

Phyton (Austria)	Vol. 20	Fasc. 3—4	235—249	30. 9. 1980
------------------	---------	-----------	---------	-------------

Der Einfluß von Isoptin (Verapamil) auf die Wasserpermeabilität der Innenepidermiszellen von *Allium cepa*

Aus dem Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Wien

Von

Waltraud GERDENITSCH *)

Eingegangen am 22. Oktober 1979

Summary

The Influence of Isoptin (Verapamil) on the Water Permeability of the Inner Epidermal Cells of *Allium cepa*

Isoptin (α -isopropyl- α -[(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -aminopropyl]-3,4-dimethoxyphenylacetoneitril) used in medicine as a drug against cardiac diseases reduces the oxygen requirement of the beating heart. This effect is due to an inhibition of the Ca^{++} dependent ATPase. On plant cells it acts quickly and heavily toxic in higher concentrations (10^{-2}M , 10^{-3}M). For cells of the inner epidermis of *Allium cepa* bulb scales the resistivity limit is found at a concentration of 10^{-4}M , the investigations were done at a concentration of 10^{-5}M , which is suffered for rather a long time.

In every case the influence of isoptin causes an increase of WP to a multiple of the "normal" values. The amount of this increase depends on the time of isoptin treatment. It raises with duration of action of isoptin before the begin of the experiment itself (1st deplasmolysis). In apparent contrast to that experiments with KCl/CaCl_2 mixed solution show a stepwise decline of $2K_{\text{WO}}$ values enhanced by isoptin; during the course of the experiment a recovery increasing with every phase (1st deplasmolysis, 1st plasmolysis ...) could be observed. It indicates the reversibility of the isoptin effect.

Especially with "glucose-experiments" the effect of isoptin can be seen obviously because of the total lack of the partial compensation of isoptin molecules by Ca^{++} .

In connection with the mode of action of isoptin the possibility of an interference in membrane transport processes is discussed. For the increasing of water permeability (WP) observed a model is suggested supposing some kind of "pore formation" by insertion of isoptin molecules into the membrane and connection to certain membrane components.

*) Dr. W. GERDENITSCH, Institut für Pflanzenphysiologie der Universität, Dr. Karl Lueger-Ring 1, A-1010 Wien, Austria.

Evaluating the amount of WP enhancement caused by isoptin the enhancement of $2K_{WO}$ of the 1st deplasmolysis due to rinsing more than 8 hours has to be considered.

Zusammenfassung

Das in der Medizin als Herzmittel verwendete Isoptin (α -Isopropyl- α -[(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -aminopropyl]-3,4-dimethoxyphenylacetonitril) verringert den O_2 -Bedarf des Herzens durch eine Hemmung der Ca^{++} -abhängigen, ATPase. Es wirkt auf Pflanzenzellen in höheren Konzentrationen ($10^{-2}M$, $10^{-3}M$) schnell und stark giftig. Für *Allium cepa* liegt die Resistenzgrenze bei $10^{-4}M$, untersucht wurde bei $10^{-5}M$, einer Konzentration, die lange ertragen wird.

Unter Einfluß von Isoptin trat in jedem Fall eine Erhöhung der WP um ein Vielfaches des „Normalwertes“ auf. Die Erhöhung nimmt grundsätzlich mit der Dauer der Isoptineinwirkung vor dem eigentlichen Versuchsbeginn (= 1. Deplasmolyse) zu. Scheinbar im Widerspruch dazu konnte in Versuchen mit K/Ca-Mischlösung ein stufenweises Absinken der durch Isoptin erhöhten $2K_{WO}$ -Werte beobachtet werden; im Verlauf des Versuches trat eine, mit jedem Versuchsabschnitt zunehmende, „Erholung“ ein. Sie weist auf die Reversibilität der Isoptinwirkung hin. Besonders deutlich ist der Isoptineinfluß in Glucoseversuchen, bei denen sich auch die Schädlichkeit viel stärker auswirkt. Hier fällt die teilweise Kompensation der Isoptinmoleküle durch Ca^{++} ja ganz weg.

In Zusammenhang mit der Wirkungsweise wird die Möglichkeit eines Eingreifens in Transportvorgänge der Membran allgemein diskutiert. Für die spezielle Erhöhung der Wasserpermeabilität (WP) wird ein Modell vorgeschlagen, das eine „Porenbildung“ durch Einlagerung von Isoptinmolekülen in die Membran und Verbindung mit bestimmten Membrankomponenten annimmt. Bei der Bewertung der WP-Erhöhung muß die nach längerer Wässerungsdauer (ab etwa 8 Stunden) auftretende Erhöhung der $2K_{WO}$ -Werte für die erste Deplasmolyse (1. Depl.) berücksichtigt werden.

Einleitung

Die Permeabilitätseigenschaften pflanzlicher Protoplaste sind seit langem Gegenstand der botanischen Zellphysiologie. Besonders die Innenepidermiszellen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* sind wegen ihrer leichten Präparierbarkeit, ihrer Einschichtigkeit (die einen gleichmäßigen Lösungszutritt gewährleistet) und der meist recht regelmäßigen Zellformen ein beliebtes Untersuchungsobjekt. Unter anderen beschäftigten sich HÖFLER 1931, DE HAAN 1933, LOEVEN 1951, CASARI 1953, URL 1971, PEDELISKI 1973 und GERDENTITSCH 1977 mit diesem Objekt und untersuchten vor allem auch die Durchschnittsgeschwindigkeit des Wassers durch das lebende Protoplasma. Die in diesem Arbeiten angegebenen Werte liegen — nach Umrechnung in eine heute häufig verwendete Permeationskonstante für Wasser, $2K_{WO}$ nach STADELMANN (1963: 682, Dim. = $1 \times 10^{-4} \text{ cm/sec}$) — in einem ziemlich engen Rahmen ($2K_{WO}$ von ca. 4–11). Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann dieser als der „Normalbereich“ der

Wasserpermeabilität (WP) für *Allium*-Innenepidermiszellen angesprochen werden. Dabei ist die Höhe der Wasserpermeabilität auch weitgehend unabhängig davon, ob als Plasmolytikum Glucose, Saccharose, Mannit oder ein Gemisch aus KCl und CaCl_2 (URL 1971: 431) verwendet wurde.

URL (1971) erwähnt jedoch, daß in EDTA plasmolysierte Zellen eine weit höhere WP haben ($2K_{\text{WO}}$ -Werte von 20–50) als die Zellen in entsprechenden Kontrollversuchen ($2K_{\text{WO}}$ zwischen 6 und 10). Ein Einfluß auf die Höhe der WP wurde schon 1942 von BIEBL und 1949 von TOTH nach Bestrahlung mit UV-Licht festgestellt. Die WP erhöht sich dabei um ein Drittel. Auch die Temperatur und der physiologische Zustand der Zwiebeln (ruhend oder austreibend) sind Faktoren, die sich auf die Höhe der WP auswirken. Eine Wirkung auf die Durchtrittsgeschwindigkeit des Wassers konnte auch an anderen Objekten und für verschiedene Substanzen, z. B. Auxine (MÜLLER & RAMSHORN 1957, BRAUNER & HASMAN 1949, 1952), Fusarinsäure (GÄUMANN *et al.* 1952, HEINRICH 1962), Lycomarasin (GÄUMANN & BACHMANN 1957) etc. nachgewiesen werden. In allen diesen Fällen scheint eine Wirkung auf die Plasmamembranen vorzuliegen, die sich in einer Veränderung der Wasserpermeabilität manifestiert.

Isoptin (α -Isopropyl- α -(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -aminopropyl]-3,4-dimethoxyphenylacetonitril) ist ein in der Medizin seit ca. 1960 angewandtes Koronartherapeutikum mit ausgeprägtem Ca-Antagonismus und membranaktiver Wirkung (BELZ & BENDER 1973, FLECKENSTEIN *et al.* 1969). Der calciumantagonistische Effekt beruht auf einer Hemmung des transmembranären Calciuminflux. Es soll nach NAYLER & SZETO 1972 die Verfügbarkeit ionisierten Calciums verändern, indem es die Anzahl der membranlokalisierten Bindungsstellen, die für die Akkumulation von Ca^{++} nötig sind, reduziert. FLECKENSTEIN 1970 gibt an, daß in Versuchen am Myocard von Warmblütern die Isoptinwirkung durch einen Überschuß an Ca^{++} -Ionen in der Außenlösung aufgehoben wird.

Bei Versuchen von WILLERT 1972 und WILLERT & KLUGE (1973) an pflanzlichem Material zeigte sich seine Membranaktivität in einer reversiblen Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Plasmagrenzschichten; unter Isoptineinfluß läßt sich bei den Crassulaceen *Bryophyllum* (*Kalanchoe*) *tubiflorum* und *B. daigremontianum* auf eine deutliche Erhöhung der Permeabilität für Malat schließen. Untersuchungen an der einzelligen Alge *Poteriochromonas stipitata* (WILLERT 1977, pers. Mitt.) unterstützen diese Vermutung.

Isoptin schien nun auch im Hinblick auf eine Beeinflussung der WP sehr interessant, besonders im Vergleich zur Wirkung von UV-Strahlung, EDTA etc.

Material und Methode

Die Hauptversuche wurden im Winter 1976/77 an Innenepidermen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* durchgeführt. Es wurden ruhende, helle

Sorten, vor allem „Goldkugel“ oder „Gelbe Wiener“ verwendet. Die Präparation der Epidermen erfolgte nach der gebräuchlichen Methode (vgl. STRUGGER 1931, 1949, URL 1971); in den meisten Fällen wurde die Epidermis der 3. lebenden Schuppe verwendet.

Vier verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung wurden nebeneinander angewendet. Sie sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Zusammenstellung der in dieser Arbeit angewendeten Arten der Vorbehandlung

Nr.	Bezeichnung	Wässerungsdauer	Einwirkungsdauer der Isoptinlösung
1	Kontrolle	1— 3 h *)	—
2	„sofort“	—	3—10 h
3	„nach 1 Std.“	1— 3 h	3—10 h
4	„vor Versuchsbeginn“	8—48 h	1— 5 h

*) Bei Versuchen, die parallel zu anderen, mit längerer Vorbehandlungsdauer angesetzt wurden, verlängerte sich dieser Grundwert auf die Dauer der Vorbehandlungszeit des Parallelversuches.

Ein Teil der Epidermen verblieb als Kontrolle auf Leitungswasser, die anderen wurden entweder sofort nach dem Entlüften, nach 1—3 Stunden Wässerungsdauer oder nach längerer Wässerung (8—48 Stunden), relativ kurz vor dem Einlegen in das Plasmolytikum ca. 1—5 h vorher), auf die Isoptinlösung gebracht. Von jeder Schnittserie wurden zumindest die ersten drei Vorbehandlungsarten angesetzt. Nach verschieden langer Vorwässerung (1—48 h) in Leitungswasser und/oder entsprechend langer Vorbehandlung in 10^{-5}M Isoptinlösung (vgl. Tab. 1) wurden die Zellen entweder in Glucose oder einem K/Ca-Gemisch (vgl. S. 242) — meist 0,8 oder 0,9 osmolar — vorplasmolysiert. Das Plasmolytikum wurde entweder rein oder mit Isoptin (10^{-5}M) versetzt geboten. Tab. 2 gibt eine Aufstellung der angewandten Möglichkeiten.

Die Versuche erfolgten in einer Durchströmungskammer nach WERTH 1961, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen war. Eine Injektionspritze, zwischen Kammer und Pumpe über ein Y-Stück angeschlossen, ermöglichte einen raschen Lösungswechsel und damit eine exakte Bestimmung des Zeitpunktes des Lösungswechsels (zur Versuchsmethodik vgl. URL 1971: 431—433). Je nach Vorplasmolyse-Art wurden auch während des Versuchsverlaufes reine Lösungen oder ein Gemisch aus Plasmolytikum und Isoptin verwendet.

Die Beobachtung erfolgte mit einem Mikroskop Zetopan (Reichert), das mit einem langbrennweitigen Phasenkondensor ausgestattet war, der die Einstellung einer exakten Köhler'schen Beleuchtungsanordnung

Tabelle 2
Übersicht über die Durchführung der Versuche

Code	Nr.	Vorbehandlung Bezeichnung	Plasmolytikum	Vorplasma- lysedauer *)
a	1	Kontrolle	rein	1–3 h
a+	1	Kontrolle	+Isoptin	1–3 h
b	2	„sofort“	rein	1–3 h
b+	2	„sofort“	+Isoptin	1–3 h
c	3	„nach 1 Std.“	rein	1–3 h
c+	3	„nach 1 Std.“	+Isoptin	1–3 h
d	4	„vor Versuchsbeg.“	rein	1–1 ½ h
d+	4	„vor Versuchsbeg.“	+Isoptin	1–1 ½ h

*) In einigen Versuchen, wo die Vorplasmolyse länger dauert, wird das bei der Auswertung berücksichtigt und extra angegeben.

Tab. 2 gibt eine Aufstellung der verwendeten Möglichkeiten der Versuchsanordnung.

— auch bei einer Kammerdicke von 10 mm — ermöglichte. Schwach vergrößernde Objektive (6×, 8×, 10×) ergaben in Kombination mit dem Phasenring Nr. 3 ein gutes Dunkelfeld, das für die photographische Registrierung am geeignetsten ist. Durch Einschwenken eines passenden Phasenobjektivs konnte jederzeit der Lebenszustand der Zellen überprüft werden. Photographiert wurde mit einer Robot-Motor-Kamera (vgl. URL 1971) auf niedrigempfindliche Filme und Dokumentenfilme. Die Auswertung der Filme erfolgte am Negativ mit Hilfe eines modifizierten Prado-Universal-Projektors (Leitz).

Die WP wurde nach der Formel $2K_{WO}$ von STADELMANN (1963: 682) berechnet.

$$2K_{WO} = 32 \cdot \frac{b}{C \cdot l_0 \cdot (t_2 - t_1)} \left[\left(l_0 - \frac{b}{3} \right) \cdot \lg \frac{l_1 - l_0}{l_2 - l_0} + \frac{b}{3} \cdot \lg \frac{l_1}{l_2} \right]$$

Dabei ist C die Konzentration des Plasmolytikums, in dem die Endlänge des Protoplasten (l_0) erreicht wird, b die Breite der Zelle, l_1 und l_2 die Länge des Protoplasten zu den Zeiten t_1 und t_2 ; die Dimension ist 1×10^{-4} cm/sec.

Für die Zeichnung der Permeabilitätskurven wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. F. FIRNEIS vom Institut für Informationsverarbeitung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften ein eigenes Computerprogramm erstellt, das für jede Zelle aus den abgelesenen l-Werten die jewei-

gen Plasmolysegrade ($G = \frac{1 - \frac{b}{3}}{h}$), wobei h = Zelllänge) errechnet und

in einem Diagramm gegen die Zeit aufträgt. Für mehrere vorgegebene Kurvenabschnitte wird die WP berechnet. Alle Zellen eines Versuches werden nacheinander bearbeitet. Anhand der gewonnenen Ausdrücke erfolgt nun mit Hilfe der Kurven — nach den Regeln von PEDELISKI & STADELMANN 1974 — eine Auswahl der geeigneten $2K_{WO}$ -Werte.

Das verwendete Isoptin stammte von der Fa. Knoll AG. Es wurde in destilliertem Wasser gelöst.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde ein t-Test gerechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit 5% angenommen. Im folgenden wird der Mittelwert $\pm$ Konfidenzintervall angegeben.

Ergebnisse

Nach Vorbehandlung und Plasmolytikum läßt sich das Versuchsmaterial in verschiedene Gruppen gliedern (vgl. Tab. 1 u. 2).

A) Versuche mit Glucose

a) Kontrolle $\rightarrow$ Glucose rein:

Aus 10 Kontrollversuchen mit zusammen 117 $2K_{WO}$ -Werten konnte ein Mittelwert von $6,23 \pm 0,29$ errechnet werden, der für eine Wässerungszeit von ca. 1–3 Stunden charakteristisch ist. Die Werte für die erste Deplasmolyse (1. Depl) können sich bis auf das Doppelte erhöhen, wenn die Epidermen länger gewässert werden. Eine gesonderte Mittelwertbestimmung für diese Fälle ergab für 26 Werte: $12,75 \pm 0,73$.

a+) Kontrolle $\rightarrow$ Glucose + Isoptin:

Hier wird die Erhöhung nach langer Wässerung besonders auffallend. Für 58 Werte aus 5 Versuchen mit kurzer Wässerung wurde ein durchschnittliches $2K_{WO}$ von $12,73 \pm 2,48$ errechnet. Drei Versuche mit längerer Wässerungsdauer lieferten 18 Werte, deren Mittel bei $44,75 \pm 5,34$ lag. Alle Werte entstammen der 1. Depl. Die Zellen leben nach dem Erreichen von I_0 weiter und zeigen Strömung, es kann sich also *nicht* um Tonoplasten handeln.

b) „sofort“ $\rightarrow$ Glucose rein:

In den meisten Versuchsansätzen, bei denen sofort auf Isoptinlösung gelegt worden war, war die Isoptinwirkung so stark, daß sofort nach dem ersten Lösungswechsel Tonoplasten auftraten. Nur bei zwei Versuchen war es möglich, WP-Werte zu ermitteln. Sie zeigten mit Mittelwerten von $6,24 \pm 0,36$ sowie $6,45 \pm 0,36$ (jeweils für die 1. Depl.) und $9,32 \pm 1,73$ sowie $8,65 \pm 1,12$ (jeweils für die erste Plasmolyse (1. Pl.)) nur geringe Abweichungen von der Kontrolle; der Isoptineinfluß auf die WP scheint hier nur schwach ausgeprägt.

b+) „sofort“ → Glucose + Isoptin:

Mit den so behandelten Epidermen ließen sich keine Versuche durchführen, weil die Zellen größtenteils schon während der Vorplasmolyse abstarben.

c) „nach 1 Stunde“ → Glucose rein:

Nach einer Wässerung von 1–1½ Stunden vor der Isoptinbehandlung ließ sich die Volumsveränderung wenigstens nach einem Lösungswechsel verfolgen. Aus 8 Versuchen konnten $2K_{WO}$ -Werte berechnet werden. Hier wurden wegen der auftretenden Unterschiede die Werte für jeden Versuch und auch für die verschiedenen Versuchsabschnitte jedes einzelnen Versuches getrennt berechnet.

Z. B.:

	Anzahl der Werte	Versuchsabschnitt	Mittelwert $\pm$ Konfidenzintervall
Versuch A:	54	1. Depl. + 1. Pl.	15,25 $\pm$ 0,88
	26	1. Depl.	12,75 $\pm$ 0,72
Versuch B:	14	1. Pl.	14,47 $\pm$ 2,36
	34	2. Depl.	17,15 $\pm$ 1,16

Aus zwei anderen Versuchen wurde ein Gesamtmittelwert (über alle Versuchsabschnitte beider Versuche) berechnet: 127 Werte, Mittelwert: 15,15 $\pm$ 0,62.

c+) „nach 1 Stunde“ → Glucose + Isoptin:

Hier traten fast nur Teilprotoplaste auf, sodaß eine Auswertung kaum sinnvoll schien.

d) „vor Versuchsbeginn“ → Glucose rein:

Diese Art des Versuchsansatzes wurde bei Glucoseversuchen nicht berücksichtigt, weil die Werte bei einigen orientierenden Vorversuchen von denen der Behandlungsart c (vgl. Tab. 2) nicht abwichen.

d+) „vor Versuchsbeginn“ → Glucose + Isoptin:

Hier wurden zwei Versuche ausgewertet. Nach 10 Stunden Wässerung und etwa gleich langer Vorbehandlung mit Isoptin wurde für zwei Schwester-schnitte in dem einen, früheren Versuch für die 1. Depl. ein Mittelwert von 12,12 $\pm$ 1,02, im anderen, späteren Versuch für die 1. Depl. und die 1. Pl. (wegen ähnlicher Werte zusammengefaßt) ein Mittel von 21,43 $\pm$ 2,27 berechnet.

Glucose ertrugen die Zellen in Verbindung mit Isoptin nicht gut, daher wurde versucht, ob sich die Isoptineffekte — trotz des angeblichen Ca-

Antagonismus (vgl. S. 245) — auch in der Mischlösung $KCl/CaCl_2$ zeigten, und die Versuche in diesem, für WP-Versuche viel verwendeten Plasmolytikum durchgeführt werden konnten.

B) Versuche mit $KCl/CaCl_2$ -Mischlösung

a) Kontrolle:

Wie auch bei den Glucoseversuchen sind die Kontrollwerte überaus gleichmäßig. Zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten (1., 2. — Depl., 1., 2. ..Pl.) treten ebenso wie zwischen den einzelnen Versuchen keine signifikanten Unterschiede auf. Alle Kontrollversuche konnten gemeinsam behandelt werden. Aus insgesamt 428 Werten ergab sich ein Mittel von $8,18 \pm 0,15$ für $2K_{wo}$. Ähnlich wie bei Glucose hat auch hier die Dauer der Vorwässerung einen Einfluß auf die Höhe der WP während der 1. Depl. Im 2. Versuch vom 24. 11. 1976, bei dem (parallel zu einem Versuch, bei dem die gesamte Vorbehandlungsdauer 24 Stunden betrug) 24 Stunden vorgewässert worden war, ergab sich z. B. für die 1. Depl. aus 39 Werten ein Mittel von $11,14 \pm 0,34$. Die darauffolgende Plasmolyse ergab aus 30 Werten ein Mittel von $6,03 \pm 0,35$, die 2. Depl. aus 24 Werten eines von $7,34 \pm 0,25$.

a+) Kontrolle $\rightarrow K/Ca +$ Isoptin:

Im allgemeinen erhöht Isoptin hier die WP, das Ausmaß dieser Erhöhung hängt jedoch stark von der Dauer der Vorplasmolyse — und damit der Dauer der Isoptineinwirkung — ab. Auch hier beeinflußt eine lange Vorwässerung die Höhe der Werte. Tab. 3 gibt einige Beispiele für diese Art des Versuchsansatzes. Die Erhöhung wird besonders bei Werten aus dem 1. Depl.-Abschnitt deutlich. Die WP sinkt in der Folge und pendelt sich auf einen „Normalwert“ (Beispiel A und B) ein. Bei Beispiel C verstärkt sich der Isoptineffekt bis zur 2. Depl.; der Mittelwert von $11,61 \pm 0,38$ ist — wegen der noch relativ kurzen Einwirkungsdauer — wahrscheinlich allein auf die lange Wässerung zurückzuführen.

Tabelle 3

Zusammenstellung einiger Beispiele zum Versuchsansatz a+ (vgl. Tab. 2)

Beispiel	Vorw. (in h)	Vorpl. (in h)	Versuchs- abschnitt	Anzahl d. Werte	$2K_{wo}$
A	6	ca. 3	1. Depl.	146	$13,43 \pm 0,51$
			1. Pl.	34	$7,95 \pm 0,65$
			2. Depl.	38	$7,08 \pm 0,30$
B	6	$1-1\frac{1}{2}$	1. Depl.	37	$8,78 \pm 0,49$
			1. Pl.	22	$5,05 \pm 0,52$
			2. Depl.	62	$7,04 \pm 0,28$
C	12—48	ca. 3	1. Depl.	46	$13,43 \pm 0,51$
		ca. 3	2. Depl.	16	$12,40 \pm 0,59$

b) „sofort“ $\rightarrow$ K/Ca rein:

Die Schnitte wurden sofort nach dem Entlüften für 3–5 Stunden auf die Isoptinlösung gelegt, danach wurden sie ca. 2 Stunden in reiner K/Ca-Lösung vorplasmolysiert. Aus 8 Versuchen konnten für die 1. Depl. 207 Werte gewonnen werden, die ein Mittel von $7,22 \pm 0,20$ ergaben. Hier werden die $2K_{WO}$ -Werte für die 1. Depl. durch längere Vorwässerung nicht erhöht.

b+) „sofort“ $\rightarrow$ K/Ca + Isoptin:

Bei kurzer Vorbehandlung (weniger als 6 Stunden) und einer Vorplasmolysedauer von etwa 4 Stunden ergeben 102 Werte aus 6 Versuchen für die 1. Depl. ein Mittel von $10,02 \pm 0,31$, das ist signifikant höher als die Kontrolle. Nach langer Vorbehandlung (24–48 Stunden) und kurzer Vorplasmolyse in der Mischlösung ergeben sich Werte, ähnlich denen der Kontrolle. Die folgende Aufstellung gibt dazu Beispiele.

184 Werte	1. Depl.	$8,25 \pm 0,24$	(3 Versuche)
71 Werte	1. Pl.	$6,18 \pm 0,23$	(3 Versuche)

c) „nach 1 Std.“ $\rightarrow$ K/Ca rein:

Auch hier wird die Erhöhung der WP durch Isoptin gegenüber den Kontrollwerten deutlich. Je nach Vorbehandlungs- und Vorplasmolyse-dauer liegen die Werte für die 1. Depl. zwischen etwa 8 und 39. Im Verlauf des Versuches sinken die $2K_{WO}$ -Werte mit jedem Abschnitt und können bei genügend langer Versuchsdauer fast Kontrollwerte erreichen.

Z. B.: 24 h Vorbehandlung, 2 h Vorplasmolyse:

1. Depl.	22 Werte	$30,11 \pm 2,56$
1. Pl.	42 Werte	$38,87 \pm 5,31$
2. Depl.	46 Werte	$21,00 \pm 1,06$
2. Pl.	34 Werte	$17,62 \pm 1,05$
3. Depl.	64 Werte	$10,11 \pm 0,33$

c+) „nach 1 Std.“ $\rightarrow$ K/Ca + Isoptin:

Grundsätzlich tritt hier eine Erhöhung der WP auf, deren Ausmaß stark von der Dauer der Vorbehandlung abhängt.

Z. B.: 30 Minuten Vorbehandlung, $3\frac{1}{2}$ h Vorplasmolyse:

25 Werte	1. Depl.	$10,10 \pm 0,39$
12 h Vorbehandlung, 3 h Vorplasmolyse:		
32 Werte	1. Depl.	$9,00 \pm 0,45$
29 Werte	1. Pl.	$6,25 \pm 0,29$

Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsabschnitten ist hier höchst signifikant.

24 h Vorbehandlung, 4 h Vorplasmolyse:

23 Werte	1. Depl.	$53,52 \pm 6,95$
17 Werte	1. Pl.	$10,79 \pm 1,40$
15 Werte	2. Depl.	$13,60 \pm 1,31$

Auffallend ist hier der hohe Wert für die 1. Depl., der Tonoplastenwerten (GERDENITSCH & URL 1978) nahekommmt, doch handelt es sich hier um intakte Protoplaste, was auch an den niedrigen Werten der späteren Abschnitte ersichtlich wird. Die Erhöhung der WP ist also mit großer Sicherheit allein auf den Isoptineinfluß zurückzuführen.

d) „vor Versuchsbeginn“ → K/Ca rein:

Von diesem Versuchsansatz wurden nur wenige Versuche gemacht, die aber alle ähnliche Ergebnisse zeigten. Die $2K_{WO}$ -Werte für Deplasmolyseabschnitte waren erhöht, während für die Plasmolyse Werte um den Kontrollwert (ca. 8) festgestellt wurden.

Z. B.: 18 h Wässerung, 5 h Vorbehandlung, 1 h Vorplasmolyse:

aus 2 Versuchen:	1. Depl.	100 Werte	$11,99 \pm 0,38$
	1. Pl.	33 Werte	$7,73 \pm 0,71$
	2. Depl.	25 Werte	$11,95 \pm 0,83$

d+) „vor Versuchsbeginn“ → K/Ca + Isoptin:

Alle Versuche dieser Variante des Versuchsansatzes wurden wegen Schwierigkeiten bei der Abrundung der Protoplaste während der Plasmolyse (krampfartige Protoplastenformen, Bruchsäcke (siehe GERDENITSCH & URL, 1978) ...) vorzeitig abgebrochen und erbrachten keine Werte.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Unter Einfluß von Isoptin steigt die Durchlässigkeit für Wasser in fast allen Fällen. Diese grundsätzliche Erhöhung der WP bei Innenepidermiszellen von *Allium cepa* scheint aber nicht allein auf den in der Broschüre der Knoll AG. (1972) angeführten und auch von FLECKENSTEIN 1970 beschriebenen Ca-Antagonismus zu beruhen, was ja schon dadurch bestätigt wird, daß auch in der KCl/CaCl₂-Isoptin-Mischlösung und in der KCl-/CaCl₂-Lösung dieser Einfluß deutlich wird. Wahrscheinlich entwickelt Isoptin auch eine oberflächenaktive Wirkung, genauer, es verringert die Oberflächenspannung; eine erhöhte Teilprotoplastenbildung (größere Gesamtoberfläche) und Zerfall der Plasmastränge dazwischen in viele kleine Kügelchen bekräftigen diese Annahme. Zusätzliche Versuche mit dem Saponin Digitonin ergaben ein ganz ähnliches Bild.

Schon THOMSON 1890 und GIBBS 1892 fanden, daß Stoffe, die die Oberflächenspannung erniedrigen, in der Oberflächenschicht angereichert werden. Das würde einen verstärkten Einbau von Isoptinmolekülen in der

Plasmalemmamembran bedeuten, damit also eine Veränderung der Membran selbst.

NAYLER & SZETO (1972) vertreten die Ansicht, daß Isoptin die Verfügbarkeit ionisierten Calciums verändert, indem es die Anzahl der membranlokalisierten Bindungsstellen im ER, die für die Akkumulation von Ca^{++} im Lumen des ER nötig sind, reduziert. Isoptin besetzt demnach kompetitiv die Stellen für Ca^{++} . Ähnlich könnte auch im Plasmalemma ein Einbau von Isoptin eventuelle Bindungsstellen für Ca^{++} — und zwar reversibel — blockieren. Auf diese Weise ließe sich das Nachlassen des Isoptineffekts bei KCl/CaCl_2 -Versuchen nach längerer Versuchsdauer erklären. Isoptin, während der Deplasmolyse- und Plasmolysevorgänge überhaupt nicht mehr, oder in — gegenüber dem Ca^{++} — in verschwindend geringer Konzentration (10^{-5}M) geboten, würde langsam durch Ca^{++} ersetzt und „normale“ Verhältnisse wiederhergestellt. Besonders während Plasmolyse und Deplasmolyse, wo eine teilweise Neubildung des Plasmalemmas erfolgt, besteht in erhöhtem Maß die Möglichkeit des Austausches von Isoptin gegen Ca^{++} . Darauf deutet auch die Tatsache hin, daß die Isoptinwirkung auch bei lang andauernder Vorplasmolyse in der K/Ca -Lösung kaum abgeschwächt wird. In Glucoselösung, wo diese Möglichkeit eines Austausches fehlt, wirkt sich der Isoptineinfluß besonders schädlich aus. Die Zellen ertragen hier keinen Lösungswechsel zu höherer Konzentration. Während bei der Deplasmolyse vielleicht vorwiegend eine Dehnung der Membran erfolgt (sie wird deutlich dünner und platzt manchmal wie eine Seifenblase, wenn das Protoplastenvolumen zu groß wird), steht möglicherweise bei der Plasmolyse eine Neubildung, oder Neuordnung, des Plasmalemmas im Vordergrund. Sie ist wahrscheinlich unter Isoptineinfluß gestört; die Protoplaste sterben ab.

Im Zusammenhang mit dem angeblichen Ca^{++} -Antagonismus soll nun die WP im Rahmen der gesamten Membran-Transportfunktion betrachtet werden. BENTRUP 1979 gibt einen Überblick über einige neuere Vorstellungen über Transportmechanismen des Plasmalemmas. In einem Modell (lic. S. 85) stellt er einige dieser Mechanismen dar. Als erstes führt er einen primären, aktiven Transport von H^+ — eine Protonenpumpe — nach außen an. Es bestünde nun die Möglichkeit, daß die ATPase, die diese Pumpe betreibt, — ähnlich wie die calciumabhängige Myosin-ATPase im Warmblütermiocard (FLECKENSTEIN *et al.* 1969, BELZ & BENDER 1973) durch Isoptineinwirkung in ihrer Funktion beeinträchtigt oder sogar blockiert wird. Das hätte zur Folge, daß auf diesem Weg keine Protonen vom Plasma abgegeben würden. Die Aufgabe dieser Pumpe, den pH des Plasmas konstant zu halten (BENTRUP 1979) würde nicht mehr erfüllt werden und der pH-Wert sinken. Mit verändertem pH des Plasmas könnte sich auch die Leitfähigkeit der Membran und in der Folge auch ihre Durchlässigkeit für Wasser verändern. Auf eine Wirkung auf die Protonenpumpe ließe sich auch aus dem raschen Absterben der Zellen in Glucoselösung schließen.

Wenn man den bei BENTRUP beschriebenen gekoppelten H^+ /Zucker-Transport in Betracht zieht, könnte die Glucose als Plasmolytikum die Anreicherung von H^+ im Plasma — und damit die hypothetische Isoptinwirkung — verstärken.

Eine weitere Möglichkeit ist auch, daß durch Einlagerung von Isoptinmolekülen in das Plasmalemma sogenannte „Isoptinporen“ entstehen, Stellen, die eine erhöhte Permeation verschiedener Moleküle zulassen. Es könnte sich dabei um eine ähnliche Wirkungsweise handeln, wie sie von GROSS 1975 für makrocyclische Verbindungen beschrieben wird. Er unterscheidet in seiner Arbeit Cyclodepsipeptide (CDP) und Polyantibiotika. Die CDP beeinflussen in spezifischer Weise die Permeation von Alkalimetallen durch die Membran. Ganz anders wirken die Polyantibiotika. Sie reagieren mit bestimmten Membranbausteinen und erhöhen die Permeabilität der Membranen in bezug auf eindringende Stoffe unspezifisch. Ähnlich wird die Wirkung makrocyclischer Verbindungen auch von FINEAN *et al.*, 1974 HARRISON & LUNT 1977 und GOMPERS 1977 beschrieben. Die Permeabilitätssteigerung ist dabei umso größer, je kleiner das permeierende Molekül ist. Nach der gegenwärtigen Ansicht treten die Polyene mit Cholesterin in Wechselwirkung, das als Bestandteil der Lipiddoppelschicht auftritt. Dadurch soll die Bildung kurzlebiger Micellen einsetzen, die die Doppelschicht quasi durchlöchern. So können Polyene Poren mit einer Lebensdauer von einigen Millisekunden erzeugen. Niedrige Temperaturen, die aufgrund zunehmender Viskosität der Acylketten in der Doppelschicht zu einer Stabilisierung der Poren führen, lassen die durch Polyene induzierte Leitfähigkeit der Doppelschicht ausgesprochen stark ansteigen. Auch bei meinen Versuchen war im Winter, wo die Temperatur konstant relativ niedrig gehalten werden konnte (20° C), die Erhöhung der WP im Durchschnitt größer als bei im Sommer durchgeführten Versuchen, wo die Temperatur meist um 25° C lag (in einem Extremfall, mit „Extremwerten“ sogar bei 28° C).

ANDREOLI *et al.* 1969 finden eine Abhängigkeit des Anstiegs des Permeabilitätskoeffizienten von der Molekülgröße. Sie untersuchten Wasser, Harnstoff und Zucker. Kleinere Moleküle zeigten bei Polyeneinfluß eine größere Zunahme der Permeationsfähigkeit als größere. Wasser, als sehr kleines Molekül, zeigt bei den hier beschriebenen Versuchen nach Isoptinbehandlung eine stark erhöhte Permeationsfähigkeit. Interessant wäre hier die — geplante — Untersuchung der Beeinflussung der Anelektrolytpermeabilität durch Isoptin.

Ein vergleichbarer Mechanismus wie bei den Polyenen könnte vielleicht auch für die Isoptinwirkung auf die Permeabilität Geltung haben. Isoptin, das nach NAYLER & SZETO 1972 die membranlokalisierten Bindungsstellen für Ca^{++} besetzt, könnte dadurch vielleicht auch eine Veränderung der Membran im Sinne einer „Porenbildung“ bewirken. Durch die Dynamik der Membran während der Ausdehnung und Verkleinerung des Proto-

plasten in den verschiedenen Versuchsabschnitten würden in der K/Ca-Lösung und in der K/Ca-Isoptin-Mischlösung — im Austausch gegen Ca^{++} -Ionen — Isoptinmoleküle aus der Membran entfernt; die Zahl der „Isoptin-poren“ würde dadurch langsam wieder verringert. Tatsächlich sinkt auch die WP stufenweise mit jedem Versuchsabschnitt.

Bei der Erhöhung der WP durch Isoptin ist aber auch die Dauer der Vorwässerung zu beachten. Bei einer Vorwässerungsdauer von über 8 Stunden traten während der *ersten* Depl. bis auf das Doppelte der zu erwartenden Werte erhöhte $2K_{\text{WO}}$ -Werte auf. Das gilt sowohl für Isoptinversuche als auch für Kontrollversuche. In jedem Fall ergibt schon die darauffolgende Plasmolyse wieder „Normalwerte“. Worauf dieses Phänomen der erhöhten WP nach längerer Wässerung zurückzuführen ist, bleibt zu untersuchen.

Literatur

- ANDREOLI T. E., DENNIS K. W. & WEIGL A. M. 1969. The effect of amphotericin B on water and non electrolyte permeability of thin lipid films. — J. Gen. Physiol. 53: 133.
- BELZ G. & BENDER F. 1973. Therapie der Herzrhythmusstörungen mit Verapamil. — Fischer Verlag Stuttgart.
- BENTRUP F. W. 1979. I. Cell physiology. Cell electrophysiology and membrane transport. — Fortschr. Bot. 40: 84—98.
- BIEBL R. 1942. Die Wirkung von UV-Strahlen auf die Plasmapermeabilität. — Protoplasma 37: 1—24.
- BRAUNER, L. & HASMAN M. 1949. Über den Mechanismus der Heteroauxin-Wirkung auf die Wasseraufnahme von pflanzlichem Speichergewebe. — Bull. Fac. Med. Istanbul 12: 57—71.
- 1952. Weitere Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Heteroauxins bei der Wasseraufnahme von Pflanzenparenchymen. — Protoplasma 41: 302—326.
- CASARI K. 1953. Über den Plasmolytikumwechsel-Effekt. — Protoplasma 42: 427—447.
- FLECKENSTEIN A., TRITTHART H., FLECKENSTEIN B., HERBST A. & GRÜN G. 1969. Selektive Hemmung der Myocard-Contractilität durch kompetitive Ca^{++} -Antagonisten (Iproveratril, D600, Prenylamin). — Pflügers Arch. ges. Physiol. 307: 25.
- FLECKENSTEIN A. 1970. Pharmakologische Entlastung des Myocardstoffwechsels bei Koronarsklerose. — Therapiewoche 20: 321.
- FINEAN J. B., COLEMAN R. & MICHELL R. H. 1974. Membranes and their cellular functions. — Blackwell Scientific Publications, Oxford—London—Edinburgh—Melbourne.
- GÄUMANN E. & BACHMANN E. 1957. Über den Einfluß des Lycoparasmins und seiner Schwermetallkomplexe auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten. — Phytopath. Zeitschr. 29: 265—276.

- GERDENITSCH W. 1977. Studien über die Wirkung von Isoptin (Verapamil) auf Pflanzenzellen, insbesondere auf Membraneigenschaften und Wasserpermeabilität. — Diss. Univ. Wien, Formal- und naturwiss. Fakultät.
- & URL W. 1978. Kinematographische Studien zur Wasserpermeabilität von Tonoplasten. — *Protoplasma* 97: 31—45.
- GIBBS J. W. 1892: Thermodynamische Studien. — Leipzig
- GROSS W. 1975. Zur Wirkung makrozyklischer Verbindungen auf die Membranpermeabilität. In: Biologische Membranen (Hg. GROSS W., HÜLSEN W. & RING K.), S. 105—109. — Neue wiss. Bibliothek, Biologie, Verlag Kiepenheuer & Witsch, Köln.
- HAAN I. de 1933. Protoplasmaquellung und Wasserpermeabilität. — *Rec. Trav. bot. Néerland.* 30: 234—335.
- HARRISON R. & LUNT G. 1977. Biologische Membranen. — Fischer Verlag Stuttgart—New York.
- HÖFLER K. 1931. Plasmolyseverlauf und Wasserpermeabilität. — *Protoplasma* 12: 564—579.
- KNOLL AG. Ludwigshafen 1972. Isoptin, Ca^{++} -Antagonist. Koronartherapeutikum mit antiarrhythmischer Wirkung. — Broschüre aus dem Med. Wiss. Bereich, Stand vom Okt. 1972.
- LOEVEN W. A. 1951. Seasonal variations in the water permeability of *Allium* epidermal cells. I. — *Prov. Koninkl. Nederl. Acad. Wetenschap. Afd. Natuurk.* 58: 453—561.
- MÜLLER E. & RAMSHORN K. 1957. Untersuchungen über die Einwirkung von β -Indolyllessigsäure und Nikotin auf Saugkraft und Wasserpermeabilität plasmolysierter Zellen unter Verwendung einer neuen planimetrischen Methode. — *Flora* 154: 264—312.
- NAYLER W. G. & SZETO J. 1972. Effect of verapamil on contractility, oxygen utilisation and calcium exchangeability in mammalian heart muscle. — *Cardiovascular Research* 6: 120—128.
- PEDELISKI V. 1973. Some factors influencing the water permeability of *Allium cepa* bulb scale cells. — Ph. D. Diss. Univ. of Minnesota, Hort. Sci.
- & STADELMANN E. 1974. A more accurate calculation of the water permeability constant, K_{WO} , by analysis of the protoplast length ves: time diagram. — *Protoplasma* 82: 379—393.
- STADELMANN E. 1963. Vergleich und Umrechnung von Permeabilitätskonstanten für Wasser. — *Protoplasma* 57: 660—718.
- STRUGGER S. 1931. Zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Erythrosin. — *Ber. deutsch. bot. Ges.* 49: 453—476.
- 1949. Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. — Springer Verlag, Berlin.
- THOMSON J. J. 1890. Applications of the dynamic on physics and chemistry. (Zit. nach Abderhalden).
- TOTH A. 1949. Quantitative Untersuchungen über die Wirkung der UV-Be-strahlung auf die Plasmapermeabilität. — *Österr. bot. Z.* 96: 161—195.
- URL W. G. 1971. The site of penetration resistance to water in plant protoplasts. — *Protoplasma* 72: 427—447.

- VRIES H. DE 1871. Sur la permeabilité du protoplasme des betteraves rouges. — Opera e period. collata 1: 86—94. — Utrecht 1918.
- 1889. Über die Permeabilität der Protoplaste für Harnstoff. — Bot. Z. 47: 309—315.
- WERTH W. 1961. Vergleichende Untersuchungen über die relative Permeabilität des Protoplasmas für Alkohol und Wasser. — Protoplasma 53: 457—503.
- WILLETT D. J. von, 1972. Der Einfluß von Verapamil auf die nächtliche Malatakkumulation bei *Bryophyllum tubiflorum*. — Planta 107: 239—246.
- & KLUGE M. 1973. Studies on malate fluxes in leaf slices of *Bryophyllum daigremontianum*; verapamil-enhanced efflux out of the vacuole. — Plant science Letters 1: 391—397.
- 1977. Brief vom 20. 5. 77.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1980

Band/Volume: [20_3_4](#)

Autor(en)/Author(s): Gerdenitsch Waltraud

Artikel/Article: [Der Einfluß von Isoptin \(Verapamil\) auf die Wasserpermeabilität der Innenepidermiszellen von Allium cepa. 235-249](#)