de piekspanning hangt echter niet alleen van het uitwendig Ca-gehalte af, maar ook van de frequentie, omdat de frequentie evenzeer bepaalt, hoe groot de concentratie Ca aan het actomyosine zal zijn. In fig. 25 is de piekspanning voor verschillende frequenties uitgezet tegen het Ca-gehalte van het zeewater. Voor 40 Hz blijkt de top in de piekspanning bij 30 mM Ca te liggen, maar voor 80 Hz bij 6 mM. Zoals gezegd, wordt er per puls met een toegenomen Ca-gehalte in het zeewater meer Ca in de spier vrijgemaakt. Toenemende frequentie heeft echter hetzelfde effect (zie hfdst.III.). Het gevolg is, dat stijging van het Ca-gehalte en vergroting van de prikkelfrequentie elkaar versterken. De piekspanning zal met meer Ca-productie per puls eerder haar top bereiken en tevens meer grendeling bewerken, welke de ontwikkeling van de spanning weer gaat hinderen. Naarmate nu de frequentie toeneemt, zal de top in de piekspanning naar een lagere concentratie verschuiven. De frequentie heeft dus een invloed, die vergelijkbaar is met de toeneming van het Ca-gehalte in het zeewater.

#### VIII.2. De invloed van het Ca-gehalte op de *twitch*

In normaal zeewater (6 mM Ca) steeg de piekspanning S-vormig met de pulsduur, terwijl de spanningsrest evenredig met de logaritme van de pulsduur toenam. Verandering van de concentratie Ca in het zeewater leidt ook hier, evenals ten aanzien van de tetanus, tot beter begrip van de samenhang tussen piekspanning en spanningsrest. In fig. 26a wordt de piekspanning als functie van de logaritme van de pulsduur weergegeven bij 2 mM, 6 mM en 30 mM Ca in het zeewater. Fig. 26b laat hetzelfde zien met betrekking tot de spanningsrest. De opgegeven waarden zijn gemiddelden van waarnemingen aan 6 spieren. Om de variabiliteit zoveel mogelijk te vermijden, werden eerst aan dezelfde spier de piekspanning en spanningsrest op 5 sec. d.c. bij twee verschillende concentraties Ca (normaal en 2 of 30 mM) gemeten. In een tweede reeks experimenten werd het effect van pulsduurverlenging aan andere spieren bij iedere concentratie Ca afzonderlijk nagegaan, waarbij deze metingen werden omgerekend op basis van de in de eerste reeks waarnemingen verkregen waarden.

De gelijkvormigheid van de piekspannings- en spanningsrestkromme blijkt het meest uitgesproken te zijn bij 30 mM Ca. In zeewater met 30 mM Ca neemt de door korte pulsen opgewekte piekspanning snel toe, terwijl met lange pulsen (d.c.) de grendeling merkbaar zo hevig wordt,



Figuur 26  
De invloed van het Ca-gehalte op a) de pijkspanning en  
b) de spanningsrest van de d.c.-contractuur.

dat deze de spanningsontwikkeling hindert. Bij lagere concentraties Ca in het zeewater blijkt de pijkspanning met korte pulsen kleiner en met

lange pulsen groter te zijn. Uit dit resultaat volgt, dat bij lage concentratie Ca minder Ca per puls vrijgemaakt zal worden, zodat de grendeling met lange pulsen is afgenomen (zie VI.5.) ten opzichte van die in zeewater met een hoog Ca-gehalte. Bij een hoog Ca-gehalte wordt er meer Ca per puls vrijgemaakt, zodat de piekspanning met korte pulsen is toegenomen. Daarom wordt de maximumspanning bij 2 mM Ca met lange pulsen en bij 30 mM met korte pulsen bereikt.

D.c. mobiliseert sterk-gebonden Ca (zie IV). Hiermee in overeenstemming heeft variatie van het Ca-gehalte in het zeewater maar een relatief geringe invloed op de piekspanning. Ook de spanningsrest blijkt ten gevolge hiervan meer in te boeten door de invloed van de verslappingsactiviteit, die zich evenals in de tetanus sterk doet gelden. Deze neemt met een hogere concentratie Ca aanzienlijk toe.

We kunnen dus de conclusie trekken, dat naarmate de concentratie Ca afneemt, vooral de spanningsrestkromme naar een kortere pulsduur zal verschuiven, hetgeen tot gevolg heeft, dat de gelijkvormigheid met de piekspanningskromme verloren gaat.

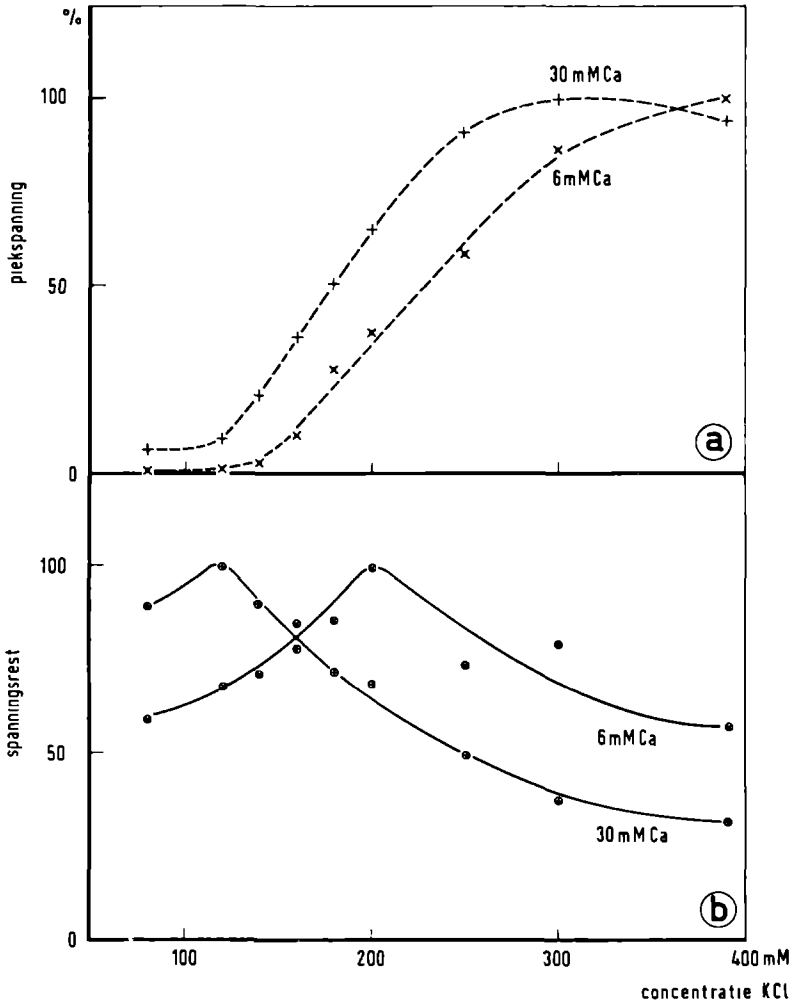
### VIII.3. De invloed van Ca op de KCl-contractuur

Zoals wij in III.3. konden vaststellen, steeg de piekspanning door 30 sec. incuberen met stijgende concentratie KCl S-vormig, terwijl de spanningsrest gelijkvormig toenam tot en met 200 mM KCl. Met concentraties KCl groter dan 200 mM nam de spanningsrest weer af.

Fig. 27a en b laat het effect van stijging van het Ca-gehalte in het zeewater op de KCl-contractuur zien. De gemiddelden van 6 spieren bij 6 mM Ca en van 5 spieren bij 30 mM Ca zijn weergegeven. De hoogste waarde van de spanningsrest en de piekspanning werd op 100% gesteld. We zien nu, dat de piekspanning ten gevolge van de verhoging van de Ca-productie in de spier bij 30 mM Ca in het zeewater is toegenomen en een optimum vertoont met 300 mM KCl (fig. 27a). Door de gestegen grendeling daalt de piekspanning daarna weer tot onder die, welke werd verkregen door depolarisatie met 391 mM KCl in zeewater met 6 mM Ca. Door de verhoging van de concentratie Ca is de piekspanning naar een lagere concentratie KCl verschoven.

De top in het verloop van de spanningsrest (fig. 27b) is bij 30 mM Ca naar 120 mM KCl verschoven ten opzichte van het optimum met normaal zeewater bij 200 mM KCl. De verslappende werking zet ten gevolge van het hoge Ca-gehalte eerder in.

Eigenlijk zou men verwachten, dat de grendeling gelijkvormig met de piekspanning zou toenemen. Het feit, dat de piekspanning bij 300 mM



Figuur 27

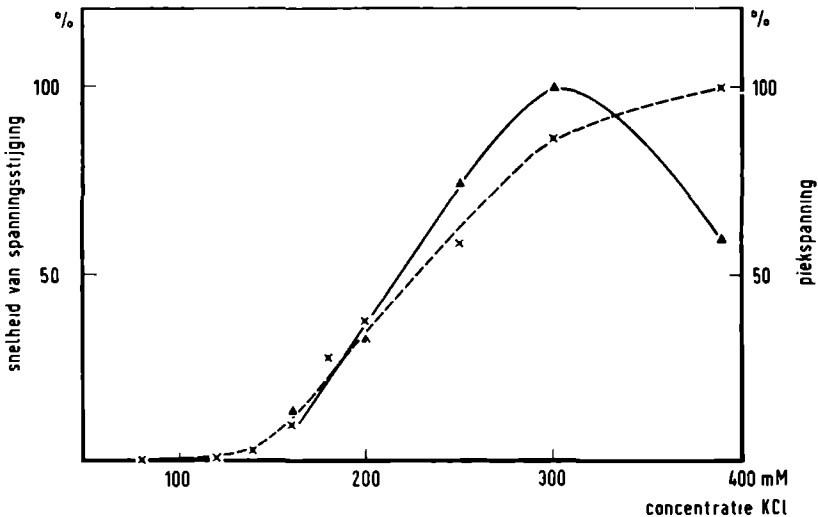
De invloed van het Ca-gehalte op a) de pikspanning en b) de spanningsrest van de KCl-contractuur.

De pikspanning en spanningsrest zijn weergegeven als percentage van de optimale waarde.

KCl in zeewater met 30 mM Ca een optimum vertoont, wijst erop, dat de grendeling ook boven 120 mM KCl aanwezig is. Het verschijnsel, dat er een optimum in de grootte van de spanningsrest bestaat, zou echter wel eens van experimentele aard kunnen zijn. Door het uitwendig aanwezige KCl weg te nemen krijgt de spier gelegenheid de membraan



van de vezels gedeeltelijk te repolariseren. Tussen het wegnemen van de KCl en het spoelen met zeewater verlopen 15 sec., onder de proefomstandigheden een aanzienlijke spanne tijds. Voordat door spoelen met zeewater de polarisatie weer volledig wordt, kan dit aanleiding geven tot een lagere activiteit in de spier dan er tijdens volledige depolarisatie bestond. De op deze wijze geïntroduceerde geringere activiteit kan na afloop daling van de spanningsrest tot gevolg hebben. Het is duidelijk, dat dit effect het meest in het oog springt met hoge concentraties KCl. Wanneer er meer Ca aanwezig is, zal het effect eerder optreden, omdat de KCl, zoals we zagen, dan effectiever werkt.



Figuur 28

De piekspanning en de snelheid van spanningsstijging na *quick-release* op 30 sec. vanaf begin KCl-depolarisatie.

De piekspanning en snelheid van spanningsstijging zijn uitgedrukt in procenten van de optimale waarde. Piekspanning: x---x en snelheid van spanningsstijging na *quick-release*: ▲—▲. Milieu: normaal zeewater (6 mM Ca).

In principe zou men kunnen vaststellen of de spanningsrestdaling boven 200 mM KCl inderdaad een geringe nawerkende activiteit weer spiegelt, met name door middel van een *release*-experiment. Zoals we zagen, wordt de snelheid van spanningsstijging na *release* bepaald door de aanwezige grendeling en door de op dat moment aanwezige 'active-state'. Door het Ca-gehalte bij het actomyosine (hetgeen men met hogere concentraties KCl in feite bereikt) te doen toenemen, worden

beide factoren in gelijke richting beïnvloed. Door een hoge concentratie KCl wordt zowel een grote spanning opgewekt alsook een hevige grendeling ontwikkeld. Doorgaans heeft de spanningsontwikkeling de overhand en zal men een S-vormige curve voor de snelheid van spanningsstijging verwachten. De afnemende van de grendeling b.v. boven 200 mM KCl in normale zee water zou moeten resulteren in een bevordering van de snelheid van spanningsstijging, dus een steilere toeneming dan men op grond van het S-vormig verband verwacht. Een dergelijke knik in de kromme verschijnt niet (fig. 28) en men ziet tevens, dat de grendeling boven 300 mM KCl zo groot wordt, dat de spanningsontwikkeling geremd wordt, dus dat juist door hoge concentraties KCl grote grendeling ontwikkeld wordt. Hieruit volgt dus, dat de grendeling door depolarisatie met meer dan 200 mM KCl toeneemt, doch dat deze grendeling teniet wordt gedaan door een nawerkend effect.

#### VIII.4. Discussie

De verwachtingen, gebaseerd op de resultaten uit de vorige hoofdstukken, worden redelijk gehonoreerd, wanneer de spier in aanwezigheid van diverse concentraties Ca in het zee water aan de verschillende prikkels wordt onderworpen. Opmerkelijk is het relatief grote aandeel van de verslappingsactiviteit in het bepalen van de grootte van de verslapping naast de spanningsrest ontwikkelende activiteit in de contractie. Deze verslappingsactiviteit is weliswaar slechts gering, maar de spier reageert, zoals we zagen, toch duidelijk op het uitwendig Ca-gehalte. De koppeling bepaalt dus naast de toestand, waarin op dat moment het paramyosine verkeert, de grootte van de verslapping. Dit geldt evenzeer voor de mate, waarin de grendeling wordt ontwikkeld in de tetanische contractie (III.6., V.5.). Dit wordt in dit hoofdstuk nog eens benadrukt. Overigens zou in de tetanus best de membraandepolarisatie, die de Ca-productie in de spier beheerst, de mate van activiteit van het actine-myosineparamyosinesysteem kunnen bepalen. Maar dit tast de conclusies allerminst aan. De grootte van de A.P. blijkt afhankelijk van de concentratie Ca van het zee water (zie hfdst. IV). Neemt de concentratie Ca toe, dan wordt de A.P. vergroot, hetgeen weer tot gevolg heeft, dat de intensiteit en de duur van de '*active-state*' stijgen (SANDOW en PREISER, 1964). Het is dus irrelevant of de uiteindelijke verandering van de '*active-state*' nu het gevolg is van een beïnvloeding door Ca van de koppeling alleen, of van de membraan en de koppeling. De invloed van variatie van het Ca-gehalte in het milieu blijkt geringer te zijn in de contractuur. Omdat het Ca in hoofdzaak wordt gemobiliseerd uit een

bron, die het Ca stevig bindt, is het effect van een verandering van het Ca-gehalte in het zeewater minder ingrijpend dan in de tetanus, behalve met prikkels van geringe sterkte. Daar staat tegenover, dat ieder van de contractuur-verwekkende prikkels, d.c., ACh of KCl, de spier in enigszins verschillende mate activeren en dus ook vergrendelen. Bij een bepaalde prikkelsterkte is waarschijnlijk ACh het meest effectief, waarna KCl volgt en tenslotte d.c. De reden, waarom deze prikkels de koppeling in verschillende mate aangrijpen, is niet duidelijk.

De in dit hoofdstuk weergegeven resultaten bevestigen het inzicht, dat de uiteindelijk gemeten piekspanning en spanningsrest het resultaat zijn van een complex van factoren. Eén van deze factoren is de mate, waarin de spier vergrendeld wordt tijdens de contractie. Hierin speelt, wat betreft de tetanus, de koppeling en eventueel de membraan een belangrijke rol. De grendeling, meetbaar in de vorm van de spanningsrest, is het resultaat van een interactie tussen de bestaande grendeling na afloop van een contractie en de verslappingsactiviteit, welke op haar beurt weer wordt geregeld door de koppeling. Daarbij is het mogelijk, dat de mate van grendeling wordt beïnvloed door uitwendige factoren, zoals de temperatuur en het CO<sub>2</sub>-gehalte van het zeewater. Uiteindelijk zullen ook deze laatste invloeden de ATPase-activiteit wijzigen, maar het is zonder voldoende gegevens prematuur om over het aandeel, dat iedere factor onder deze omstandigheden heeft, een uitspraak te doen.

De verschillende fasen in de contractie en de invloed van Ca daarop kunnen nu als volgt s c h e m a t i s c h worden weergegeven.

1. Het Ca-gehalte van het zeewater beïnvloedt de grootte van de A.P. en daarmee de door depolarisatie veroorzaakte grootte van de concentratie vrijgemaakt Ca. Deze wordt eveneens bepaald door de pulsduur, de concentratie ACh of KCl, hetzij door depolarisatie, hetzij door een direct aangrijpen van de koppeling (IV).

2. De concentratie Ca bepaalt de grootte van de ATPase-activiteit (V).

3. Beginnende activiteit van het systeem ontgrendelt eventueel eerst de spier, waarna de contractie inzet (VII).

4. Tijdens de contractie wordt de toestand van het paramyosine, afhankelijk van de grootte en de duur van de ATPase-activiteit, gewijzigd. Hierdoor wordt de verbrekingssnelheid van de bindingen tussen het actine- en het myosineparamyosinefilament in ongunstige zin beïnvloed (VI).

5. Een geringe verslappingsactiviteit, die wordt bepaald door het Ca, dat naargelang het Ca-gehalte van het zeewater de spier binnendringt,

kan na a f l o o p van de contractie de grendeling verminderen door de bindingen weer te splitsen. De grendeling wordt ook sneller geëlimineerd door het toedienen van een verslappingsprikkel, waardoor een geringe activiteit ontstaat, die boven de mechanische drempel kan liggen, maar slechts een geringe grendeling veroorzaakt, zodat de spier snel verslapt (VII).

De concentratie Ca bij het actine-myosineparamyosinecomplex is van beslissende betekenis zowel voor de contractie als voor de verslapping.



## HOOFDSTUK IX

### SLOTBESCHOUWING

In hoeverre de draagfunctie bij andere spieren toe te schrijven is aan een bijzondere structurering is onderwerp van bespreking in het eerste deel van dit hoofdstuk. Daarbij zal behalve aan de paramyosinespieren enige aandacht geschonken worden aan de overige gladde spieren en de langzame en snelle dwarsgestreepte spieren. In het tweede deel worden enige theorieën betreffende het grendelmechanisme behandeld.

#### IX.1. De draagfunctie bij andere spieren

##### IX.1.1. Grendelspieren

De resultaten betreffende de grendeling verkregen aan de ABRM zullen waarschijnlijk ook gelden voor andere spieren, waarin paramyosine aangetroffen wordt. Deze spieren zijn: alle adductoren van *Ostrea*, *Pinna*, *Pecten* (het gladde deel) en *Venus*. De adductoren van *Mya* en *Mytilus* zijn gemengd, wat wil zeggen, dat ze zowel tropomyosine A (paramyosine) als B bevatten. Paramyosine is ook gevonden in de pharynx-retractor en de voet van *Helix* (HANSON en LOWY, 1960). Op de waarnemingen aan twee van deze spieren, de *Pecten* adductor en de voet van *Helix*, wordt nu nog nader ingegaan.

1) *Pecten* adductor. Het niet-doorzichtige deel van deze spier bevat volgens RÜEGG (1961) tweemaal zoveel tropomyosine A als actomyosine, terwijl in het doorzichtige deel de verhouding juist omgekeerd is. In het dwarsgestreepte deel van de adductor is de verhouding actomyosine/tropomyosine 9:1. Met GMF kon deze onderzoeker aantonen, dat het tropomyosine-rijke deel een grotere discrepantie tussen passieve *stretchspanning* en actief ontwikkelde spanning vertoont dan het tropomyosine-arme deel. Uit dit resultaat trok RÜEGG terecht de conclusie, dat een in GMF aanwezige grotere hoeveelheid tropomyosine A samen gaat met het optreden van een grotere grendeling.

2) De voet van *Helix*. De slakkevoet behoort tot de *hohlorganartige*

musculatuur en is historisch één van de oudste objecten, waaraan in de vertraagde verslapping een niet-actieve weerstand werd herkend (JORDAN, 1905). Volgens de toenmalige voorstanders van de tetanushypothese zou deze vertraging van de verslapping echter geheel berusten op het geleidelijk tot rust komen van de contractiele activiteit.

De weerstand werd gemeten door de musculatuur aan een reklast bloot te stellen. Na het wegnemen van de reklast keert de voet niet op eigen kracht tot de oorspronkelijke lengte terug. Een overeenkomstige reactie op deformerende krachten is bekend van visco-elastisch materiaal uit de niet-levende natuur. De tijd/deformatiekromme van de slakkevoet komt in vorm overeen met de BINGHAM-kromme, die gevonden werd aan geplasticeerde niet-ge vulcaniseerde rubber (plasticiteit) en met de deformatiekromme van een gelatinestaafje (viscositeit). Ten aanzien van de temperatuur kwam het mechanisch gedrag van de musculatuur met viscositeit overeen. De overeenstemming geldt ook het gedeeltelijk herstel van de oorspronkelijke verkortingsgraad (fysische 'recovery'); deze neemt met stijgende temperatuur af (MAAS, 1938). Op grond van dit alles identificeerde JORDAN het rekmechanogram van de slakkevoet als uitdrukking van fysische weerstand op basis van een statische structuurgraad. Toen POSTMA (1943) had aangetoond, dat èn in de rekkingsweerstand èn in de 'recovery' een reactieve component onder de passieve schuifling, heeft JORDAN het fysisch viscositeitsbegrip teruggenomen.

VANSWINDEREN (1928) voerde als eerste de waargenomen weerstand tegen rek terug op een fysiologisch evenwicht tussen weerstandsvorming en weerstandsverlies onder handhaving van JORDAN's afwijzing van het tetanisch principe. POSTMA (1934, 1935) sloot zich daarbij aan, maar onderscheidde in de weerstand tegen rek een tetanische naast een fysiologisch onderhouden niet-tetanische component. Hij meende uit een samen- resp. wisselwerking van beide componenten het mechanische gedrag van de musculatuur te kunnen verklaren (zie I. 2.2.2.).

Het onderzoek van JORDAN en POSTMA behoeft aanvulling met moderne structuurgegevens, ook met betrekking tot de ganglia en het zenuw-net, die de waargenomen weerstand beïnvloeden, alsmede met onderzoek van moderne weerstandsparameters, zoals die door ons op de ABRM zijn toegepast. Eerst dan zal het mechanisch gedrag van de slakkevoet op overtuigende wijze zijn in te passen in het beeld, dat de moderne fysiologische gegevens hebben opgeleverd.

VAN NIEUWENHOVEN (1947) koos zich de ABRM tot studieobject, omdat deze door WINTON in 1937 ingevoerde spier indertijd reeds als

een *unit* werd beschouwd en gemakkelijk van haar innerverende zenuw te isoleren was. Temperatuurstoename leverde bij de ABRM na rek een stijgende '*recovery*' op, dus een tegengesteld resultaat als met Helix gevonden werd. De '*recovery*' na rekken van de ABRM is een duidelijk actief herstellen van de weerstand (LEENDERS, 1964).

### IX.1.2. Gladde spieren zonder paramyosine

Deze spieren vormen een verzameling die allerlei verschillende spiertypen in zich bergt. Daarbij zijn spieren, waarvan de vezels opgebouwd zijn uit filamenten, die een helixwinding vertonen en spieren, die wel twee soorten filamenten bezitten, doch waarin geen paramyosine werd aangetroffen. Sommige van deze spieren moeten nog onderzocht worden op de aanwezigheid van dit proteïne.

In gladde spieren van vertebraten zijn tot nu toe slechts dunne filamenten waargenomen. Het myosine is wel aanwezig, doch is op een of andere wijze dispers verdeeld. Al deze spieren bevatten in ieder geval het actomyosine (NEEDHAM en SHOENBERG, 1964). Verder is het tropomyosine B aanwezig, maar dit vertoont geen pH-gevoeligheid, zoals RÜEGG (1965) met GMF van taenia coli heeft aangetoond.

LAST en HAMOIR (1961) hebben uit vaatspieren een fractie proteïnen kunnen extraheren, die enigszins merkwaardig aandoet. Zij noemen deze fractie het tonoactomyosine. Dit proteïne verschilt van het actomyosine in sedimentatiesnelheid, viscositeitsgetal en gevoeligheid voor bepaalde eenwaardige ionen. SCHIRMER (1965) vond echter naast het tropomyosine B als belangrijkste verontreiniging in deze fractie een extraglobuline, dat aan het tonoactomyosine waarschijnlijk zijn afwijkende gedrag verleent. Behalve in arteriën is dit extraglobuline ook gevonden in de taenia coli, in de penis retractor en in de uterus (NEEDHAM en WILLIAMS, 1963). De functie van het extraglobuline is echter nog volkomen onduidelijk.

### IX.1.3. Snelle en langzame dwarsgestreepte spieren

Het onderscheid in fysiologisch gedrag tussen snelle en langzame dwarsgestreepte spieren moet waarschijnlijk in de membraan (KUTSCHA, 1964) en in de koppeling (BRECHT en PAUSCHINGER, 1962) gezocht worden. De duur van de KCl-contractuur blijkt af te hangen van het Ca-gehalte in het milieu. Duidelijk is dit te zien aan de *rectus abdominis*. K-depolarisatie veroorzaakt een tetanus door depolarisatie van de aanwezige *twitch*vezels, alvorens tot contractuur te leiden. Ca-



verrijking van het milieu begunstigt de contractuur en onderdrukt de tetanus, matig Ca-gebrek begunstigt de tetanus en onderdrukt de contractuur, terwijl extreem Ca-gebrek beide antwoorden remt. De contractuur berust op aanhoudende activiteit. Grana (geïsoleerd s.r.) van langzame spieren hebben een duidelijk geringer vermogen om Ca te accumuleren dan grana uit snelle spieren (SRÉTER et al., 1964). Mogelijk speelt ook een verschil in myosine-ATPase-activiteit mee in het verschillend gedrag van de spieren (BARANY et al., 1965).

De oorzaak van de langzame verslapping kan dus gezocht worden in de filamenten, zoals in de grendelspieren, maar ook in het s.r. Mogelijk kunnen zowel verschillen in filamentenopbouw als de werking van de koppeling daarvoor verantwoordelijk worden gesteld. Men moet dus onderscheid maken tussen langzame verslapping op grond van wegebbende activiteit en langzame verslapping, die berust op een bijzondere structurering, zonder tussenkomst van activiteit. Het is duidelijk, dat in het eerste geval de koppeling een overheersende rol speelt, terwijl deze in het tweede geval enigszins op de achtergrond opereert. Het gevolg hiervan is, dat verschillen in fusiefrequentie, tetanus-*twitch* verhouding en tetanische verkortingsnelheid niet zonder meer het onderscheid tussen de verschillende spiertypen aanduiden. De noodzakelijke aanvulling kan worden gevonden in het bestuderen van verschillen in de eigenschappen van membraan en s.r. Tevens moet men voortgaan eventuele verschillen in de filamentenopbouw nauwgezet te onderzoeken. In dit verband zou een pleidooi op zijn plaats zijn deze onderzoeken te doen met gelijke technische instrumentatie en methoden en aan een zorgvuldig gekozen reeks standaardpreparaten. Deze eisen ten behoeve van een beter inzicht in de overeenkomst en de verschillen tussen de verscheidene spiertypen zijn waarschijnlijk niet nieuw, doch wel dwingend.

## IX.2. Mechanismen van de grendeling

De hypothesen, opgesteld om het mechanisme van de grendeling te verklaren, zijn te verdelen in twee groepen: de monistische en de dualistische theorieën. De eerste opvatting neemt aan, dat de spanningsontwikkeling en de spanningshandhaving op één structuur (het actomyosine) berusten, terwijl de tweede hypothese aanneemt, dat er verschillende structuren zijn, waarop de contractie en grendeling berusten. Daar reeds enige van deze opvattingen zijn vermeld, zij voor de oudere hypothesen naar RÜEGG (1965) verwezen. De hedendaagse vertegenwoordigers van deze beide opvattingen zijn respectievelijk de *linkage* hypothese en de tropomyosinetheorie van de grendeling.

### IX.2.1. De *linkage*hypothese

LOWY en HANSON (1962) en LOWY en MILLMAN (1963) postuleren hun theorie betreffende de 'contractiele bindingen' ook voor de grendelspier. Het contractiele mechanisme zou dus zowel voor de grendelspier als voor de dwarsgestreepte spier hetzelfde zijn. Tijdens de contractie worden tussen het actine en het myosine bindingen gevormd en verbroken, zoals in de dwarsgestreepte spier. Tijdens de contractie is de verbrekingssnelheid van de bindingen hoog, terwijl deze verbrekingssnelheid sterk zou afnemen, nadat de contractie geëindigd is. De bindingen tussen het actine en myosine in de dwarsgestreepte spier verdwijnen snel nadat de '*active-state*' afgelopen is. Het langzame verbreken van de bindingen in de grendelspier beantwoordt aan het geringe spanningsverval tijdens grendeling. De verbrekingssnelheid zou worden gecontroleerd door een bijzondere stof, een zogenaamde *relaxant* (5-HT). Snelle verslapping is het gevolg van een grote produktie van deze *relaxant*, terwijl een geringe produktie van de *relaxant* de spier veel langzamer doet verslappen. Zoals RÜEGG stelt, zou het actomyosine van grendelspieren in zoverre van het actomyosine van dwarsgestreepte spieren moeten verschillen, dat er na remming van de ATPase in het eerste geval een geringe dissociatie zou optreden en in het tweede geval een volledige.

Tegen deze veronderstelling spreken de volgende experimentele resultaten: 1) Actomyosinedraden uit grendelspieren contraheren met ATP op dezelfde wijze als het actomyosine uit dwarsgestreepte spieren en verslappen volledig wanneer de remming intreedt (RÜEGG, 1965). 2) De grendeling verdwijnt niet na inactivering van de ATPase van de grendelspieren door thiourem (RÜEGG, 1965) of, zoals we konden aantonen, door het onttrekken van Ca (IV.1. en IV.2.). 3) Vervolgens blijkt uit ons onderzoek (VI.1.), dat de grendeling niet zichtbaar is in sartorius-GMF na *quick-release*, maar wel in ABRM-GMF. Bovendien wordt de snelle verslapping na een r.a.c.-contractie klaarblijkelijk (ten gevolge van intermitterende activiteit) door een geringe ontwikkeling van de grendeling tijdens contractie en minder waarschijnlijk door een grote *relaxant*produktie veroorzaakt.

### IX.2.2. De tropomyosinetheorie

Deze theorie zegt, dat de contractie en de grendeling op twee verschillende structuren berusten. De actieve contractie zou worden ontwikkeld door het actomyosine, terwijl de passieve spanning en de hoge

rekweerstand toegeschreven worden aan het paramyosinesysteem.

Daarvoor hebben RÜEGG en WEBER (1963) (zie ook RÜEGG, 1965) de volgende argumenten:

1) Tropomyosine A wordt alleen in grendelspieren in grote hoeveelheden aangetroffen. 2) Alleen GMF van grendelspieren vertonen een spanningsrest, welke kan worden beïnvloed door parameters, die het tropomyosine harden of plastisch maken. 3) Deze effecten laten zich ook demonstreren aan de spier. 4) Het handhaven van de spanningsrest kan plaats vinden zonder energieverbruik.

De tropomyosinetheorie kan echter niet verklaren hoe de krachten, die volgens deze onderzoekers ontwikkeld worden door het tropomyosinesysteem, de spanning kunnen vasthouden, tenzij in een systeem, waarin de paramyosinefibrillen continu zijn en dat verschilt van het contractiele actomyosinesysteem. De tropomyosinetheorie gaat voorbij aan het feit, dat het paramyosine een onderdeel vormt van het dikke filament. Bovendien kan de theorie niet verklaren hoe het paramyosine verkort wordt tijdens contractie. Deze theorie verklaart evenmin hoe de grendeling in vivo ingeschakeld wordt, tenzij door middelen, die onder natuurlijke omstandigheden geen rol kunnen spelen.

### IX.2.3. Een actine-myosineparamyosinehypothese van de grendeling

Onze opvatting gaat uit van het *sliding*-filamentmechanisme, waarbij dus tijdens contractie tussen het actine- en het myosineparamyosine-filament bindingen gevormd en verbroken worden. De in de contractiefase gevormde bindingen blijven in de vergrendelde spier bestaan, terwijl ze in de niet-vergrendelde spier verbroken worden. De grendeling hangt af van de toestand, waarin het paramyosine tijdens de contractie en na afloop daarvan verkeert. Veranderingen in de toestand van het paramyosine hangen samen met de grootte van de in de contractie ontwikkelde activiteit, maar kunnen echter ook door pH-wijziging of temperatuursveranderingen optreden.

Argumentatie: 1) De grendeling wordt niet door actomyosinebindingen tot stand gebracht, maar door bindingen tussen het actine en het myosineparamyosine, omdat de grendeling tijdens contractie zichtbaar is na *quick-release* (VI). 2) De grendeling is geen zaak van het paramyosine alleen, doch wordt ingeschakeld door de ATPase-activiteit (V). 3) Een geringe grendeling kan een optimale ondersteuning vormen voor de spanningsontwikkeling (VI). 4) Naast de toestand van het paramyosine blijkt de grootte van de onderdrempelige ATPase-activiteit, waarmee de verslapping gepaard gaat, een belangrijke factor bij het ver-

dwijnen van de spanning in de spier (VII). 5) De snelle verslapping na afloop van de r.a.c.-contractie berust klaarblijkelijk op de geringe ontwikkeling van de grendeling tijdens de contractie (V.5.).

Uiteraard is het probleem van de grendeling hiermede nog niet tot een oplossing gekomen, die volledig bevredigt. Zo zijn de problemen slechts verschoven naar het moleculair niveau, waarop de interactie tussen actine en myosineparamyosine plaats vindt. De vraag hoe het paramyosine in staat is de verbrekingssnelheid van de binding te beïnvloeden blijft open.

Een elementair fysiologisch vraagstuk vormt het inschakelen van de grendeling van de spier ten gevolge van prikkels uit de innerverende zenuw. Gegevens verkregen uit het onderzoek van GMF zijn bijzonder vruchtbaar om bepaalde verschijnselen te interpreteren, doch de vraag blijft in hoeverre het geoorloofd is deze gegevens over te brengen op de spier als zodanig. De grendeling blijkt afhankelijk te zijn van een groot complex van diverse factoren, dat slechts door zorgvuldige analyse uiteen te rafelen is.



## SAMENVATTING

Onderzocht werd welke parameters, behalve de pH en de temperatuur, een invloed hebben op de grendeling van de ABRM. De beschouwing start met een onderzoek naar de samenhang van de spanning en de spanningsrest in de *twitch*, ACh- en KCl-contractuur en de tetanus. Het blijkt, dat de piekspanning en de spanningsrest niet geheel gelijk S-vormig toenemen onder invloed van pulsduurverlenging, toeneming van de concentratie ACh of KCl en frequentieverhoging.

Daarom werd de koppeling in de ABRM in ogenschouw genomen. Ca blijkt evenals in andere spieren de gebeurtenissen, die zich aan de membraan afspelen, te koppelen aan de contractiele machinerie. Bovendien bleek, dat Ca-gebrek de verslapping vertraagt en dat onttrekken van Ca vergelijkbaar is met de inactivering van het actomyosine door thiourem. De invloed van Ca manifesteert zich in de activering van GMF. Zowel de piekspanning en de spanningsrest alsook de ATPase-activiteit nemen gelijk S-vormig toe met de concentratie Ca. De piekspanning en de spanningsrest gehoorzamen eveneens aan de karakteristieken van de ATPase met betrekking tot de invloed van de tijd van activering, de concentratie niet-gebonden ATP en de temperatuur. Hieruit werd de conclusie getrokken, dat de ATPase-activiteit de grootte van de spanningsrest, dus de mate van de grendeling bepaalt.

Degrendeling blijkt zowel bij GMF als bij de spier uit een afneming van de snelheid van spanningsstijging na *quick-release* naarmate het tijdsinterval tussen het begin van de activering (prikkeling) en het *release* voortduurt. De grootte van de '*active-state*' op verschillende prikkels is waarschijnlijk niet gelijk, zodat er schijnbaar geen grendeling tijdens de contractuur met ACh of d.c. optreedt. Neemt men echter de piekspanning als maat voor de grootte van de '*active-state*', dan is de grendeling duidelijk in een daling van de snelheid van spanningsstijging terug te vinden. Ontgrendeling door middel van 5-HT begunstigt de spanningsontwikkeling met een optimum bij  $10^{-7}$  gr 5-HT/ml.

De verslapping met 5-HT is afhankelijk van de in de spier aanwezige concentratie Ca. Bovendien kan de waarneming van MINIHAN en DAVIES

gesteund worden, dat er tijdens verslapping sprake moet zijn van ATPase-activiteit. Deze activiteit komt niet uit boven de mechanische drempel. Tijdens het binnendringen in de spier via een trypsinevenster veroorzaakt Ca een *latency relaxation*. De betekenis van deze *latency relaxation* is in de ABRM een ontgrendeling ten gunste van de contractiliteit van de spier, zoals ook bij de slakkevoet. Een geringe activering van de GMF doet de tevoren aanwezige spanningsrest volledig verdwijnen.

De beschreven experimenten bewijzen, dat zowel grendeling als ontgrendeling op eenzelfde mechanisme berusten. Het niveauverschil in ATPase-activiteit bepaalt of de spier vergrendeld of ontgrendeld wordt.

Tot slot werd de invloed van de concentratie Ca van het zeewater nagegaan met betrekking tot de tetanus-frequentie kromme, de d.c.- en de KCl-contractuur. Toeneming van het Ca-gehalte in het zeewater veroorzaakt in de tetanus een verschuiving van de piekspanningskromme naar een lagere frequentie, terwijl de spanningsrestkromme naar een hogere frequentie verschuift. Toeneming van de concentratie Ca heeft in de d.c.- en de KCl-contractuur minder effect op de piekspanning dan op de grootte van de spanningsrest.

De mate van grendeling, ontwikkeld door ATPase-activiteit tijdens de contractie, en de grootte van de onder de mechanische drempel gelegen activiteit tijdens de verslapping, bepalen de grootte van de spannings- of verkortingsrest. Het niet-vergrendelen van de spier in de r.a.c.-contractie bij lage frequentie is waarschijnlijk aan de koppeling toe te schrijven. De grendeling is een verschijnsel, dat waarschijnlijk op moleculair niveau gerealiseerd wordt in een interactie tussen actine en het myosineparamyosinecomplex. De *excitation-contraction coupling* bepaalt de mate van activiteit en zodoende de grootte van de grendeling.

## SUMMARY

Parameters other than pH and temperature, which might influence catch of the ABRM have been investigated. The thesis begins with a resumé of research on the interrelationships between the tension and tension remnant in the twitch, ACh and KCl contracture and tetanus. S-form plots of increases in peak tension and tension remnant were evidently not completely parallel to each other when produced under the influence of lengthening of pulse duration, increase in ACh, KCl concentration or increase in frequency. Therefore coupling in the ABRM was examined more closely. As in other muscles, Ca apparently brought about a coupling of events occurring in the membrane with those taking place within the contractile machinery. Moreover, Ca lack evidently retarded relaxation and its absence was apparently comparable with thiourea inactivation of actomyosin. The influence of free Ca was manifested in the activation of GMF, i.e. the peak tension as well as the tension remnant and ATPase activity increased logistically (S-shaped curve) with the concentration of free Ca. Similarly the peak tension and tension remnant also respond as does ATPase with reference to the influence of time of activation, concentration of free ATP and temperature. These observations constitute a basis for the conclusion that ATPase activity determines the magnitude of the tension remnant and therefore the extent of catch.

That catch occurs is suggested by a retardation in the rate of isometric tension rise following quick-release in GMF as well as in muscle with the retardation being a function of time elapsing between activation and release. The magnitude of the 'active-state' evidently varied in response to different stimuli thus giving the impression that no catch occurred, e.g. during ACh or d.c. induced contracture. However, taking the peak tension as an index for the magnitude of the 'active-state' permits a clear demonstration of catch. Catch-release mediated by 5-HT promotes the development of tension, with an optimum effect being produced by  $10^{-7}$  gr 5-HT/ml. 5-HT-induced relaxation is dependent on Ca concentration in the muscle. Furthermore the observation of MINIHAN and



DAVIES that relaxation is accompanied by ATPase activity is supported by data here. This activity does not exceed the mechanical threshold. Ca, during its penetration via a trypsin window in the muscle, induces a latency relaxation. This latency relaxation in the ABRM implies a catch-release which promotes contractility of the muscle as also occurs in the snail foot. A slight activation of the GMF brings about the disappearance of the previously existing tension remnant.

The above experiments suggest that catch and catch-release are both attributable to the same mechanism -- the difference in level of the ATPase activity determines whether the muscle reaches a catch or catch-release state.

Finally, various Ca concentrations in sea water were tested for influence on the tetanus-frequency curve, the d.c. and KCl contracture. Increase of Ca content in the sea water brought about, in tetany, a shift in the peak tension curve toward a lower frequency, whereas the tension remnant curve experienced a displacement toward a higher frequency. Increase in Ca concentration in the d.c. and KCl contracture exerted a more pronounced effect on the extent of the tension remnant than on the peak tension.

The extent of catch attributable to ATPase activity during contraction and to activity occurring subliminal to the mechanical threshold during relaxation, determines the degree of muscle tension or shortening remnant. The absence of catch in muscle of r.a.c. contraction is attributable to coupling between excitation and contraction. Catch is a phenomenon which probably can be ascribed to an interaction at the molecular level between the actin and myosin-paramyosin complexes.

The excitation-contraction coupling and membrane determine the degree of activity and thereby the extent of catch.

## LITERATUUR

- ABBOTT, E.C. en LOWY, J., *J.Physiol.* 130, 25P (1955).
- ABBOTT, B.C. en LOWY, J., *J. Mar. biol. Ass. U.K.* 35, 521 (1956).
- ABBOTT, B.C. en LOWY, J., *J. Physiol.* 141, 385 (1958).
- BAGUET, F., MARÉCHAL, G. en AUBERT, X., *Archs. int. Physiol.* 70, 416 (1962).
- BAILEY, K., *Biochem. J.* 36, 121 (1942).
- BARANY, M., BARANY, K., EDELSTEIN, E. en VOLPE, A., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 282, 135 (1965).
- BARANY, M., BARANY, K., RECKARD, T. en VOLPE, A., *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 185 (1965).
- BENDALL, J.R., *J. Physiol.* 121, 232 (1953).
- BENNETT, H.S. en PORTER, K.R., *Amer. J.Anat.* 93, 61 (1953).
- BERENBLUM, I. en CHAIN, E., *Biochem. J.* 32, 295 (1938).
- BIANCHI, C.P. en SHANES, A.M., *J. gen. Physiol.* 42, 803 (1959).
- BLASCHKO, H. en HOPE, D.B., *Arch. Biochem. Biophys.* 69, 10 (1957).
- BOWDEN, J. en LOWY, J., *Nature* 176, 346 (1955).
- BRECHT, K., UTZ, G. en LUTZ, E., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 260, 524 (1955).
- BRECHT, K. en PAUSCHINGER, P., *Biol. Méd.* 51, 429 (1962).
- BRIGGS, F.N. en FUCHS, F., in: *Biochemistry of Muscle Contraction*, ed. J. Gergely, Retina Foundation, Boston, Mass., p. 207, 1964.
- CAIN, D.F. en DAVIES, R.E., *Biochem. biophys. Res. Comm.* 8, 361 (1962).
- CAMBRIDGE, G.W., HOLGATE, J.A. en SHARP, J.A., *J. Physiol.* 148, 451 (1959).
- DAVIES, R.E., *Nature* 199, 1068 (1963).
- DEANE, H.W. en TWAROG, B.M., *Anat.Rec.* 128, 538 (1957).
- DIXON, M. en WEBB, E.C., *Enzymes*, Longmans, Green and Ltd., London, 1959.
- ELTEREN, Ph. VAN en VERBEEK, A.M.J.A., *Syllabus van een cursus medische statistiek*, 1960.
- ENTROP, B., *Inrichting en onderhoud van het zeeaquarium*, Kosmos,

Amsterdam, 1956.

- FLETCHER, C.M., *J. Physiol.* 90, 233 (1937a).  
FLETCHER, C.M., *J. Physiol.* 90, 415 (1937b).  
FLETCHER, C.M., *J. Physiol.* 91, 172 (1937c).  
FOULKES, J.G. en PERRY, F.A., in: *Muscle*, ed. W.M. Paul, E.E. Daniel, C.M. Kay en C. Monckton, Pergamon Press, Oxford, p. 185, 1965.  
FRANK, G.B., *Nature* 182, 1800 (1958).  
FRANK, G.B., *J. Physiol.* 151, 518 (1960).  
FRANK, G.B., *J. Physiol.* 163, 254 (1962).  
GASSER, H.S., *Physiol. Rev.* 10, 35 (1930).  
HANSON, J. en LOWY, J., *J. Physiol.* 149, 31P (1959a).  
HANSON, J. en LOWY, J., *Nature* 184, 286 (1959b).  
HANSON, J. en LOWY, J., in: *Structure and Function of Muscle*, ed. G.H. Bourne, Academic Press, London, vol. 1, hfdst. 9, 1960.  
HANSON, J. en LOWY, J., *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 154, 173 (1961).  
HANSON, J., LOWY, J., HUXLEY, H.E., BAILEY, K., KAY, C.M. en RÜEGG, J.C., *Nature* 180, 1134 (1957).  
HASSELBACH, W. en MAKINOSE, M., *Biochem. Z.* 339, 94 (1963).  
HEILBRUNN, L.V. en WIERCINSKY, F.J., *J. cell. comp. Physiol.* 29, 15 (1947).  
HILL, A.V., *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 135, 446 (1948).  
HILL, A.V., *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 136, 399 (1949).  
HINKE, J.A.M., in: *Muscle*, ed. W.M. Paul, E.E. Daniel, C.M. Kay en C. Monckton, Pergamon Press, Oxford, p. 269, 1965.  
HODGKIN, A.L. en KEYNES, R.D., *J. Physiol.* 138, 253 (1957).  
HOLTZMAN, D. en AGIN, D., *Nature* 205, 911 (1965).  
HOYLE, G. en LOWY, J., *J. exp. Biol.* 33, 295 (1956).  
HUXLEY, H.E., *Brit. Med. Bull.* 12, 171 (1956).  
HUXLEY, A.F., *Progr. Biophys.* 7, 255 (1957).  
HUXLEY, A.F. en TAYLOR, R.E., *J. Physiol.* 144, 426 (1958).  
JEWELL, B.R., *J. Physiol.* 149, 154 (1959).  
JOHNSON, W.H., KAHN, J.S. en SZENT-GYÖRGYI, A.G., *Science* 130, 160 (1959).  
JOHNSON, W.H. en TWAROG, B.M., *J. gen. Physiol.* 43, 941 (1960).  
JOHNSON, W.H., in: *Muscle*, ed. W.M. Paul, E.E. Daniel, C.M. Kay en C. Monckton, Pergamon Press, Oxford, p. 131, 1965.  
JORDAN, H.J., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 106, 189 (1905).  
JORDAN, H.J. en POSTMA, N., *Proc. Ned. Akad. Wet. Amsterdam* 44, 1169 (1941).  
KIPP, P.J., *Arch. Néerl. Physiol.* 24, 425 (1939).  
VON KRIES, A.J., *Arch. Physiol.* 348, 1880.

- KUTSCHA, W., *Z. Biol.* 114, 152 (1964).
- LASZT, L. en HAMOIR, G., *Biochim. Biophys. Acta* 50, 430 (1961).
- LEE, K.S., TANAKA, K. en YU, D.H., *J. Physiol.* 179, 456 (1965).
- LEENDERS, H.J., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 281, 55 (1964).
- LEENDERS, H.J., *Naturwissenschaften* 53, 617 (1966).
- LOWY, J. en HANSON, J., *Physiol. Rev.* 42, Suppl. 5, 34 (1962).
- LOWY, J. en MILLMAN, B.M., *Phil. Transact. B* 246, 105 (1963).
- LOWY, J., MILLMAN, B.M. en HANSON, J., *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 160, 525 (1964).
- MAAS, J.A., *Arch. Néerl. Physiol.* 23, 141 (1938).
- MARSH, B.B., *Biochim. Biophys. Acta* 9, 247 (1952).
- MINIHAN, K. en DAVIES, R.E., *Nature* 208, 1327 (1965).
- MINIHAN, K., KICK, C.J. en DAVIES, R.E., *Fed. Proc.* 24, 143 (1965).
- MÜHLRAD, A., KOVÁCS, M. en HEGYI, G., *Biochim. Biophys. Acta* 107, 567 (1965).
- NEEDHAM, D.M. en WILLIAMS, J.M., *Biochem. J.* 89, 534 (1963).
- NEEDHAM, D.M. en SHOENBERG, C.F., *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 160 517 (1964).
- NIEDERGERKE, R., *J. Physiol.* 128, 12P (1955).
- VANNIEUWENHOVEN, L.M., *An Investigation into structure and function of the ABRM of Mytilus edulis L.*, Thesis, Utrecht, 1947.
- PARNAS, J., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 134, 441 (1910).
- PAVLOV, J., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 37, 6 (1885).
- PORTER, K.R. en PALADE, G.E., *J. biophys. biochem. Cytol.* 3, 269 (1957).
- PORTZEHL, H., *Z.f. Naturforsch.* 6 b, 355 (1951).
- PORTZEHL, H., ZAORALEK, P. en GRIEDER, A., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 286, 44 (1965).
- POSTMA, N., *Proc. Roy. Acad. Sci. Amsterdam* 37, 348 (1934).
- POSTMA, N., *Proc. Roy. Acad. Sci. Amsterdam* 38, 1036 (1935).
- POSTMA, N., *Versl. Kon. Ned. Akad. v. Wet. Amsterdam* 52, 380 (1943).
- POSTMA, N. en DE JONG, D.J., *Acta brevia néerl.* 14, 15 (1946).
- POSTMA, N., *Acta physiol. pharmacol.* 4, 587 (1956).
- PRYOR, M.G.M., *Progr. Biophys.* 1, 216 (1950).
- RAUH, F., *Z. Biol.* 76, 25 (1922).
- REICHEL, H., *Muskelfysiologie*, Springer-Verlag, Berlijn, 1960.
- RITCHIE, A.D., *The Comparative Physiology of Muscle*, Cambridge University Press, Cambridge, 1928.
- RITCHIE, J.M., *J. Physiol.* 126, 155 (1954).
- RÜEGG, J.C., *Biochem. biophys. Res. Comm.* 6, 24 (1961).
- RÜEGG, J.C., *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 154, 224 (1961).

- RÜEGG, J.C., STRAUB, R.W. en TWAROG, B.M., Proc. Roy. Soc. Lond. B 158, 156 (1963).
- RÜEGG, J.C. en WEBER, H.H., in: Perspectives in biology, ed. C.F. Cori, V.G. Foglia, L.F. Leloir en S. Ochoa, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, p. 301, 1963.
- RÜEGG, J.C., Proc. Roy. Soc. Lond. B 160, (1964).
- RÜEGG, J.C., Helv. physiol. pharmacol. Acta. Suppl. XVI, 1 (1965).
- SANDOW, A., J. cell. comp. Physiol. 24, 221 (1944).
- SANDOW, A., Yale J. Biol. Med. 25, 176 (1952).
- SANDOW, A., Pharmacol. Rev. 17, 265 (1965).
- SANDOW, A., MCV. Quarterly 2, 82 (1966).
- SANDOW, A. en PREISER, H., Science 146, 1470 (1964).
- SCHÄDLER, M.H., Pflügers Arch. ges. Physiol. 291, R93 (1966).
- SCHIRMER, R.H., Biochem. Z. 343, 269 (1965).
- SRÉTER, F.A. en GERGELY, J., Biochem. biophys. Res. Comm. 16, 438 (1964).
- SWINDEREN, J.W. DE MAREES VAN, De regeling van den tonus in spieren van Helix pomatia, Thesis, Utrecht, 1928.
- TAKAHASHI, K., Annot. zool. jap. 33, 67 (1960).
- TWAROG, B.M., J. cell. comp. Physiol. 44, 141 (1954).
- TWAROG, B.M., J. Physiol. 152, 220 (1960a).
- TWAROG, B.M., J. Physiol. 152, 236 (1960b).
- VON UEXKUELL, J.J., Z. Biol. 39, 73 (1900).
- WAHLER, B. en WOLLENBERG, A., Biochem. Z. 329, 508 (1958).
- WEBER, A., Biochim. Biophys. Acta 7, 214 (1951).
- WEBER, A., HERZ, R. en REISS, J., Proc. Roy. Soc. Lond. B 160, 486 (1964).
- WINTON, F.R., J. Physiol. 88, 492 (1937).
- YEO, G.F., J. Physiol. 9, 396 (1888).

Aan de Heren C.A.H.M. van Raay en G.H.M. Dekkers wordt dank gebracht voor hun bekwame assistentie bij een deel van het experimentele onderzoek.

De schrijver is de afdeling Illustratie van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen erkentelijk voor de punctuele uitvoering van de figuren.

De schrijver is dank verschuldigd aan de Heer J.F. Gerrits van de afdeling Instrumentatie voor de nauwgezette constructie van de dilatometer.



## STELLINGEN

### 1

Evenals pH-daling bewerkt de ATPase-activiteit een verandering in de toestand van het paramyosine, hetgeen een invloed heeft op de verbrekingssnelheid van de interfilamentaire bindingen.

Dit proefschrift.

### 2

Het moet betwijfeld worden of de snelle verslapping na afloop van de tetanus toe te schrijven is aan het vrijmaken van een *relaxant*.

Dit proefschrift.

### 3

De *excitation-contraction coupling* beheerst de grootte van de ATPase-activiteit en daarmee de ontwikkeling van de grendeling tijdens contractie en de mate van verslapping na afloop daarvan.

Dit proefschrift.

### 4

De synthesesnelheid van eiwitten en nucleïne-zuren in organismen hoeft niet gelijk te zijn aan de snelheid, waarmee radioactieve bouwstenen in deze verbindingen worden ingebouwd.

A. Newton, P.P. Dendy, C.L. Smith, P. Wildy: *Nature* 194, 886 (1962).

L. Smets: *Nature* 211, 527 (1966).



5

De silicaatopname van *Proteus mirabilis* is vergelijkbaar met de ionenaccumulatie van mitochondriën.

W. Heinen: Arch.Biochem.Biophys. 118 (1967), in druk.

6

De door Niebergall et al. gewijzigde berekening van  $K_i$  en  $K_m$  verdient de voorkeur boven de tot heden gebezigde methode.

P.J. Niebergall, E.T. Sugita, J.T. Doluisio: Anal.Biochem. 16, 189 (1966).

7

De mening van T. Dobzhansky: '*The ideal of mankind free of all forms of genetic loads may be not only unattainable but also unacceptable, owing to the adaptively ambivalent effects of some of these load forms*', kan onderschreven worden.

T. Dobzhansky: Science 155, 409 (1967)

8

Het verdient aanbeveling bij een meningsverschil tussen gecommitteerden en examinatoren tijdens eindexamens op het gymnasium, in het geval dat het examencijfer beslissend kan zijn voor het al dan niet slagen van de kandidaat, het gemiddelde van de cijferlijsten van het laatste leerjaar te laten meetellen.

PROMOTOR:

PROF. DR. L.M. VAN NIEUWENHOVEN S.J.

De veronderstelling, dat de rust-stofwisseling van zogenaamde poikilothermedieren onderworpen zou zijn aan grote en snelle temperatuurschommelingen, is onjuist.

R.C. Newell: Nature 212, 426 (1966).

Een politieke partij dient slechts dan in de tweede kamer van de Staten Generaal te worden toegelaten, indien deze 5% van de geldig uitgebrachte stemmen behaald heeft.

