

INTRANEURONALIS ANYAGTRANSPORT

H o m o r G é z a

Doktori értekezés

S Z E G E D

1978

B 153C



TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés	1. old.
1. Az intraneuronális anyagtranszport vizsgálatainak főbb eredményei napjainkig	1. "
2. Vizsgálataink irodalmi előzményei és célkitűzéseink ennek alapján	11. "
II. Vizsgálati módszerek és alkalmazásuk eredményei	15. "
1. Általánosan alkalmazott anyagok és módszerek	15. "
2. Intraneuronális kolin transzport	19. "
3. AChE transzport	22. "
4. DFP transzport	24. "
5. AChE reszintézi tanulmányozása DFP-s bénítás után	28. "
6. A neuronális anyagtranszport befolyásolása	32. "
III. Vizsgálataink eredményeinek értékelése	43. "
IV. Összefoglalás	52. "
V. Felhasznált irodalom	54. "



I. BEVEZETÉS

I/1. Az intraneuronális anyagtranszport vizsgálatok főbb eredményei napjainkig

A neuronok alkotórészei között lejátszódó anyagtranszport folyamatok rendszeres vizsgálatának alapjait P. WEISS és H.B. HISCOE /1948/ munkája szolgáltatta. Idegrostok növekedésének jellemzőit vizsgálva a következő, napjainkig érvényes megállapításokat tették:

- a növekedés a nukleáris régióból indul ki,
- az axoplazma állandó mozgásban van,
- a konvekció nem korlátozódik az aktív megnyúlás stádiumára, hanem folyamatos a kifejlett axonban is,
- a folytonos áramlás és növekedés -- döntő mértékben -- valószínűleg a citoplazmában szintetizálódó fehérjéken alapul.

Ezekhez a megállapításokhoz a szerzők egy olyan kísérleti technikája vezetett, amely a későbbiekben is ezen téma kutatásában az egyik általánosan használt és sok újat adó módszer maradt.

Lényege: a vizsgált ideg perifériás nyúlványát lekötötték oly módon, hogy a lekötés nem okozta az axon ronsolódását, de átmérőjét jelentős mértékben csökkentette.

A lekötésre perifériás idegszakasz eltávolítása után vizsgálták az elszorított zónán keresztül regenerálódó idegrost jellemzőit.

Ezek a következők:

- a lekötésre disztálisan állandósul a csökkent átmérő,
- a lekötésre proximálisan az axoplazma megduzzad,
- a duzzanat az axoplazma mozgásának gátoltságából ered,
- a duzzadás intenzitása növekszik az idővel,
- a proximális átmérő növekedés és a disztális csökkenés közvetlen összefüggésben van,
- a duzzanat nem okoz többlet deformációt a lekötéshez mérten,
- egynél több duzzanatot is létrejöhet, ez a lekötések számától függ,
- az ideg funkcionális képességét a lekötés nem nagyon befolyásolja,
- a regeneráció csak a nukleáris területről indulhat, a sejttesttől elválasztott axon idővel elhal.

Az indító közleményt követő 10-12 évben a morfológiai és biokémiai kutatások eredményeképpen az axoplazmatikus komponensek -- főleg a proteinek -- szomális eredetének koncepciója általánosan elfogadottá vált. Ezt támasztotta alá, hogy az axonban nem demonstrálhatók a Nissl-anyagok, vagyis az ultrastrukturálisan nekik megfelelő fehérjeszintetizáló ribonukleoproteid granulák, így az axonális proteinek szintézis helye a sejttest és onnan áramlanak disztálisan az axonba.

A következő lépést a 60-as években kiszélesedő vizsgálatok jelentették. A központi és perifériás idegrendszer különböző komponenseinek tanulmányozása eredményeként az axoplazma mind több alkotójáról bizonyosodott be, hogy állandó mozgásban van.

A teljesség igénye nélkül:

- a legfontosabb axonális enzimekről /HEBB és SILVER, 1962; ROESSMANN és FRIEDE, 1965; TAYLOR és WEISS, 1965; GRAFSTEIN, 1967; PETTERSON és mts., 1967; KARLSON és SJÖSTRAN, 1968; KÁSA, 1968; BARONDES, 1968; LIVETT, GEFFEN és AUSTIN, 1968; GRAFSTEIN, 1971; és a későbbi években sokan mások/
- kis molekula súlyú anyagokról:
 - acetilkolin /ACh/ /EVANS és SAUNDERS, 1967/
 - szero-tonin /RAHMAN, 1971/
 - noradrenalin /LIVETT, GEFFEN és AUSTIN, 1968/
- mitokondriumokról /WEISS és PILLAI, 1965/
- szinaptikus vezikulákról /BARONDES, 1968/ és granuláris szinaptikus vezikulákról /LIVETT és mts., 1968/.

A fent említett eredményekkel egyidőben mind világosabbá vált, hogy az axonális anyagmozgás sebessége széles variabilitást mutat a különböző idegrostokban /TAYLOR és WEISS, 1965/ és specieszekben. Jelzett anyagok -- főként ^3H - és ^{14}C -es aminosavak -- idegsejtekbe juttatása és fehérjékbe épülésük utáni mozgásuk követése lehetőséget teremtett a transzport sebességének /mm/nap vagy mm/h/ meghatározására. A különböző sebességi értékek meghatározása mellett közös tulajdonsága ezen eredményeknek, hogy a legtöbb kutató legalább két sebességi komponensre osztotta a transzportot. Leírták egy lassú komponenst /2-10 mm/nap/ és egy gyors frakciót /100-500 mm/nap/. Egyes szerzők e két általánosan közölt komponens között egy harmadik, közepes sebességű /30-40 mm/nap/ transzport frakciót is jeleznek /MIANI, 1964/.

ROESSMAN és FRIEDE /1965/ szerint az ideg átmetszését követően a csomókban az axoplazma újra-megoszlása indul meg, de folyamatos duzzadás csak a proximális oldalon történik. Ez az eredmény már a kétirányú áramlás jelenlétére utal.

A transzport kutatások kezdetétől törekvést látunk arra, hogy az axonális áramlás létrehozóját és mechanizmusát magyarázzák. Első megközelítésként, a lekötésnél keletkező duzzanat és a jelzett anyagok hullámszerű előrehaladásából /WEISS és PILLAI, 1965/ arra következtettek, hogy a sejttest szintetizálta anyagok koncentráció gradiens mentén, passzív áramlással haladnak a terminálisok felé. Ennek sebessége 1-3 mm/nap /TAYLOR és WEISS, 1965/ EVANS és SAUNDERS /1967/ az ACh mozgását követve, azt 1-1,5 mm/nap-nak találták, amit az axon regeneráció sebességének tekintettek és a transzportot ennek megjelenési formájaként.

HEBB és SILVER /1965/ megerősítik a protein centrifugális mozgásának /ChAc/ hipotézisét, de szerintük ez a mozgás nem egyenlő az áramlással. Ugy tekintik, hogy a kolinacetyláz-enzim hozzá van kapcsolódva az axon membránrendszeréhez, de mozgása független mind az őt hordozó membránok, mind az egész axon növekedésétől.

Néhány anyagra nézve határozott proximo-distalis koncentráció gradienst írnak le /LUBINSKA és mts., 1963; SINGER és SALPETER, 1966/, de PETERSON és mts./1967/ kísérlete jelzi,

hogy a protein mozgást nem okozza koncentráció különbség, mivel a fehérje szintézis gátlása /cycloheximid/ a gradiens fennmaradása mellett gátolja a transzportot.

A gyorsan mozgó komponens pontos elkülönítése a lassútól /GRAFSTEIN 1967; KARLSON és SJÖSTRAND, 1968/ a két transzport komponens mozgásmechanizmusának különbözőségét sejteti.

KÁSA /1968/ elektronmikroszkópos hisztokémiával kapott eredményei arra utalnak, hogy a transzportban a Golgy-rendszer és a tubulusok, valamint az oldható axoplazmatikus anyag vehet részt. A tubulus rendszer lehet felelős az anyagok gyors transzportjáért, az oldható plazma a lassúért.

A neuronális filamentum- és tubulus rendszerek kapcsolatba hozása a transzport folyamattal újabb lépés volt a transzport mechanizmus megismerése felé.

KIRKPATRICK /1969/ közlése szerint a mikrotubulusok az idegrendszerben más szövetekhez hasonló filament struktúrával rendelkeznek és relatív koncentrációjuk meghatározható. MARX /1973/ összefoglaló munkájának megállapításai szerint minden maggal rendelkező sejt tartalmaz -- legalább élete egy részében -- mikrotubulusokat. WEISENBERG vizsgálataira támaszkodva megállapítja, hogy a mikrotubulusok polimerek, tubulinnak nevezett alegységekből állnak. A polimer csak Ca^{++} -mentes közegben stabil. A polimerizációhoz Mg^{++} és ATP vagy GTP szükséges. A tubulin ilyen feltételek között protofilamentumokba rendeződik és 13 ilyen alkot egy tubulust. A csillók és ostorok mozgását feltehetően a bennük lévő mikrotubulusok egymás feletti elcsuszása eredményezi.

Ehhez ATP energiájára van szükség, melyet a tubulusokhoz kapcsolódó ATP-áz hatású fehérje biztosít /a dyenin/.

Feltételezi, hogy a mitózis, a sejtmozgás és az axonális transzport hasonló folyamatok, melyben a mikrotubulusok vesznek részt.

BORISY és TAYLOR /1967/ egy ismert mitótikus inhibitor, a kolchicin /colchicin/ hatásmechanizmusát vizsgálva, annak a mikrotubulusokra kifejtett hatását közli. A kolchicin bekötődve a tubulin alegységekbe, megakadályozza polimerizációjukat.

Ezek az eredmények ráirányították az axonális transzport kutatók figyelmét a neuronok fibrilláris fehérjeire.

SHELANSKI /1973/ biokémiai vizsgálatok alapján megadja legfontosabb jellemzőiket. Szerinte a

neurofilamentumoknak két típusa van:

1. - 80-90 Å⁰ átmérőjű strukturák
 - mitótikus inhibitorok hatására számuk emelkedik
 - alegységük a filarin, 80 000 M-u acidikus fehérje, mely nem rendelkezik nukleotid, vagy kolchicin kötőképességgel,
2. - 50-60 Å⁰ átmérőjű struktúra
 - a sejtmembrán alatt helyezkedik el
 - alkotói aktinhoz és myozinhoz hasonló proteinek.

Mikrotubulusok:

- 240 Å⁰-ös strukturák
- alegységük a tubulin, egy dimer, 2 db 55 000 M proteiből áll, nukleotid és kolchicin kötőképességük van,
- alegységükkel dinamikus egyensúlyban állanak
- összeállításukhoz Ca^{++} -hiány és ATP vagy GTP szükséges,

- az alegység --- tubulin equilibriumot szabályozni lehet a Ca^{++} mennyiségével,
- hatással van rá az inzulin és ciklikus AMP
- protofilament struktúrákból áll.

Ezekkel a megállapításokkal jó összhangban van OCHS és HALLINGSWORTH /1971/ közlése, mely szerint a gyors axoplazmatikus transzport közvetlen összefüggésben van a sejt oxidatív mechanizmusaival. Asphixia, cianid vagy dinitrophenol gyorsan blokkolja a gyors transzportot.

OCHS /1974/ kimutatja, hogy az idegsejt anyagcseréje az ingerlékenység fenntartása szempontjából fontos ionpumpa mechanizmusa fenntartása mellett az axoplazmatikus transzport energia szükségletét is biztosítja. Az oxidatív mechanizmus gátlása hasonlóan hat a transzportra, mint az ingerület vezeteésére. Ha a $\sim\text{P}$ -szint a felére esik, gátlódik a gyors transzport. Az ATP egy kritikus szintje szükséges a transzport fenntartásához.

javaslatot tesz a transzport modelljére, mely szerint az anyagok heterogén összetételű csoportját egy transzportáló filament hordozza az idegrostban a mikrotubulusok és/vagy a neurofilamentumok mentén kereszthidak segítségével. A kereszthid rendszer részeként egy Mg^{++} - Ca^{++} függő ATP-áz van jelen az idegben, amely az ATP energiáját biztosítja a transzporthoz.

A mitotikus inhibitorok /colchicin, vimblastin, vincristin/ tubuláris rendszerre hatásának tisztázása és a tubulusok kapcsolatba hozása a transzport folyamatokkal, az ilyen irányú vizsgálatok nagy tömegét indította meg mind a gyors, mind a lassú transzport komponenssel szállítódó anya-

gokra nézve. Ezek a drogok lehetőséget adnak a transzport tanulmányozására a neuron mechanikai sértése nélkül. Kialakítható az axonális anyagmozgás gátlása a protein szintézist még nem sértő, kis mértékű morfológiai változást okozó kolchicin koncentrációval /KARLSSON és mts.,1971/. Kolchicin hatására a szinaptikus végződésekben reverzibilis ultrastrukturális változások jönnek létre:

- a szinaptikus vezikulák megnagyobbodásának késése,
- fibrilláris proliferáció,
- depresszált szinaptikus transzmisszió.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a transzportálódó anyagok hozzáépülnek a szinaptikus strukturákhoz és a gyors áramlás nélkülözhetetlen lehet a transzszinaptikus transzmisszióhoz /CUENOD és mts.,1972/.

Axotómia és kolchicin kezelés megegyező eredményű a szinaptikus átvitelre, de a drog nincs közvetlen hatással a transzmisszióra és az idegingerület vezetése is normális alkalmazása után /PILAR és LAUDMESSER,1972; HOFMAN és mts., 1973/.

A kolchicin okozta denervációs tünetek növekvő extrajunkcionális ACH érzékenységben és a nyugalmi potenciál esésében nyilvánulnak meg, néhány nappal a kezelés után.

Ez azt jelenti, hogy denervációs tüneteket lehet létrehozni normális izom aktivitás jelenlétében /LMO,1974;

FERNENDEZ és REMIREZ,1974/.

A mioneuronális junkció morphogenezisének időszakában alkalmazott kezelés hetekre meggátolja a posztzinaptikus izom-membrán fejlődését, ezután a morphogenezis normálisan

folytatódik. Ugyanekkor neurotubulusok is megjelennek az axoplazmában. Valószínűnek látszik, hogy a neurotrophikus behatás eredményezi a posztzinaptikus izommembránok kifejlődését egy szecernált terméken keresztül, amely a tubulus rendszer közvetítésével szállítódik az idegvégződésbe. /JUNTUNEN,1973/.

Már a transzport vizsgálatok korai szakaszában történtek utalások arra, hogy az anyagáramlások nemcsak proximo-disztalis, de a perifériáról a sejttest felé is történnek /KERKUT és mts.,1967; ROESSMAN és FRIEDE,1965/.

A retrográd transzport kutatás eredményességének döntő lökést adott egy jól kimutatható tesztanyag, a torma peroxidáz /HRP/ alkalmazása. Csirke optikus techtumába juttatott HRP transzportálódott a retina sejtjeibe. Intraokulárisan alkalmazva az afferens axonok mentén centripetálisan haladva koncentrálnak a nucleus opticusban. A protein retrográd mozgása a terminálisokból a sejttestbe egy visszajelző mechanizmusra utal /LaVAIL és LaVAIL,1972/.

EDSTRÖM és HANSON /1973/ szerint a retrográd transzport 60 mm/nap sebességű és tömegében kisebb, mint az anterográd. A disto-proximális transzport cianid, dinitrophenol és mitotikus inhibitor érzékenysége arra utal, hogy lefolyása függ az intakt tubuláris rendszer jelenlététől. Ezek az adatok azt jelzik, hogy az anterográd és retrográd transzport strukturális alapja megegyezik /EDSTRÖM és HANSON,1973; BUNT és mts.,1974; LaVAIL és LaVAIL,1974; STOECKEN és mts.,1975;1975; ERDMANN és mts.,1975/.

KRISTENSON és OLSSON /1975/ egér, patkány és nyúl ülő-idegének átvágásához aplikált HRP nyomonkövetésével azt találták, hogy a spinalis ganglion sejtek korai változásaként fellépő kromatolízis a HRP megjelenésével egy időben történik. Lehetségesnek tartják a két jelenség kapcsolatát.

Mind a motoros, mind a szenzoros rostok felveszik a perifériáról a tetanusz toxint és nagy szelektivitással az NGF /nerve growth factor/-et és transzportálják a sejtekbe. Axotomia vagy kolchicin kezelés meggátolja ezt a transzportot /ERDMANN és mts., 1975; STOECKEL és mts., 1975/. A retrográd transzport a specifikus felvétel által determinált és maga a transzport már nem specifikus /STOECKEL és mts., 1975/.

Az előzőekben felvázolt problémakörök jelentik napjaink transzport kutatási feladatait is. Ezek:

- az intraneuronális transzport folyamatok pontos megismerése,
- a központi és a perifériás idegrendszer különböző területein lezajló transzport folyamatok kvalitásainak felderítése,
- az egyes rendszerekben --, a rájuk jellemző működésben -- döntő szerepet játszó anyagok /enzimek, transzmitterek, stb./ migrációjának pontosítása,
- a transzport folyamat felhasználása morfológiai vizsgálatokban,
- az intraneuronális transzport folyamatok befolyásolási lehetőségeinek keresése mind pozitív, mind negatív regulációra vonatkozóan,
- a regulációs lehetőségek gyakorlatban való alkalmazhatóságának vizsgálata, különös tekintettel azok gyógyászati, fejlődési, valamint regenerációs aspektusaira.

I/2. Vizsgálataink irodalmi előzményei és célkitűzéseink
ennek alapján

a. A kolínerg rendszer komponenseinek axonális transzportja

A központi és perifériás idegrendszer számos neuronféléségében az axoplazmatikus elemek sejttestből periféria felé való transzportja az irodalomban jól kimunkált /LUBINSKA,1964/.

Az is ismeretes -- radioaktív anyagokkal végzett vizsgálatok alapján -- hogy az axoplazma különböző elemei egymástól eltérő sebességgel mozognak a perifériás idegekben /LIVETT, GEFEN és AUSTIN,1968; SJÖSTRAND,1969;1970; FRIZELL és SJÖSTRAND,1974/.

A kolínerg rendszer enzimei is különbözőnek látszó mechanizmussal és eltérő sebességgel transzportálódnak az idegsejtekben /KÁSA és mts.,1973/.

Míg az acetilkolinészteráz /AChE: EC 3.1.1.7/ bidirekcionális és a ChAc proximo-disztális irányban történő mozgása jól demonstrált /LUBINSKA és mts.,1963;1964; HEBB és SILVER, 1965; NIEMIERKO és LUBINSKA,1967; KÁSA,1968; FRIZELL és mts.,1970; DAHLSTRÖM,1971; CARLSSON és mts.,1971; PARTLOW és mts.,1972; FONNUM és mts.,1973; HEILBRONN és PETERSON, 1973; FRIZELL és SJÖSTRAND,1974; KREUTZBERG és TÓTH,1974; TUCEK,1974; FONNUM és mts.,1976/ addig kevés adat áll rendelkezésünkre a kolínerg rendszer további komponensének a kolinnak ill. az ACh-nak intraaxonális transzportjára vonatkozóan.

A kolín extracellularis térből történő felvételének két komponensét írják le.

Egy magas affinitásút, melynek hatása a szinaptoszomál frakcióban jelentkezik /YAMAMURA,1973/. Ez -- a terminálisoknál hatófelvevő rendszer -- érzékeny az anyagcsere változásokra, erős inhibitora az ACh és a hemikolinium-3. Ennek alapján ezt a rendszert kapcsolatba hozzák az ACh-szintézisével. Az ACh-szintézis gátlója inhibitora a kolin felvételnek is /YAMAMURA és SNYDER,1972; YAMAMURA,1973; MASSARELLI és mts.,1974; SUSZKIW és PILAR,1976; SUSZKIW és mts., 1976/. Számos neuron sejttestje nem rendelkezik ezzel a magas affinitású felvevő rendszerrel /SUSZKIW és PILAR,1976/.

Az alacsony affinitású kolin felvétel kevésbé specifikus funkciójú. Főleg a sejttestre lokalizálódik. Kevésbé függ a metabolikus energiától és nincs hatással rá a Na^+ , K^+ koncentráció változás. Hemikolinium-3 azonban gátolja ezt a komponenst is /YAMAMURA,1973; MASSARELLI és mts.,1974; SUSZKIW és mts.,1976; 1976/.

Intracellularisan gerincvelői motoneuronokba juttatott ^3H -kolin nagy része a sejt szomájában található, ahonnan transzportálódik az axonba és a dendritekbe /KREUTZBERG és SCHUBERT,1973;1975/.

Az ACh-transzport kimutatására is történtek kísérletek. HAGENDAL és mts.,/1973/ feltételezik, hogy nagy része a lassú, kisebb hányada a gyors axonális transzporttal mozog együtt. Lézió mindkét oldalán történő akkumulációja a kétirányú áramlás jelenlétére utal./HEILBRONN és PETERSON,1973; DAHLSTRÖM és mts.,1974; HEIWALL és mts., 1976/..

Vizsgálataink egyik célkitűzése volt megvizsgálni, hogy a kolin az extracellularis térből -- a sejtestetnél -- történő felvétele után intraaxonálisan hogyan transzportálódik és ez a transzport befolyásolható-e.

b. Az axonális AChE eredete és reszintézise a neuronokban

Nagy számú korábbi közlés szerint az AChE az idegrendszer számos neuronjában a perikarionban szintetizálódik és onnan axoplazmatikus transzport révén jut el a terminálisokba /LUBINSKA,1964; KÁSA,1968; FONNUM és mts., 1973; FRIZELL és SJÖSTRAND,1974/.

Más szerzők szerint az AChE helyi szintézise is lehetséges az axonokban és idegvégződésekben /KOENIG és KOELLE,1960;1961; CLOUET és WAELSCH,1961; KOENIG,1965; SRINIVASAN és mts.,1976/. Említett szerzők abból indulnak ki, hogy a fehérjeszintézishez szükséges ribonukleinsav jelen van hal Mauthner neuronjainak óriás axonjaiban /EDSTRÖM és mts.,1962; EDSTRÖM,1964/ és kifejezett macska motoros axonjaiban is /KOENIG,1965/. A helyi szintézis kimutatásához az enzim-tartalmat egy erős AChE-inhibitorral, a di-izopropil-fluorofoszfáttal /DFP/ eliminálták és vizsgálták az enzim reszintézis helyét.

Hasonló módszerrel -- más rendszerben -- AUSTIN és JAMES /1970/, WELSCH és DETTBARN /1972/, CHIPPENDALE és mts. /1974/, valamint SOMOGYI és CHUBB /1976/ nem talált bizonyítékot az AChE-lokális szintézisére.

DAVIS és AGRANOFF /1968/, valamint WELSCH és DETTBARN /1972/ szerint a DFP enzim-bénító hatása irreverzibilis, nincs bizonyíték az AChE szignifikáns reaktivációjára. Ez azt jelenti, hogy az enzimaktivitás visszatérése a reszintézisnek tulajdonítható.

Kísérleteink célja volt megvizsgálni, hogy patkány spinalis ganglionjába juttatott DFP, ganglion sejtekbe történő inkorporációja után, milyen struktúrákban lokalizálható, ill. a gátló hatás megszűnését követően hol mutatható ki először a reszintézis termelte AChE.

c. A neuronális anyagtranszport regulációja

A neuronális axoplazmatikus transzportra e kolchicin gátlólag hat /WILSON, 1975/. Ebben a kérdésben a kutatók véleménye gyszéges. A gátló hatás a mikrotubuláris proteinekhez történő kötődés révén jön létre /BORYSY és TAYLOR, 1967; SJÖSTRAND és mts., 1970/.

A gátlás hatásosságát azonban -- a vizsgált rendszertől, a drog alkalmazásának helyétől és koncentrációjától függően -- különbözően értékelik.

A sejttestnél alkalmazott kolchicin a transzport lassú fázisát gátolja JAMES /1970/, MCGREGOR /1973/ és FRIZELL /1975/ szerint, KARLSON /1971/ szerint a gyorsat.

Ugyanílyen alkalmazásban mindkét fázist gátolja HÖHFELT és DAHLSTRÖM /1971/, valamint FONNUM és mts., /1973/ szerint.

A periférián történő alkalmazásának hatásosságáról is eltérőek a vélemények. A perifériás, lokális kolchicin ke-

zelés transzportra gyakorolt hatását a neuronok nyúlványán a lekötéshez hasonló duzzanat létrejötte jelzi /HÖHFELT és DAHLSTRÖM,1971; NOOTEN és COYLE,1973; FERNANDEZ és REMIREZ,1974; DAHLSTRÖM és mts.,1975; FRIZELL és mts., 1975; AMBRON és mts.,1975; DZIEGIELEWSKA és mts.,1976/. Patkány n. ischiadicusában teljesen gátolja mindkét transzport komponenst /NOOTEN és COYLE,1973/. Nyúl n. vagusában megállítja a jelzett anyag lassú transzportját /FRIZELL, MCLEAN és SJÖSTRAND,1976/.

A jelzett kolchicin a bejuttatás helyén marad /GRAFSTEIN és mts.,1970; FRIZELL és mts.,1975/, ill. gátlás alatti dózis esetén a lassú fázissal transzportálódik /GRAFSTEIN és mts.,1970/.

Ezirányú vizsgálataink célkitűzése volt -- a kolin és az AChE transzportjának felhasználásával -- kísérletet tenni a kolchicin hatásosságának tisztázására. Megvizsgálni, van-e különbség a drog szomális és perifériás hatása között.

II. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS ALKALMAZÁSUK EREDMÉNYEI

1. Kísérleteinkben általánosan alkalmazott anyagok és módszerek

A vizsgálatokat 250-300 g súlyú CFY-os him patkányokon végeztük, melyeket a SZOTE Kisállattenyésztő Telepéről szereztük be. Vizsgálati objektumként ezen állatok gerincvelő --- lumbális 5-ös /L₅/ ill. 6-os /L₆/ spinalis ganglion --- n. ischiadicus rendszere szolgált.

Ezt a rendszert -- az ideg sejttestjének és perifériás nyúlványának viszonylatában lejátszódó -- intraneuronális anyagtranszport vizsgálati modellként alkalmaztuk /1. ábra/.

Altatott állatokon /4 mg/kg Nembutal, Abbott Ltd./ feltártuk az L₅ ill. L₆-os spinális gangliont /ggl./ és intraganglionárisan /bizonyos esetekben a gerincvelői lumbális intumescencia területére subdurálisan/ juttattuk be a tesztanyagokat /TORNÝOS, 1972/. A bejuttatás helyi és mennyiségi pontosságát egy Hamilton fecskendőre applikálva, sztereotaxiás készülékre szerelt, kihúzott üvegkapilláris biztosította. A kapillárist súlyméréssel kalibráltuk, ezáltal 0,5 µl oldat pontos bejuttatására is alkalmassá vált. Az anyagbevitel sebessége egységesen 1 µl/1 perc volt, ami kiküszöbölte az egy lépésben történő bejuttatás okozta strukturális változásokat.

A vizsgálatok nagy részénél -- a fent leírt procedura mellett -- feltártuk a n. ischiadicust és a ggl.-tól átlagosan 40 mm-re /a musculus piriformis felett/ az idegköteg folytonosságát lekötéssel vagy átvágással megszüntettük.

/Az axonális transzport szempontjából az ideg lekötése, átvágása vagy elroncsolása megegyező hatású TUCEK /1974/ és DAHLSTRÖM /1974/ szerint/.

A továbbiakban, a vizsgálat megkívánta idő elteltével, a rendszer felhasználására kerülő szakaszait -- az állat dekapitálása után -- kipreparáltuk és a vizsgálat jelle-
gének megfelelően feldolgoztuk.

II/1/a. Radiokémiai vizsgálat

A fentiek szerint kipreparált idegszakaszokat 5 mm-es darabokra vágtuk. A szegmenseket 0,2%-os Triton X-100-ban /Serva/ homogenizáltuk és 15 ml Unisol-I-ben /Koch-Light/ mértük az egy perc alatti beütés számot /CPM/ Packard TriCarb liquid scintillációs spektrométerrel Modell 3375/.

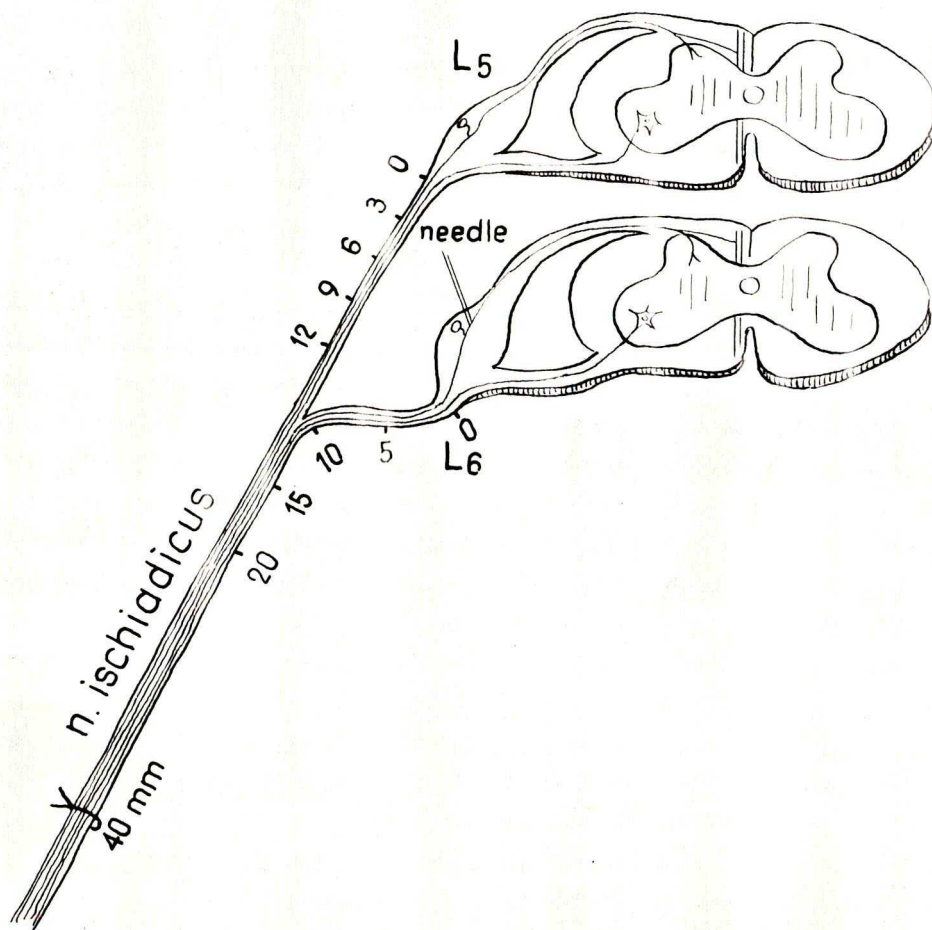
Kontrollként ugyanazon állat ellenoldali idegének 2x5 mm-e szolgált, melynek aktivitás értékeit 5 mm-re számolva a vizsgált oldal adataiból levontuk.

II/1/b. Biokémiai módszer

A II/1. szerint kivett idegszakaszt -- adott hosszúságú-
ra történő darabolás után -- mikromanipulációs boxban 0°C-on, a perineuriumtól megtisztítottuk, majd lemértük. Hűtve, állandó idő és fordulatszám mellett, teflon homo-
genizálóban, fiziológias sucrose-val /Koch-Light/ 10 mg/ml-es homogenizátumot készítettünk.

Ebből mértük az AChE-aktivitást ELLMAN és mts./1961/ mód-
szere szerint 412 μ m-nál, 25°C-on, 5 percig. Szubsztrátként
acethyltiocholiniodidot /ATChJ, Sigma/ használtunk.





1. ábra : A vizsgált rendszer sémás rajza

Kontrollként kezeletlen idegszakaszok enzimaktivitása szolgált. Az AChE-aktivitást $E \times 126 \mu\text{mol/g/óra}$ hidrolizált ACTHJ értékben adtuk meg.

II/1/c. Autoradiográfiás módszer

Az I/1. szerint kivett -- jelzett anyagot tartalmazó -- vizsgálni kívánt szakaszokat 6%-os formalinban fixáltuk /12 óra/, majd fagyasztómikrotommal 25 μ -os metszeteket készítettünk. A metszeteket Ilford-L4 emulzióval fedtük és 17 napig inkubáltuk. Az előhívást Kodak-D19-el végeztük, a fixálás Kodak-F5-tel történt.

Kontrollként kezeletlen állatok megfelelő idegszakaszait használtuk.

II/1/d. Hisztokémiai módszer

Az I/1/c. szerint készült metszetekben az AChE-aktivitás hisztokémiai demonstrálása a Cooper-Lead-Tiocholine technikával történt /KÁSA és CSILLIK, 1966/.

Kontrollként kezeletlen állatokból vett mintákat alkalmaztunk.

II/2. Intraneuronális kolin transzport

- a./ A vizsgálatot a II/1/a. szerint végeztük. A feltárt L_6 -os ggl-ba 1 μ l /methyl- ^{14}C / klorinkloridot, 59 mCi/mmol, Amersham/ adtunk be. Az L_6 -os ggl. és a hozzátartozó n. ischiadicus kivétele 12, 24 és 48 órával a klorinklorid beadása után történt.
- b./ Egy vizsgálati sorozatban a ^{14}C -kolin bejuttatásával egy időben átvágtuk a n. ischiadicust. A feldolgozás 1, 4, 12, 24 és 48 órával az átvágás után történt.

Mivel a kolin nem szintetizálódik az idegrendszerben, felvétele alapvető fontosságú a neuronok számára /MASSARELLI és mts., 1974/. Magas affinitású felvételét főleg a terminálisokon vizsgálták

de közlik szomális felvételét is

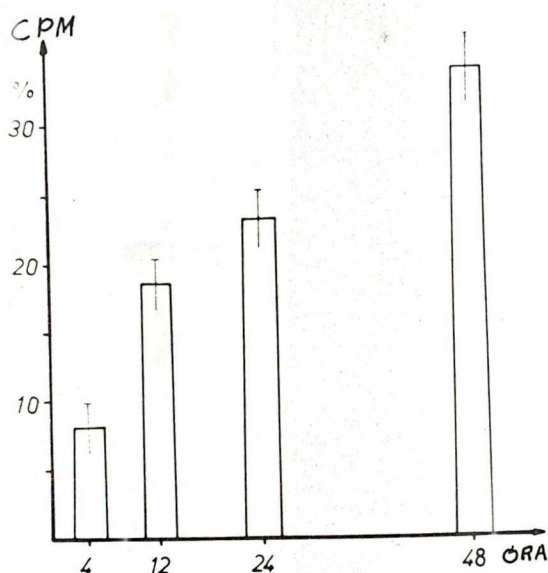
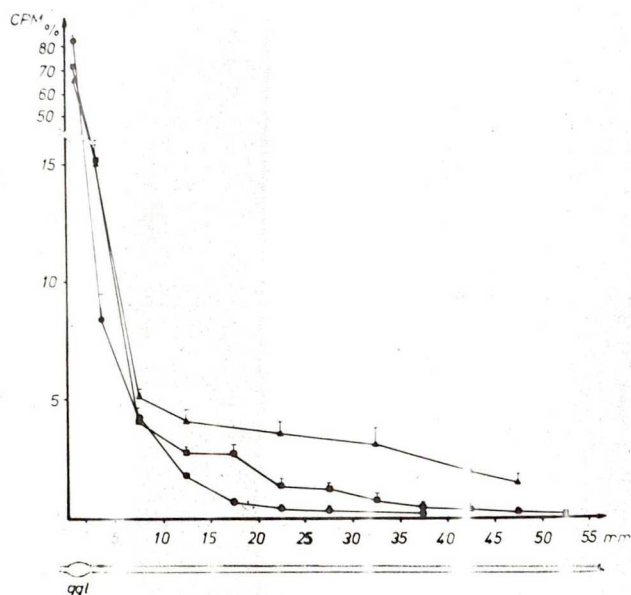
Kísérleti eredményeink szerint a spinalis ggl. neuronjai felveszik az extracellularisan bevitt kolin és 48 órával a kezelés után még viszonylag magas jelzettségük van /2. ábra/.

KREUTZBERG és SCHUBERT /1973; 1975/ szerint gerincvelői motoneuronokba juttatott 3H -kolin transzportálódik az axonba és a dendritekbe. A transzport lefolyásáról és viszonyairól azonban nem közölnek adatokat.

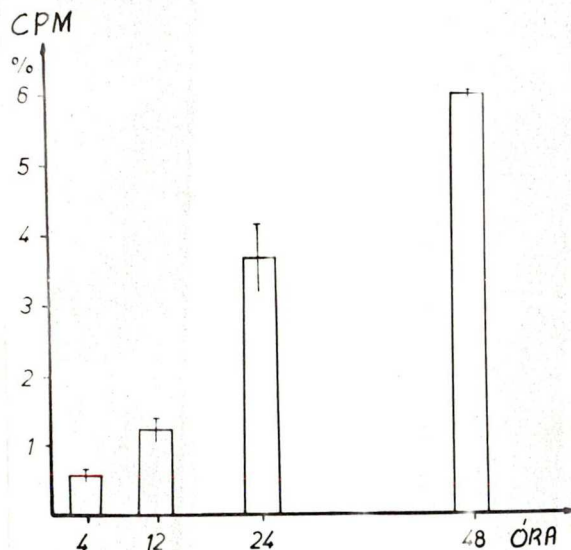
Méréseink szerint a felvett kolin a perikarionból különböző sebességű komponensekkel transzportálódik a terminálisok felé. A transzportban résztvevő jelzett anyag mennyisége az idő függvényében növekszik, 4 óra után 8%, 24 óra után 23%, 48 óránál közel 40% és ennek arányában fogy a ggl-ban /2. és 3. ábra/.

2. ábra: ^{14}C -kolin intra-neuronális transzportja patkány n. ischia - dicusában, 12 / / , 24 / / és 48 / / órával a jelzett anyag adása után. N = 4

A szórás /S/ feltüntetve.



3. ábra : ^{14}C -kolin intra-axonális transzportja. Abs.: a kolin beadástól számított idő. Ord.: a transzportált rádióaktivitás/cps/a rendszer aktivitásának %-ában. N=4, S-feltüntetve



4. ábra: ^{14}C -kolin intraaxonális transzportja. Abs.: az ideg átmetszésétől mért idő Ord. : az átmetszésre proximális 5 mm aktivitása a rendszer aktivitásának %-ában N = 5 , S-feltüntetve

A transzport folyamat sebességére a ggl-től 40 mm-re elhelyezett, átmetszésre proximális 5 mm-es idegszakasznak az idő függvényében emelkedő aktivitása szolgálhat adatot.

Már 4 óra elteltével százalékosan kicsi, de megbízhatóan mérhető akkumuláció jelentkezik 40 mm-re a ggl-től. Ez arra enged következtetni, hogy a jelzett anyag egy bizonyos hányada az axoplazmatikus transzport gyors komponenséhez kapcsolódik /4.ábra/. A távolság és időviszonyok figyelembevételével ennek a komponensnek a sebessége több mint 240 mm/nap.

A 12,24 és 48 órás minták eredményét tükröző görbék lefutását elemezve /2.ábra/ a szállítási sebesség és anyagmenyiség szempontjából, további két transzport komponens elkülönítésére van lehetőség. A gyors komponens követő fázissal migrálódó radioaktivitás 12 óránál a 4.-, 24 óránál a 8,5 mm-ben, 48 óránál pedig az egész vizsgált szakaszban jelen van. Erre utal a 24 óránál ugrásszerűen megemelkedő akkumuláció is /4.ábra/. Ezekből az adatokból kalkulálva, ennek a fázisnak a sebessége 40-50 mm/nap.

A transzportban résztvevő radioaktivitás döntő többsége a fenti két komponensnél lényegesen lassabban szállítódik, létrehozva a harmadik transzport komponenset. Ennek sebessége nem több mint 2-3 mm/nap /2.ábra/.

II/3. AChE - transzport

A vizsgálat első lépéseként a II/1/b. szerint mértük a kezeletlen állatok L_6 ggl-jában és a n. ischiadicus első 40 mm-ben az AChE-aktivitást 5 mm-ként. A m. pyriformis felett három egymásra következő 2 mm aktivitását is meghatároztuk. Ezeket a szegmenseket a proximális végtől számolva P_1 , P_2 , P_3 -mal jelöltük.

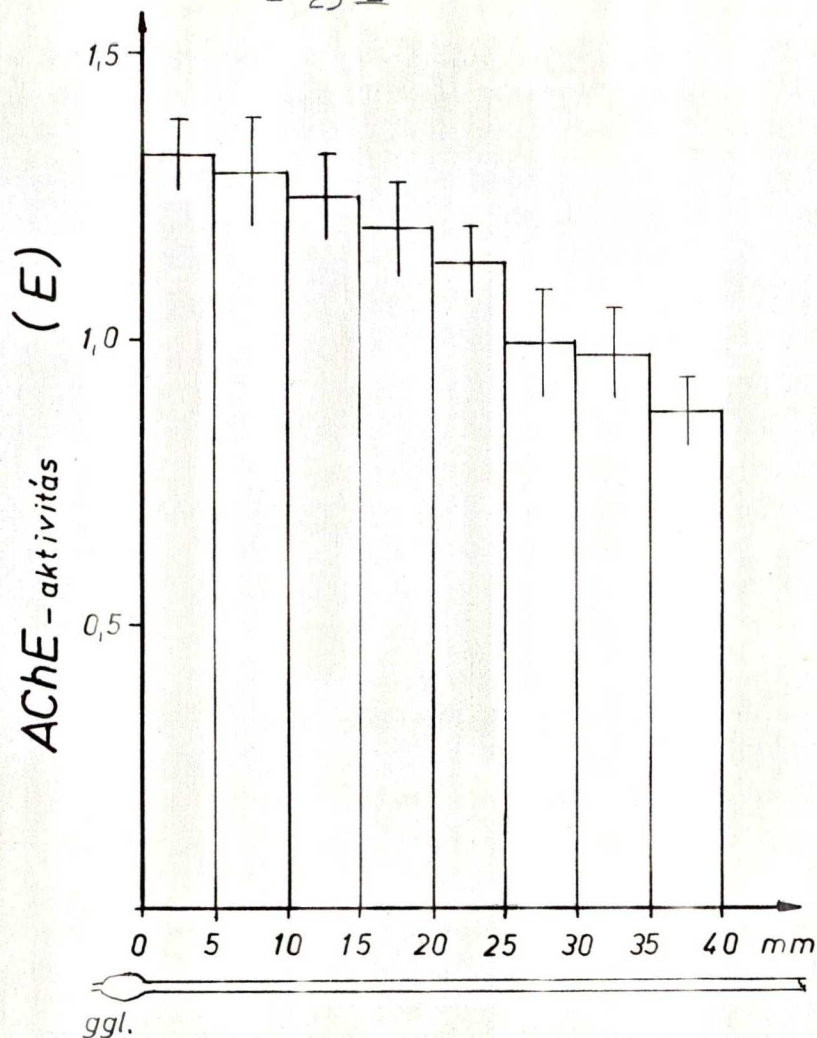
Az így kapott eredmények adják a későbbi vizsgálatokhoz a fiziológiás normál értékeket és mint kontroll szerepelnek a továbbiakban.

A következő lépésben a m. pyriformis felett lekötöttük a n. ischiadicust és 4 órával a lekötés után vettük ki a P_1 , P_2 és P_3 -as szakaszokat.

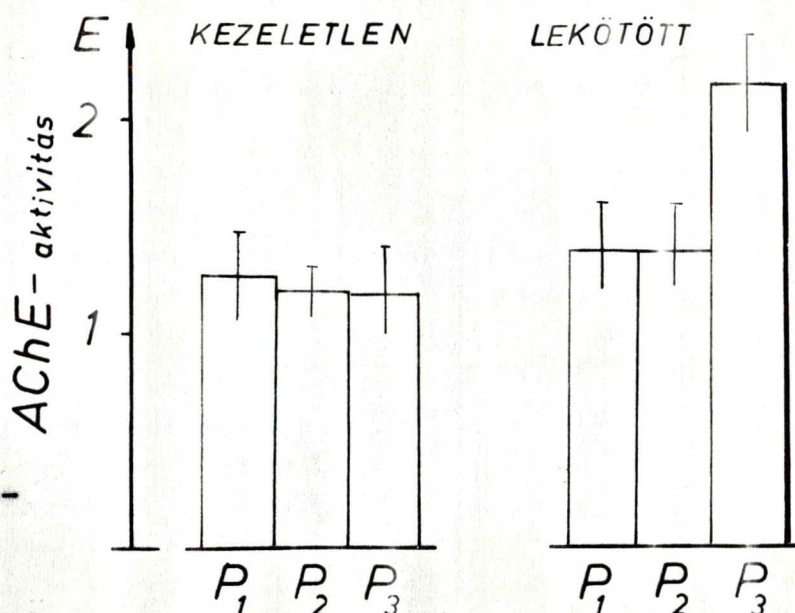
A 40 mm-es idegszakasz vizsgálatának eredménye azt mutatja, hogy az idegtörzs mentén az AChE-aktivitás disztális irányban csökken /5.ábra/. Fiziológiás körülmények között jelen van tehát egy proximo-disztális aktivitás gradiens.

Az idegköteg folytonosságának megszüntetése, már 4 órás időtartam alatt az aktivitás gradiens átrendeződését okozza /6.ábra/. A lekötésre proximális idegszakaszok AChE aktivitása jelentősen megemelkedik. Legkifejezettebben ez az akkumuláció a lekötést közvetlenül megelőző P_3 -as szakaszban. Itt az aktivitás emelkedés átlagosan 80%-os.

Bár ez a kísérleti módszer nem ad módot az AChE transzport sebességi viszonyainak számítására, de lehetőséget teremt annak megállapítására, hogy



5. ábra : Az AChE-aktivitás változása a n. ischiadicus idegtörzs mentén. $n = 7$, A szórás/S/ feltüntetve minden értéknél. AChE-aktivitás : $E \times 126 \text{ umol/g/h}$ hidrolizált ATChJ.



6. ábra : A n. ischiadicus lekötésére proximális $3 \times 2 \text{ mm}$ -es szakaszok /P₁, P₂, P₃/ AChE-aktivitás változása 4 órával a lekötés után. $n = 5$, S -feltüntetve minden értéknél.

- a kolinerg rendszer ezen enzime az idegtörzsben jelentős mértékű mozgásban van,
- a 4 órás periódusban kialakuló szignifikáns átrendeződés lehetővé teszi minden olyan anyag hatásának tesztelését ezzel a rendszerrel, amely az axonális transzport paramétereit befolyásolja.

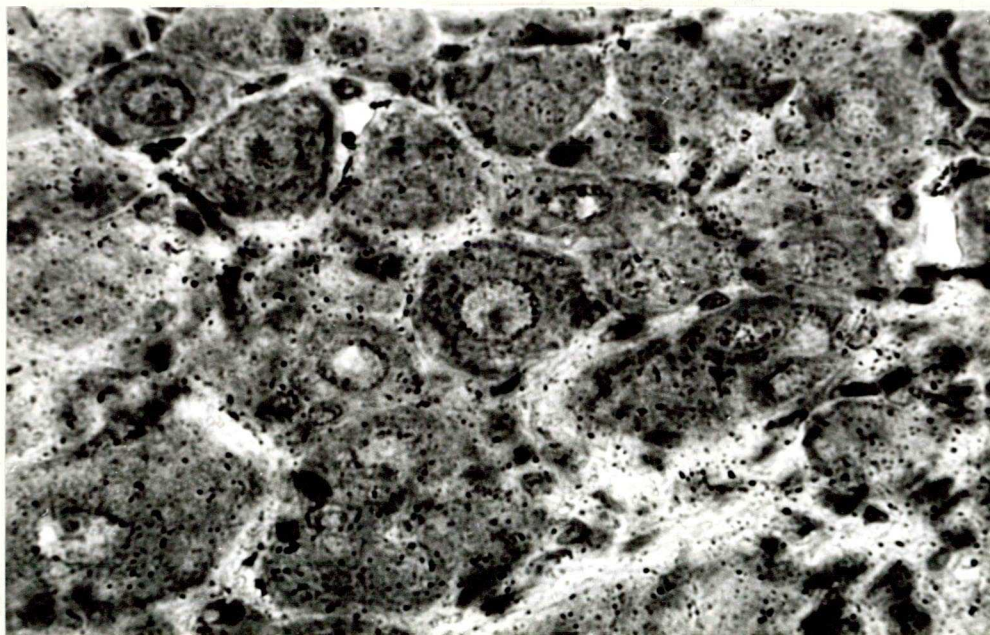
II/4. DFP-transzport

a. Inkorporáció és transzport autoradiográfiás vizsgálata

A L₆-os ggl-ba az I/1. szerint 1 µl ³H-DFP-t /1-1-³H/diizopropylfluorophosphát, 3,9 Ci/mmol, Amresham/ juttatunk és két óra elteltével a ggl-t, valamint az első 5 mm-es idegszakaszt az I/1/c. szerint feldolgoztuk.

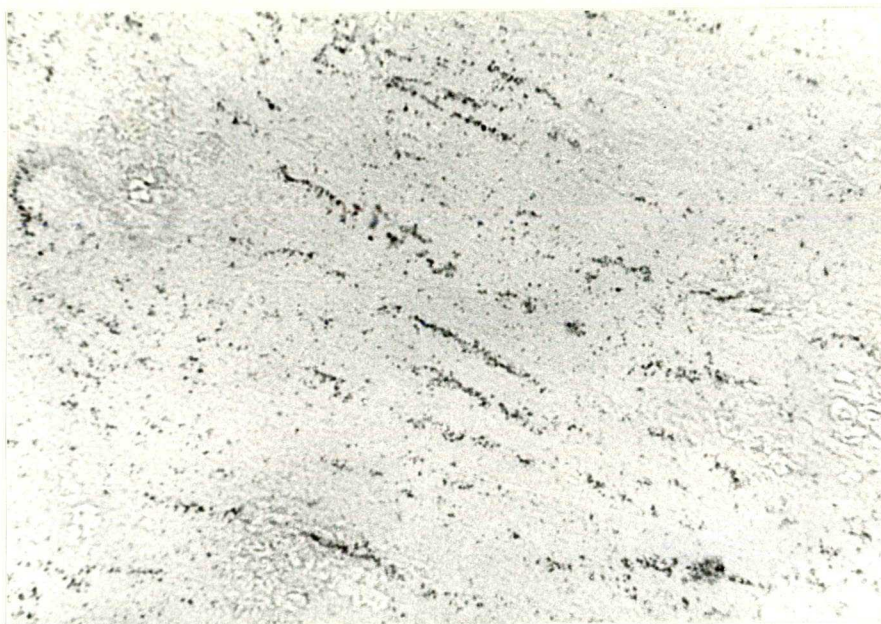
A kezelt ggl. sejtjeiben jól körülhatárolható helyeken a ³H-DFP akkumulálódik. Főleg a nagy pseudounipolaris sejtek meghártyájában és citoplazmájában, valamint a kis-sejtek karioplazmájában figyelhető meg aktivitás /7.ábra/. Az idegrostok radioaktivitást /8.ábra/ az AChE-hisztokémiai reakció végtermékéhez hasonló elrendeződésben /10/a.ábra/ tartalmaznak.

A vizsgálat eredményei szerint az extracellularisan ggl-ba juttatott ³H-DFP bejut a ggl. sejtjeibe és ott az AChE elhelyezkedésének megfelelő pozíciójában halmozódik fel. Ezek a helyek főleg a sejt membránrendszerei /GWYN és FLUMERFELT, 1971; HATTORI és McGEER, 1974/. A bejutás után két órával magas diffúz jelzettsége is van a ggl-nek.



7. ábra : ^3H -DFP -vel kezelt ggl. autoradiográfiás képe.

A DFP lokalizáció helyét az ezüst szemcsék jelzik.



8. ábra: ^3H -DFP az idegrostokban. A szemcsék főleg az axonokban foglalnak helyet.

Ugyanekkor a ggl-ra közvetlenül következő idegszakasz /8.ábra/ alacsony diffúz és magas -- az idegrostok lefutásának megfelelően -- rendezett aktivitása arra enged következtetni, hogy az itteni jelzettség intraaxonális eredetű és a meginduló transzporttal kapcsolatos.

b. DFP-transzport radiokémiai és biokémiai vizsgálata

Az L₆-os ggl-ba a II/1. szerint 0,4 mg/kg DFP-t és 100 µg ³H-DFP-t tartalmazó oldatot juttattunk. A ggl-t és a kapcsolódó 20 mm-es idegszakaszt 4 ill. 24 óra után vettük ki. Az 5 mm-es darabokból a II/1/b szerint készült homogenizátumokat két részre osztottuk /A és B/.

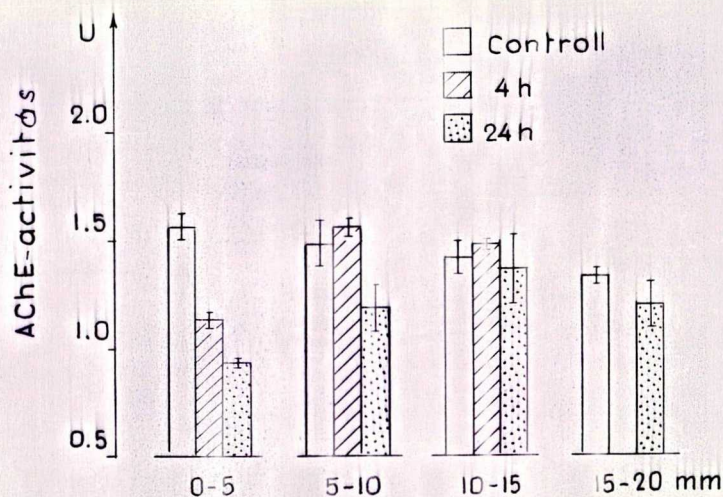
Az állatok egy csoportjánál a ggl. kezelése után lekötöttük a n. ischiadicust /II/1/. Az anyag kivétele és feldolgozása 24 óra elteltével történt a fentiek szerint.

1. Transzport vizsgálat ³H-DFP-vel

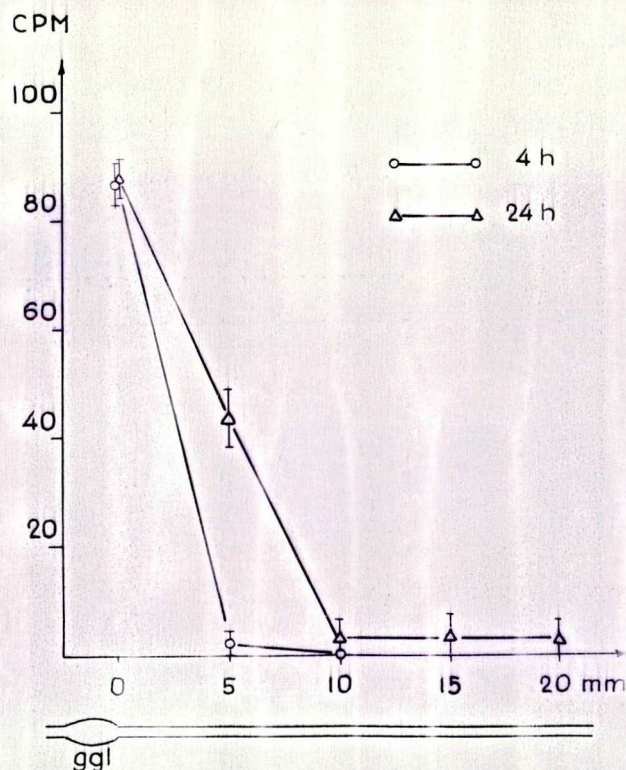
Az "A" -homogenizátumok 50-50 µl-ének aktivitását a II/1/a szerint meghatároztuk.

A mérés eredményei azt mutatják, hogy a ³H-DFP ggl-ba juttatása után 4 órával a jelzett anyag megjelenik az első 5 mm-es idegszakaszban, de a második 5 mm-t nem éri el. 24 órás mintákban radioaktivitás található a második 5 mm-es szakaszban is, de 10 mm-en túl nem jut a jelzett anyag /9.ábra/. KOENIG /1965/ patkány IV. agykamrájába bevitt ³H-DFP-re hasonló /8-10 mm/nap/ migrálódást ír le.

A 40 mm-re történt lekötésnél nincs akkumuláció a 24 órás periódus alatt.



10. ábra : 0,4 mg/kg DFP hatása a n. ischiadicus AChE-aktivitására. Kontroll : n = 7, 4 és 24 h-ás : n = 4, szórás feltüntetve minden értéknél.
AChE akt. : U x 126 μ mol/g /h hidrolizált AChJ.



9. ábra : A ^3H -DFP intraaxonális transzportja a n. ischiadicusban. n = 4 , szórás feltüntetve minden értéknél.



2. Transzport vizsgálat AChE-aktivitás változásának mérésével

A "B" -homogenizátumokból a II/1/b szerint mértük az enzimaktivitást.

A mérések szerint 0.4 mg/kg DFP ggl-be vitele után az enzimgátlás helyi jellegű. A 4 óránál az ideg első 5 mm-nek aktivitása a kontrollhoz viszonyítva jelentősen csökken, míg a második 5 mm-ben nincs változás. 24 óra után a gátlás-zóna eléri a második 5 mm-t, de aktivitás csökkenés nem tapasztalható a következő szakaszban /10.ábra/.

A 9 és 10-es ábrák összevetéséből jól látszik, hogy a párhuzamosan alkalmazott két módszer eredményei nagyfokú korrelációt mutatnak. A jelzett anyag és az enzimaktivitás csökkenés időben azonos idegszakaszon jelentkezik.

A lekötéses kísérlet eredményei szerint a ^3H -DFP nem vesz részt kimutathatóan a gyors transzportban, ellentétben az aktív AChE-al /LUBINSKA és NIEMIERKO,1971; KÁSA,1968; KÁSA és mts.,1973/ és 5-10 mm/napos előrehaladását figyelembevéve, a lassú transzport komponenshez kapcsolódik.

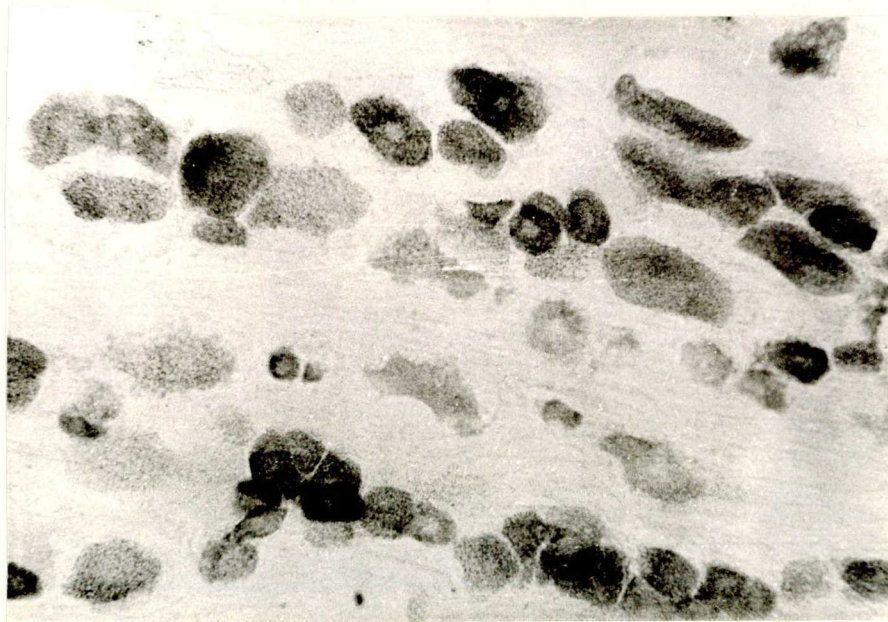
II/5. AChE-reszintézis tanulmányozása DFP-s bénítás után

1. DFP AChE-bénítő hatásának hisztokémiai vizsgálata

A II/1 szerint az L₆-os ggl-ba 2 mg/kg DFP-t juttattunk. Ezzel egyidőben 5 mg/kg atropint adtunk ip. a kolinerg facilitációból eredő tünetcsoport csökkentésére.

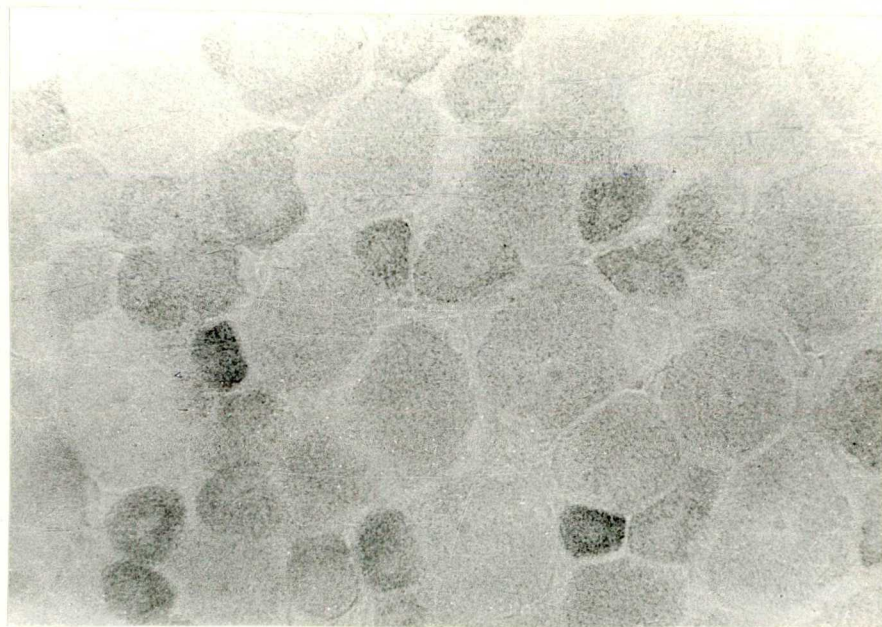
2 órával a kezelés után a II/1/c. szerint végeztük az AChE hisztokémiai kimutatását.

A kezeletlen állatok ggl-jaiban AChE-aktivitás demonstrálható minden isegsejtben és axonban /11/a.ábra/.



11/a. ábra : Kontroll spinalis ggl. AChE aktivitása.

Mind a nagy, mind a kis sejtek intenzív festődést mutatnak. / x 450/



11/b. ábra : L₆- os spinalis ggl. AChE aktivitása 2 órával a DFP /2 mg/kg/ beadása után. A kis sejtek néhányában gyenge festődés látható./ x 400/

A DFP-vel kezelt ggl-ok sejtjeinek és axonjainak AChE-aktivitása eltűnik /11/b. ábra/. Kisebb reakció-végtermék jelentkezik a kissejtek állományában.

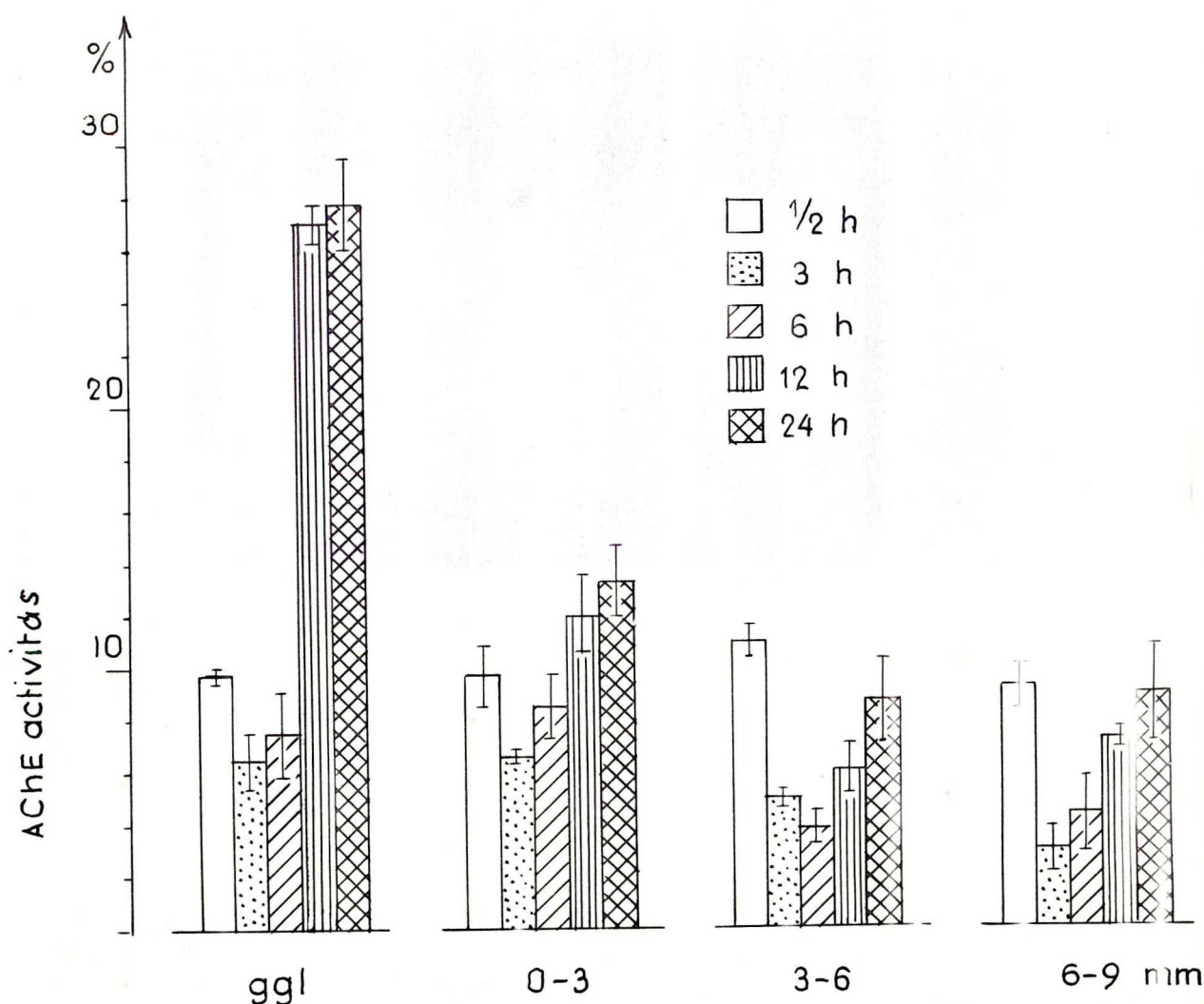
2. AChE-reszintézis vizsgálata

A II/1. szerint 2 mg/kg DFP-t adtunk az L₅-ös ggl-ba. A mintákat /ggl. és 3x3 mm-es idegszakasz/ fél-, 3, 6, 12 és 24 óra elteltével vettük. A II/1/b. szerint mértük az AChE-aktivitást.

2 mg/kg DFP intraganglionáris alkalmazása után az enzim reszintézise tanulmányozható. Az ilyen mennyiségű DFP hatása szisztémás.

3 órával a kezelés után a ggl. AChE aktivitása 3-6 %-a a kontrollnak. A különböző időpontokban vett minták változó enzimaktivitása jelzi a reszintézis folyamatát /12. ábra/. Fél óra után a gátlás foka a vizsgált szakaszon megegyező. A DFP a beadást követő 1-2 óra alatt fejti ki maximális hatását /DAVIS és AGRANOFF, 1968; SOMOGYI és CHUBB, 1976/. 3 óránál az aktivitás csökkenése ellenére a reszintézis hatását egy kialakuló aktivitás gradiens jelzi, amely kifejezetté válik 6 és 12 óránál. A ggl. és az első 3 mm aktivitása gyorsan emelkedik, míg a többi változatlan marad, ill. alig emelkedik.

12 és 24 óra között az aktivitás szintjében lényeges változás nem történik.



12. ábra : A L_5 -ös spinális ganglion és a n. ischiadicus AChE-aktivitás viszonyai 2 mg/kg DFP intra ggl.-áris injekciója után.
 Ord. : AChE-aktivitás a kontroll értékek %-ában.
 Abs. : Az idegszakaszok ggl.-tól mért távolsága.
 n = 4 minden időpontnál. Szórás/S/ feltüntetve.

II/6. A neuronális anyagtranszport befolyásolása

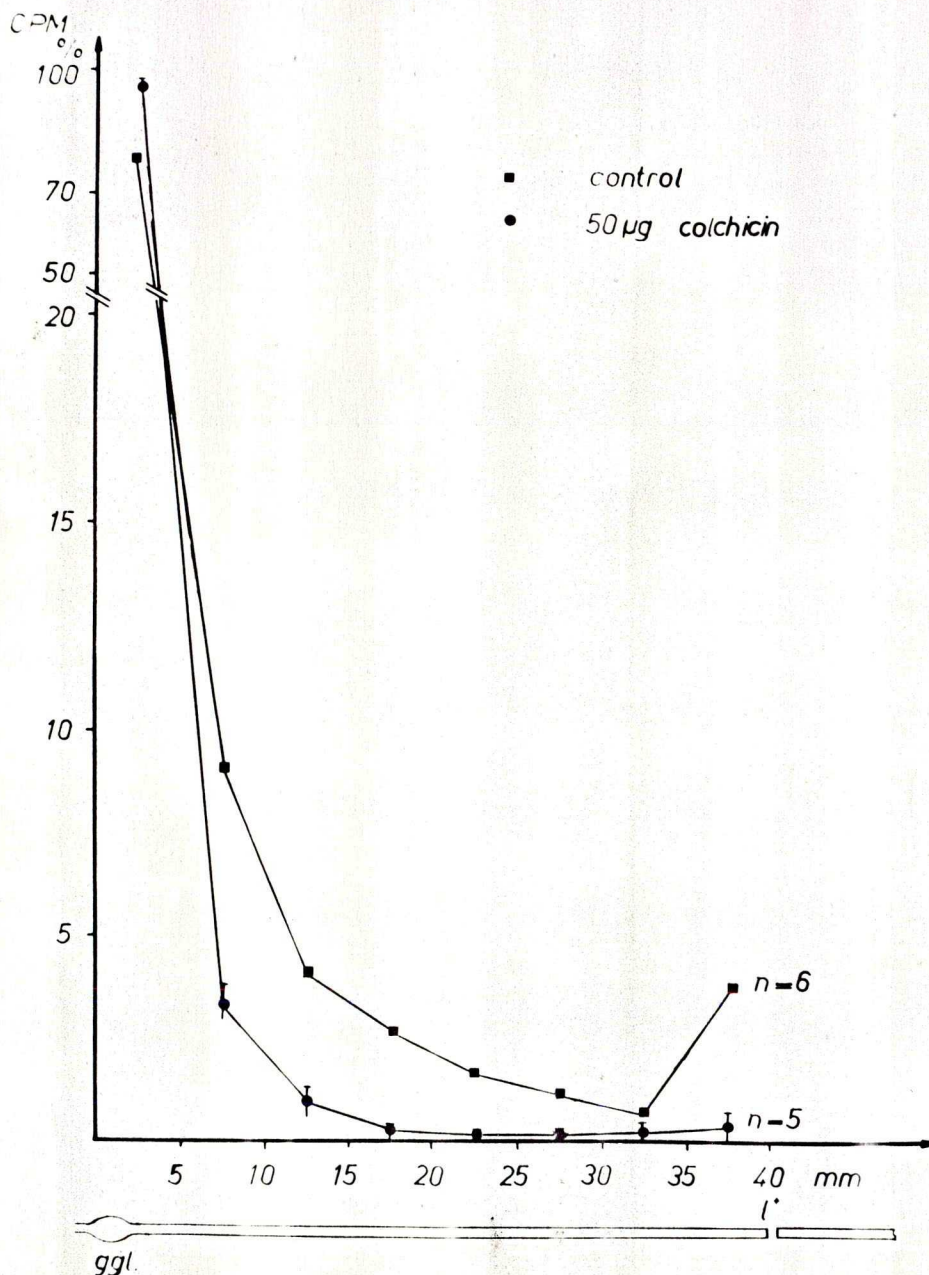
A. Kolchicin hatása a kolin intraaxonális transzportjára

A vizsgálat menete annyiban tért el a II/2/b pontban tárgyalattól, hogy a ^{14}C -kolin L_6 -os ggl-ba juttatását és az ideg átvágását 20 h-val megelőzően a ggl-ba fiziológiai sóoldatban $50\text{ }\mu\text{g/l}$ μl kolchicint /colchicin szulfát, Serva/ juttatunk a mikrotű segítségével /1 perc alatt/. MCGREGOR és mts. /1973/ szerint a kolchicin hatása független a gátló és tesztelésére használt anyag bejuttatása közötti időeltolódástól, ha az 2 óra és 9 nap közé esik. Két óránál előbb és 27 napnál később a gátlás kifejlődése nem kifejezett. A kezelt rendszert 24 órával a jelzett kolin bejuttatása után a II/1/a-ban leírt radiokémiai módszerrel vizsgáltuk. A vizsgálat eredményeit összevetve a gátlóval nem kezelt rendszer kolin-transzport viszonyaival /13.ábra/ megállapítható, hogy $50\text{ }\mu\text{g}$ kolchicin 20 órával a kolin előtt adva, felfüggeszti annak transzportját.

A 40 mm-re elhelyezett átvágásnál nincs akkumuláció, ami a gyors transzport gátoltságára utal.

Az eredmények azt mutatják, hogy a kolin az idegrostban azal a rendszerrel transzportálódik, amit a kolchicin gátol, tehát mozgása ezzel a gátlóval és analógjaival befolyásolható. Ez a vizsgálat igazolja azt is, hogy a kolin gyors transzportjára kapott eredmények valóban intraaxonális eredetűek, hiszen gátolhatók.

Mivel az azonos mennyiségű jelzett kolin mellett a rendszer összaktivitása 24 órás mintáknál rendszeresen alacsonyabb /2/3-a/ gátló esetén, feltételezhető, hogy a továbbszállítás hiánya gátlást jelent a felvevő membrántranszport-rendszer számára is.



13. ábra: Kolchicin hatása a ^{14}C -kolin intraaxonális transzportjára. A kolin ggl.-ba vitele és az ideg átmetszése a kolchicin /50 ug/ kezelés után 20 h-val, az anyag kivétel további 24 h elteltével történt.

l* - az átmetszés helye.

Ord. : rádióaktivitás a vizsgált rendszer %-ában.

B. Kolchicin hatása az AChE transzportjára

1. Sejttestnél alkalmazva

Ennél a vizsgálati sorozatnál a kolchicin adása két módon történt.

a/ Fiziológias sóoldatban 800 és 200 μg intraperitoniálisan,

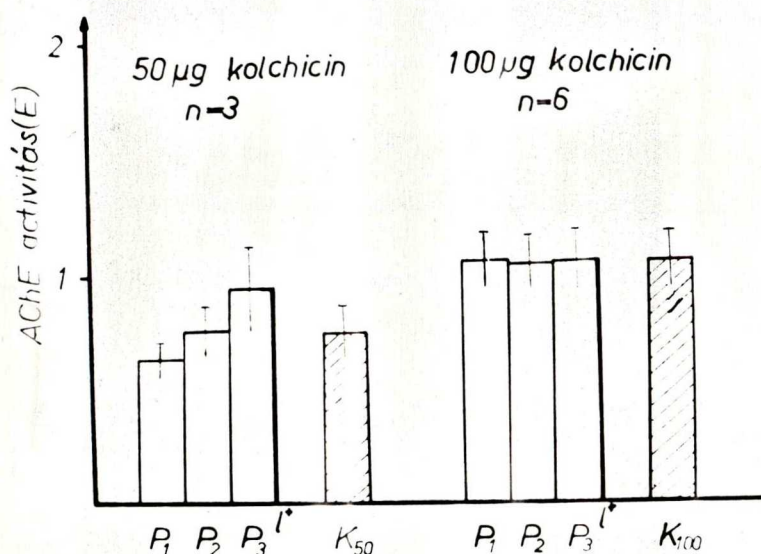
b/ 50 és 100 μg szubdurálisan a lumbális intumescencia területére /50 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}/$.

A bevitel után 20 órával a n. ischiadicust átvágtuk a m. pyriformis felett, 4 óra elteltével vettük ki a mintákat és dolgoztuk fel a II/3 szerint / P_1, P_2, P_3 szakaszok/.

Az ip. bejuttatott kolchicin /800 μg / letális hatású, míg kisebb dózis /200 μg / alkalmazása esetén az AChE transzportra nincs mérhető hatása. A letalitás oka tipos kolchicin mérgezés: a splanchnicus érterület kapillárisainak bénulása az ezzel járó tünetcsoporttal együtt.

A letális alatti dózis szervezeten belüli koncentrációja nem éri el a transzport gátlásához szükséges szintet.

A subdurálisan alkalmazott kolchicin mind a gerincvelői mozgató neuronokra, mind a spinális ggl-ok érzőideg sejtjeire kifejti hatását. 50 μg -ja csökken, 100 μg -ja megszünteti az átmetszésre proximális akkumulációt. A két dózis hatása közötti különbség /14. ábra/ jelzi a gátló hatás koncentráció függését és részben magyarázza az ip. alkalmazás hatástalanságát. Összevetve a kezeletlen-, az átmetszett-, valamint az átmetszett és kolchicinnel kezelt n. ischiadicus AChE aktivitását /6. és 14. ábra/ megállapítható, hogy 50 μg kolchicin csökkenti a transzportot, míg 100 μg felfüggeszti azt.



14. ábra : A n. ischiadicus átmetszésére proximális 3x2 mm-es szakaszok /P₁, P₂, P₃/ AChE-aktivitás változása a szubdurálisan adott 50 és 100 µg kolchicin hatására. 24 h-val a kolchicin és 4 h-val az átmetszés után. l⁺- az átmetszés helye. K_{50,100} : az ellenoldal aktivitása. AChE-aktivitás : E x 126 µmol/g/h hidrolizált ATChJ.

A szignifikancia próba $P_3 - P_2$ variancia analizise/ azt mutatja, hogy az 50 μg -al kezelt és átmetszett, valamint a kezelés nélkül átmetszett között nincs szignifikáns különbség $P > 5\%$.

Ezzel szemben a 100 μg kolchicinnel kezelt szignifikánsan $P < 1\%$ különbözik a csak átmetszettől és jó egyezést mutat a kontrollal $P \gg 5\%$.

Az ip. adott kolchicin hatástalansága kizárja annak lehetőségét, hogy a szubdurális alkalmazás hatása az átmetszéstől proximális akkumulációra helyi jellegű legyen.

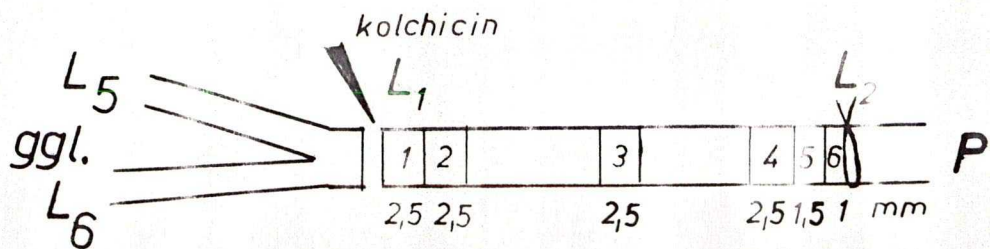
2. A periférián alkalmazott kolchicin anterográd transzportra gyakorolt hatása

A vizsgálatokat izolált n. ischiadicus idegtörzs darabon végeztük.

Patkányon -- nerkózis alatt -- a hasoldalról műtétilag feltártuk az L_5-L_6 -os ggl-ból induló idegek bifurkációjának helyét, majd ez alatt 2 mm-el átvágtuk a n. ischiadicust $/L_1/$.

Ezt követően:

- a/ az átmetszésre perifériás 30 mm-es idegszakaszokat a 15. ábra azerint feldaraboltuk és meghatároztuk AChE aktivitásukat a II/1/b alapján,
- b/ az ideg átmetszése $/L_1/$ után 2 órával kipreparáltuk az idegtörzset a m. piriformis felett /30 mm-re L_1 -től/ és itt lekötöttük az ideget $/L_2/$. Innen számított 4 óra után vettük a mintákat és az a. pont szerint történt a meghatározás. Ez a vizsgálat a 4 órás lekötött sorozat eredményét adja.



15. ábra : Az izolált n. ischiadicus idegszakasz készítésének és feldarabolásának sémája az anterográd transzport vizsgálatához.

P - periféria, L_1 ; L_2 - az átmetszés és lekötés helyei.

SZEGMENS	AChE aktivitás (E)					
	KONTROLL		ÁTMETSZETT		KOLCHICIN (100 μ g)	
	E	s^2	E	s^2	E	s^2
1	1,288	0,182	1,440	0,006	1,748	0,135
2	1,246	0,234	1,233	0,007	1,433	0,059
3	1,131	0,159	1,093	0,034	1,152	0,078
4	1,041	0,075	1,062	0,062	0,988	0,120
5	0,896	0,102	1,036	0,070	0,973	0,109
6	0,875	0,060	1,525	0,046	1,003	0,119
Δ 1-2	0,042	0,007	0,206	0,020	0,315	0,019
Δ 6-4	-0,157	0,026	0,463	0,030	<u>0,015</u>	0,004
N	10		6		6	

I. tábl. : Izolált n. ischiadicus AChE-aktivitás értékei a 15. ábra szerinti vizsgálatban.

AChE-aktivitás: Ex 126 μ mol/g/h hidrolizált AChJ.
 s^2 - variancia



c/ Az ideg átmetszésével $/L_1/$ egy időben a perifériás csonkot 1 mm hosszú, az idegnek megfelelő átmérőjű, műanyag csőbe helyeztük és 100 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$ kolchicinnel kezeltük. A vizsgálat további menete a b szerint történt.

Ez adja a 100 μg kolchicinnel kezelt, 4 órás lekött sorozat eredményeit.

Az a alatt leírt vizsgálat eredménye az idegtörzs 30 mm-nek AChE-aktivitás eloszlását adja meg a kezelés nélküli idegtörzsnek megfelelően /1.tábl.,kontroll/.

A II/3 eredményeivel egyezően egy jelentős proximo-disztális aktivitás gradiens van a vizsgált szakaszban.

Ezeket az értékeket összevetve a b szerint kapott eredményekkel, az aktivitás szembetűnő átrendeződése figyelhető meg /1.táblázat/. Az izolált szakasz AChE-a a csonkok felé vándorol és mind a disztális, mind a proximális végen akkumulálódik. A disztális végen történő felhalmozódás pontosabb mérését célozza az utolsó 2,5 mm további feldarabolása /15.ábra/.

Az összehasonlíthatóság érdekében az 1.táblázat a végdarabok és az utánuk következő 2,5 mm-ek aktivitás-különbségeit is tartalmazza./1-2 és 6-4/. Ezek összehasonlítása jól szemlélteti a 4 óra alatt mindkét csonknál lejátszódó akkumulációt.

A c szerinti kolchicín kezelés jellemző módon változtatja meg az akkumulációs viszonyokat. 100 μg hatására a perifériás végen az enzimaktivitás-szint közelebb áll a kontroll értékhez $/P > 5\%/$, mint az átmetszettnél kapott értékhez $/P < 1\%/$. Ez azt jelenti, hogy a kolchicín perifériás alkalmazására disztális szakaszon gátolja az anterog-

rád AChE transzportot, egyezésben a kolin transzportjánál tapasztalt inhibíciós hatással.

Az anterográd transzport gátlása a korábbi eredményekkel jól magyarázható, ellentétben a centrális csomakumulációjánál tapasztaltakkal. Összehasonlítva a három sorozatban az 1-es és 2-es szegmens aktivitás különbségének adatait /1. táblázat/, a nagyobb akkumuláció a kolchicinnel kezelt idegeknél adódik. Ez az eredmény első megközelítésben arra enged következtetni, hogy a leírtak szerint alkalmazott kolchicin a retrográd transzportra nincs hatással. Ezen viszonyok tisztázására és helyes értékelhetőségére egy más összeállítású kísérlet szükséges, amelyben a drog retrográd transzportra gyakorolt hatása is mérhető.

3. Kolchicin retrográd transzportra gyakorolt hatása

A vizsgálatot a B/2 pontban leírt izolált idegszakasszal végeztük. A kísérlet összeállításában alkalmazott változtatásokat a 16. ábra mutatja.

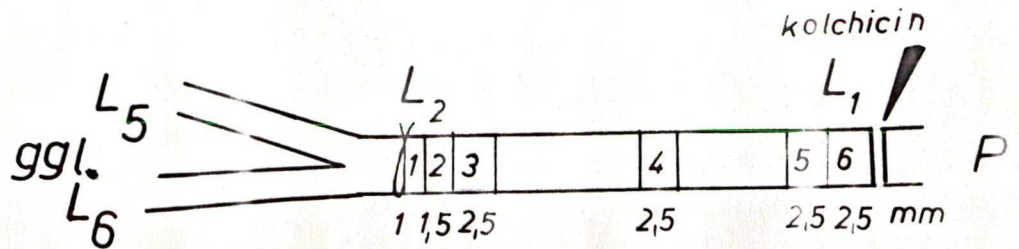
Az ábra szerinti perifériás átmetszést /L₁/ végeztük először és itt alkalmaztuk a kolchicint is. A centrális lekötést /L₂/ alkalmaztuk két órával később és utána négy óra telt el a mintavételéig. A feldarabolásnál most a centrális csomak 2,5 mm-ét osztottuk tovább, hiszen az itt lejátszódó akkumuláció változást kívántuk pontosan követni.

A továbbiakban a B/2-nek megfelelően mértük a kezeletlen, a lekötött, valamint a lekötött és 100 µg kolchicinnel a perifériás csomaknál kezelt idegszakaszok AChE-aktivitásait.

A mért adatokból kitűnik, hogy ebben az összeállításban a korábbiak /B/2 pont/ az ellenkezője történik /2.táblázat/. A centrális csomak akkumulációja csökken a gátló anyag hatására, míg a perifériásé inkább növekszik.

A retrográd transzport gátlása nem annyira pontosan mérhető, mint az anterográfé, mert figyelembe kell venni, hogy a vizsgált idegszakaszon több kilépő oldalág is van, melyek az anterográd transzport vizsgálatát nem, de a retrográdet jelentősen módosíthatják.

Összehasonlítva a két vizsgálat eredményeit /17.ábra/ megállapítható, hogy a kolchicin alkalmazási helyétől perifériásan az anterográd, centrálisan a retrográd transzportot gátolja, de nincs hatással egyidejűleg mind a kettőre.



16. ábra : Az izolált n. ischiadicus idegszakasz készítésének és feldarabolásának sémája a retrográd transzport vizsgálatához. P - periféria.

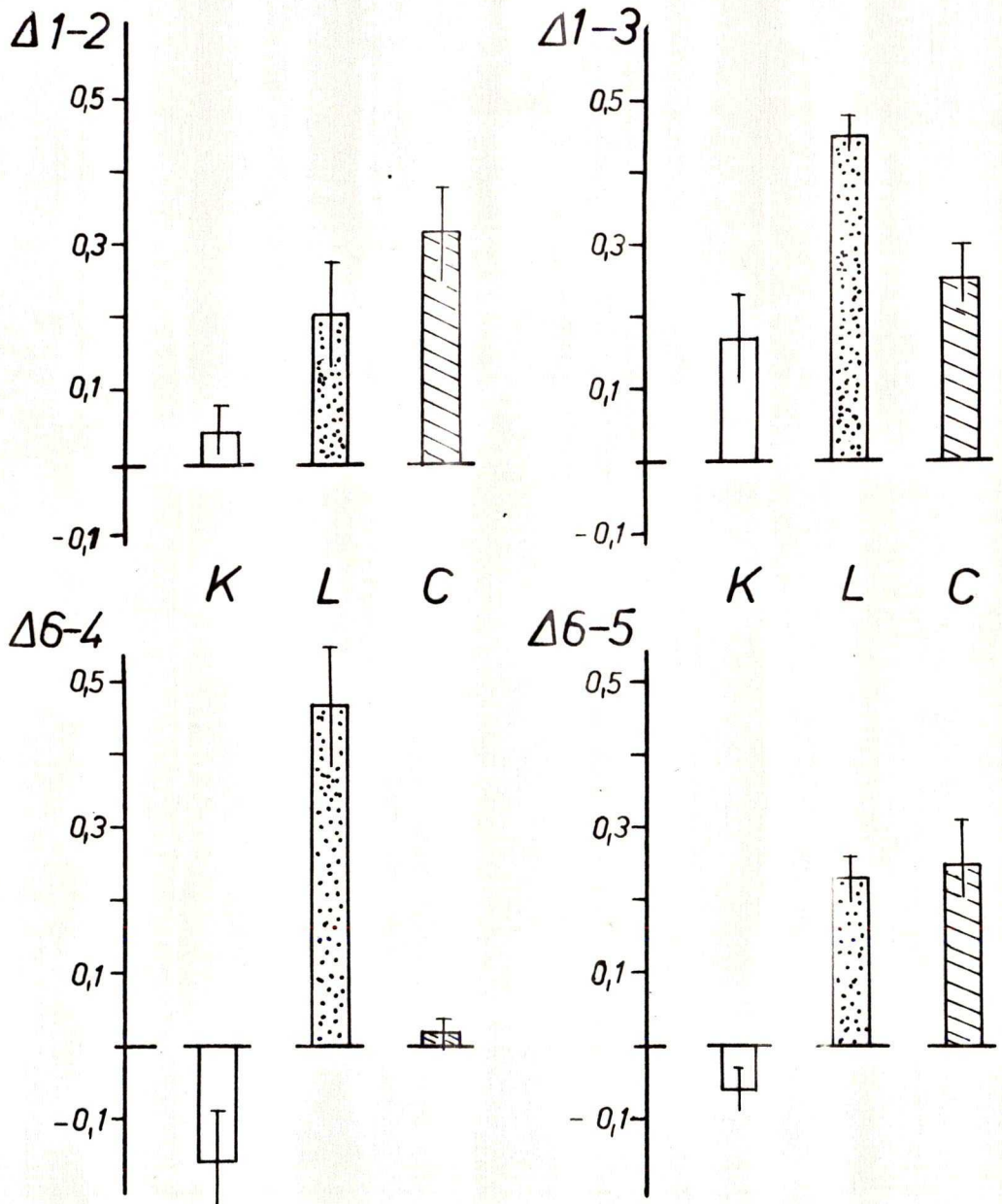
L_1 ; L_2 - átmetszés ill. lekötés helye.

SZEGMENS	AChE aktivitás (E)					
	KONTROLL		ÁTMETSZETT		KOLCHICIN (100 μ g)	
	E	s^2	E	s^2	E	s^2
1	1,276	0,024	1,501	0,015	1,400	0,076
2	1,086	0,035	1,168	0,013	1,159	0,088
3	1,106	0,087	1,053	0,022	1,146	0,034
4	1,014	0,084	1,035	0,053	0,956	0,036
5	0,876	0,059	0,901	0,012	0,820	0,110
6	0,811	0,078	1,128	0,051	1,069	0,044
Δ 1-3	0,169	0,004	0,448	0,004	<u>0,254</u>	0,016
Δ 6-5	-0,067	0,019	0,228	0,001	0,248	0,009
N	7		5		6	

II. tábl. : Izolált n. ischiadicus AChE-aktivitás értékei a 16. ábra szerint végzett vizsgálatban. s^2 -variancia
AChE-aktivitás: E x 126 μ mol/g/h hidrolizált ACTHJ.

kolchicin az 1-es végen
(ANTEROGRAD HATÁS)

kolchicin a 6-os végen
(RETROGRAD HATÁS)



17. ábra : A kolchicin perifériás hatása n. ischiadicus izolált szakaszának AChE-transzportjára.

K- kontroll, L- lekötött, C- lekötött és kolchicinnel kezelt /100 ug/

1-2 és 1-3 a centrális csomakumulációja/1-es vég/

6-4 és 6-5 a perifériás csomakumulációja /6-os/

III. VIZSGÁLATAINK EREDMÉNYEINEK ÉRTÉKELÉSE

1. A kolin felvétele és transzportjának specifikumai

A kolin egyrészt az ACh-szintéziséhez szükséges szubsztrát, másrészt fontos prekuzora a membránépítő foszfolipideknek /lecitinek, szfingomiélinek/ is. Figyelembe véve, hogy az ACh-lokális szintézise előfordulhat az axonban /HEILBRONN és PETERSON, 1973; DAHLSTRÖM és mts., 1974/ a kolin -- mint prekuzor -- transzport vizsgálatáról kapott eredmény lehetőséget ad annak, hogy a helyi szintézishez szükséges kolin rendelkezésre áll-e, ill. pótlásában az axoplazmatikus transzport milyen szerepet játszhat.

A kolint -- főleg a klinerg neuronok -- nagy affinitással felveszik az extracelluláris térből /YAMAMURA és SNYDER, 1972; YAMAMURA, 1973/.

Intracellulárisan gerincvelői motoneuronokba juttatott ^3H kolin transzportálódik az axonba és a dendritékbe /KREUTZBERG és SCHUBERT 1973; 1975/.

Kísérleteink azt mutatják, hogy a spinális ggl-ok idegsejtjei is felveszik az extracelluláris ^{14}C -kolint és hosszabb időn keresztül /2-3 nap/ magas jelzettségük marad. A felvett kolin a perikarionból különböző sebességű komponensekkel transzportálódik a terminálisok felé. A transzport három fázisa különíthető el. Egy gyors, több mint 250 mm/nap sebességű, egy közepesen mozgó /40-50 mm/nap/, amely valószínűleg a foszfolipideket hordozza /MIANI, 1964/ és egy lassú

fázis /2-3 mm/nap/, amivel a transzportált jelzettség nagy tömege szállítódik.

A gyors fázisú kolin transzport jelenléte lehetőséget nyújt arra a feltételezésre, hogy a kolin részt vehet az axonális ACh-szintézis prekursorának pótlásában. Transzportjának mind a gyors, mind a lassú fázishoz való kapcsolódása, valamint gyors akkumulációja a sejttesttől távoli /40 mm/ perifériás lekötésnél, alkalmassá tette a kolint arra, hogy transzport gátlási vizsgálatok tesztanyagaként felhasználjuk.

2. Az AChE neuronális lokalizációja, transzportja és irreverzibilis inaktiválását követő reszintézise

Vizsgálataink eredményei alátámasztják LUBINSKA és mts. /1963/, valamint DAHLSTRÖM /1971/ azon közlését, hogy az AChE-aktivitás a n. ischiadicusban proximo-disztális csökkenő gradienst mutat. Az ideg 40 mm-ében a gradiens jelentős mértékű.

Az axonok folytonosságának megszüntetését /lekötés vagy átvágás/ követő, a lekötésre proximális idegszakasz aktivitásának rövid idő /4 óra/ alatt létrejövő, jól demonstrálható emelkedése és ezzel kapcsolatosan a gradiens ezen szakaszra vonatkozó megfordulása, jelzi az AChE jelentős mértékű transzportját. Ezek az adatok jól egyeznek a vizsgált rendszerben tett korábbi megfigyelésekkel /KÁSA, MANN, KARCSU, TÓTH és JORDAN, 1973/.

BLABER és CREASEY /1960/, DAVIS és AGRANOFF /1968/, AUSTIN és JAMES /1970/, valamint BUTCHER és BILEZIKJIAN /1975/ vizsgálataiban az idegrendszer különböző területein az AChE-aktivitás 75-90 %-os gátlását 1,5-3 mg/kg DFP intracerebrál, ip. vagy im. bejuttatásával érték el.

Intraganglionárisan bevitt hasonló mennyiségű DFP -- esetünkben -- a spinális ganglion enzimaktivitásának 95-96 %-át gátolta. Hisztokémiai vizsgálataink szerint a megmaradó aktivitásért a ggl. kissejtjei lehetnek felelősek, mivel ezekben helyenként enzimaktivitás-végtermék marad DFP kezelés után is. A rezisztens aktivitást több tényező is okozhatja:

- az AChE-izoenzimek DFP-re nézve különböző érzékenységek /SRINIVASAN és mts. 1976/,
- egy olyan DFP-rezisztens eszteráz jelenléte, amely képes az ATCh bontására /SINGER és mts., 1960/.

Az autoradiográfiás vizsgálatok azt jelzik, hogy a ggl-ba vitt ^3H -DFP koncentrálnak, ahol az enzim-aktivitás hisztokémiailag is demonstrálható. Ezek a megfigyelések egyeznek GWYN és FLUMERFELT /1971/, valamint HATTORI és McGEER /1974/ adataival.

Az egy időben alkalmazott ^3H DFP-s radiokémiai- és AChE-enzimkémiai vizsgálatok nagyfokú korelációja -- a DFP és gátlási zóna együtt mozgásában -- arra utal, hogy

- vagy az inaktivált enzim halad disztálisan,
- vagy a DFP vándorol az idegtörzsben és létrehozza a gátlási zóna eltolódását a periféria felé.

Az a tény, hogy a spinális ggl -- n. ischiadicus rendszerben a ^3H -DFP vándorlása 10 mm/24 h-nál nem több, arra enged következtetni, hogy a lassan migrálódó sejtkomponenshez kötődik.

Patkány IV. agykamrájábanjuttatott ^3H -DFP is 8-10 mm-t transzportálódik naponta /KOENIG,1965/.

Az intraaxonális gyors transzport AChE-ra /LUBINŠKA és NIEMIERKO,1971; KÁSA,1968; KÁSA és mts.,1973/ ^3H -DFP segítségével nem mutatható ki /nincs akkumuláció a lekötésnél/. Ez arra enged következtetni, hogy sem az inhibitor-enzim komplex, sem a DFP szabadon nem lép be a gyors transzport rendszerbe.

Az intraganglionárisan bejuttatott 2 mg/kg DFP a biokémiai vizsgálatok szerint -- az egész szervezetben -- hatásosan bénítja az AChE-t. A gátlás irreverzibilis /DIXON és WEBB,1964/ és spontán reaktiváció nem fordul elő /BLABER és CREASEY,1960; WELSCH és DETTBARN,1972/ így az ujonnan megjelenő enzim a reszintézisnek tulajdonítható.

Az AChE gyors megjelenése a ggl-ban /6 óra/, majd az idegtörzsben kialakuló proximo-disztális enzimaktivitás gradiens arra enged következtetni, hogy az enzimszintézis elsődleges helye a perikarion /KÁSA és CSILLIK,1968; SOMOGYI és CHUBB,1976; CISSON és WILSON,1977/ és az axonális lokálszintézis /KOENIG és KOELLE,1960;1961; KOENIG,1965; SRINIVASAN és mts.,1976/ feltehetően nem játszik szerepet az axonális AChE-aktivitás visszaállításában.

3. A neuronális anyagtranszport kolchicin okozta változásai és a transzport folyamat néhány aspektusa

Az intraaxonális anyagtranszport befolyásolásának lehetőségét vizsgáltuk különböző helyen és eltérő dózisban alkalmazott kolchicin gátló hatásának felhasználásával.

Az ip. alkalmazott kolchicin nagy dózisa letális, ez alatti dózisa hatástalan a transzportra.

Iv. vimblastin /CHENEY és mts.,1973/ és ip. kolchicin /FITZGERARD és MAYFIELD,1976/ szintén hasonló eredményt adott.

Patkány, egér, tengerimalac és aranyhörcsög tubulinjának polimerizációja -- in vitro -- hasonló érzékenységi kolchicinra, de in vivo alkalmazva az LD₅₀-es dózis százszoros /470 mg/kg/ aranyhörcsögnél, mint patkánynál /3-4 mg/kg/ /FRITZGERARD és MAYFIELD,1976/. Ezek alapján fel kell tételeznünk egy aktiv lebontó mechanizmust /CHENEY és mts.,1973/.

Az idegrendszer területén -- a neuronok sejttestjeinél -- alkalmazva a kolchicin gátolja a transzportot /JAMES, 1970; KARLSON,1971; MCGREGOR,1973; FONNUM,1973; FRIZELL, 1975; WILSON,1975/. A hatás kifejlődéséhez elegendő idő /legalább 2 óra/ és megfelelő koncentráció szükséges.

Eredményeink szerint a kolchicin a neuronok sejttestjénél alkalmazva mind az AChE, mind a kolin transzportját gátolja. A lumbális intumescencia területére szubdurálisan adva 50 µg-ja csökkenti, 100 µg-ja leállítja a patkány n. ischiadicusában az AChE transzportot. A két dózis hatása közötti különbség a gátlási folyamat koncentráció függésére utal.



Nagy dózisu kolchicin és vimblastin ugyanebben a rendszerben szubdurálisan adva hasonló hatású az ACh /HEIWALL és mts.,1976/ ill. a ChAc /DZIEGIELEWSKA és mts.,1976/ transzportjára.

A spinális ggl-ból kiinduló kolin transzport gátlásához 50 µg hatásosnak bizonyult, az inhibíció a transzport minden komponensére kiterjed.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a transzport rendszer sejttesti iniciációjának gátlása maga után vonja az egész axon ilyen jellegű aktivitásának blokkolását. Bár ezen kautélák mellett végzett vizsgálat nem nyújt információt a gátlás mechanizmusára, eredményei felvetik annak valószínűségét, hogy a transzport rendszer egy pontjának sérülése a tőle disztális idegszakaszok gátlását is eredményezi. A kérdés úgy merül fel, hogy ez a jelleg csak a sejttest axon viszonylatában, vagy axonon belül is igaz-e. Ez a kérdés vezetett bennünket a kolchicin perifériás alkalmazásának vizsgálatához.

A kolchicin, az idegek perifériás nyúlványánál alkalmazva a lekötéshez vagy átvágáshoz hasonló duzzanatot okoz a kezelésre proximális néhány mm-en. Ez a duzzanat az intra axonális anyagmozgás gátoltságából adódik /SJÖSTRAND és mts.,1969; FERNANDEZ és RAMIREZ,1974; FRIZELL és mts.,1975; DAHLSTRÖM és mts.,1975/.

Ezzel megegyező hatású a drog ilyen feltételek között, a perifériáról sejttestbe irányuló transzportra is /EDSTRÖM és HANSON,1973; LAVAIL és LAVAIL,1974; STOECKEL és mts.,1975; ami jelzi, hogy nemcsak az anterográd, de a retrográd transzport gátlása is történik.

Izolált idegszakaszban -- ami egyaránt jelenti a sejttesttől és a perifériától történt elválasztást -- intraaxonális anyagvándorlás folyik, melynek tendenciája az, hogy az egyes anyagokra nézve akkumuláció jön létre mind a perifériás, mind a centrális végnél /LUBINSKA és mts.,1964; NIEMIERKO és LUBINSKA,1967; PARTLOW és mts.,1972; FONNUM és mts.,1976/.

Ilyen körülmények között az AChE-aktivitás emelkedése erősebb a distális, mind a proximális oldalon, növekszik az idővel és függ az izolált szakasz hosszától /LUBINSKA és mts.,1964; FONNUM és mts.,1976/.

Az AChE-nak n. ischiadicus 30 mm-es izolált szegmensében történő elmozdulását célzó vizsgálataink a fentiekhez hasonló eredményt hoztak. 4 óra alatt a proximális és disztális csomónál egyaránt jól mérhető enzimaktivitás emelkedés történt.

Ilyen körülmények között az AChE mind gyors, mind lassú transzportja folyamatos /FONNUM,FRIZELL és SJÖSTRAND,1976/ ami arra utal, hogy az ideg átmetszése /vagy leköttetése ill. roncsolása/ magát a transzport folyamatot a szakasz belsejében érintetlenül hagyja, transzport barriert csak az átvágásnál jelent.

Ezzel ellentétben a sejttestnél alkalmazott kolchicín kezelésünk után az idegre helyezett leköttetésnél nincs akkumuláció, megegyezően mások eredményeivel.

Ennek analógiájaként, lokálisan, periférián alkalmazott kolchicín kezeléstől disztális leköttetésnél sincs ACh /HEIWALL és mts.,1976/, ChAc /DZIEGIELEWSKA és mts.,1976/, valamint AChE és ChAc /DAHLSTRÖM,HEIWALL és LARSON,1975/ akkumuláció.

Az általunk vizsgált izolált idegszakasz centrális csomkjánál alkalmazott 100 µg kolchicin hatása eliminálta a distális csomknál történő AChE-aktivitás felszaporodását. A közölt adatok arra engednek következtetni, hogy az ideg folytonosságának megszüntetése és a kolchicin okozta transzportgátlás között lényegi különbségek vannak. A colchicin magát a transzport folyamatot szünteti meg, az átmetszés ezt érintetlenül hagyja.

E mellett, az izolált idegszakasz centrális csomkjának kolchicinezése csak a perifériás csomk akkumulációját szünteti meg, a centrális csomknál -- a kezelt helyen -- az enzimaktivitás fokozódás folyamatos. Ennek fordítottja játszódik le, ha a kezelést /100 µg/ a perifériás csomkon végezzük. Ebben az esetben a retrográd transzport gátlása mellett az anterográd folyamatos.

Kísérleteink ezen eredményei azt a következtetést valószínűsítik, hogy az anterográd és a retrográd intraaxonális transzport azonos mechanizmussal, de strukturálisan egymástól elkülönült rendszerrel történik.

Figyelembe véve, hogy a mikrotubulusok dinamikus egyensúlyban vannak subegységeikkel, és a kolchicin bekötődésével ezt az egyensúlyt szünteti meg /BORYSY és TAYLOR, 1967/, továbbá feltételezve a transzportáló filament modell helyességét /OCHS, 1974/ mely szerint az anyagokat ez a filament hordozza a mikrotubulusok mentén az aktomyozin kapcsolatához hasonló Mg^{++} , Ca^{++} és ATP-függő-keresztid rendszer segítségével, az a következtetés adódik, hogy a transzport folyamat

bármely pontján a mikrotubuláris struktúra felbomlása, Ca^{++} , Mg^{++} koncentráció fiziológiástól történő eltolódása /OCHS,1975; ROSENFELD és mts.,1976/, vagy az energetikai rendszer gátlásából adódó ATP-csökkenés /OCHS,1974;1975; SHALENSKI,1973/ a behatás helyétől perifériáisan az anterográd, centrálisan a retrográd intraaxonális transzportot szünteti meg.

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkban az AChE-nak és a kolinnak patkány spinális ganglion--n.ischiadicus modellrendszerben lejátszódó intraaxonális transzport folyamatait, transzportjuk kolchicinnel történő befolyásolásának lehetőségeit, a transzport folyamat jellemzőit, valamint 0,4-2,0 mg/kg DFP AChE-enzimaktivitására és reszintézisére kifejtett hatását tanulmányoztuk.

A vizsgálat alapján levonható következtetések:

A vizsgált rendszerben mind a kolin, mind az AChE részt vesz a proximo-distalis axoplazmatikus transzportban. Egy gyors fázisú kolin transzport létezése valószínűsíti, hogy a kolin -- mint prekursor -- részt vehet az ACh axonális lokálszintézisében.

A kolchicin a sejtestetnél alkalmazva mindkét vizsgált anyag transzportját gátolja. Perifériás alkalmazásának eredményei arra utalnak, hogy az intraneuronális transzport anterográd és retrográd komponensei azonos mechanizmussal, de egymástól strukturálisan elkülönült rendszerrel történnek.

Az intraganglionárisan bejuttatott DFP a pseudo-unipoláris ducsejtek enzimaktivitását megszünteti, de a kissejtek néhányában marad AChE-aktivitás.

A ^3H -DFP auteradiográfiásan azokon a morphologiai helyeken demonstrálható, mint az AChE hisztokémiailag. A jelzett anyag a perikarionból lassú transzporttal halad /10 mm/24 h/ az axon-terminálisok felé. Az AChE-aktivitás a ^3H -DFP transzportjával párhuzamosan esökken.

Az intraganglionárisan bevitt DFP /2 mg/kg/ gátolja az egész vizsgált rendszer AChE-aktivitását /96%/. A ganglion sejtek enzimaktivitása már 3 óra után kezd visszatérni és 12 óra alatt eléri az eredeti aktivitás 27 %-át.

A perikarionból transzportálódó enzim az axonban proximo-distalis gradienst mutat, így vizsgálati eredményünk az AChE axonális lokálszintézisére vonatkozó hipotézist nem támogatja.

Ezuton mondok köszönetet Dr KÁSA PÉTER egyetemi tanárnak, a SZOTE Központi Kutató Laboratóriuma vezetőjének, aki disszertációm készítését mind elméleti, mind gyakorlati segítségével és tanácsaival messzemenően támogatta és intézetében a munkám elvégzéséhez szükséges minden feltételt biztosította.

Köszönöm kollégáimnak - a Központi Laboratorium kollektívájának - a kísérletes munkában és a dolgozat technikai kivitelezésében nyújtott segítségüket.

Ezen kívül mindazoknak hálával tartozom, akik munkámat közvetve vagy közvetlenül támogatták.

FELHASZNÁLT IRODALOM

1. AMBRON, R.T., GOLDMAN, J.E. és SCHVARTZ, J.H., Effect of inhibiting protein synthesis on axonal transport of membrane glycoproteins in an identified neuron of apliaya. Brain Res. 94, 307-323, /1975/.
2. AUSTIN, L. és JAMES, K.A.C., Rates of regeneration of AChE in rat brain subcellular fraktions following DFP inhibition. J. Neurochem., 17, 705-707, /1970/
3. BARONDES, S.H., Further studies of the transport of protein to nerve endings. J. Neurochem., 15, 343-350, //1968/
4. BLABER, L.C. és CREASEY, N.H., The mode of recovery of cholinesterase activity in vivo after organophosphorus poisoning. Biochem. J., 77, 597-604, /1960/
5. BORISY, C.G. és TAYLOR, E.W., The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-³H to cellular protein. J. Cell Biol., 34, 535-548, /1967/
6. BUNT, A.H., LUND, R.D. és LUND, J.S., Retrograde axonal transport of HRP by ganglion cells of the albino rat retina. Brain Res., 73, 215-228, /1974/
7. BUTCHER, L.L., TALBOT, K. és BILEZIKJIAN, L., AChE-neurons in dopamin-containing regions of the brain. J. Neural Transmiss., 37, 127-153, /1975/.
8. CARLSSON, C.A., BOLANDER, P. és SJÖSTRAND, J., Changes in axonal transport during regeneration of feline ventral roots. J. the Neurol. Sci., 14, 75-93, /1971/

9. CHENEY, D.J., HANIN, J., MASSARELLI, R., TROBUDI, M. és COSTA, E., Vimblastine and vincristine: A study of their action on tissue concentrations of epinephrine, norepinephrine és acetylcholine. *Neuropharmacology*, 12, 233-238, /1973/.
10. CHIPPENDALE, T.J., COTMAN, C.V., KOZAR, M.D. és LYNCH, G.S., Analysis of AChE synthesis and transport in the rat hippocampus: recovery of AChE activity in the septum and hippocampus after administration of DFP. *Brain Res.*, 81, 485-496, /1974/.
11. CISSON, C.M. és WILSON, B.W., Recovery of acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle treated with paraoxon. *Biochem. Pharmac.*, 26, 1955-1960, /1977/.
12. CLOUET, D.H. és WAELSCH, H., Amino acid and protein metabolism of the brain. VIII. The recovery of cholinesterase in the nervous system of the frog after inhibition. *J. Neurochem.*, 8, 201-215, /1961/.
13. Cuénod, M., BOESCH, J., MARKO, P., PERISIÉ, M., SANDRI, C. és SCHONBACK, J., Contributions of axoplasmic transport to synaptic structures and functions. *Intern. J. Neuroscience*, 4, 77-87, /1972/.
14. DAHLSTRÖM, A., Effects of vimblastin and colchicin on monoamine containing neurons of the rat, with special regard to the axoplasmic transport of amin granules. *Acta Neuropath. Supl.* 7. 226-237, /1971/.
15. DAHLSTRÖM, A., Axoplasmic transport/with particular respect to adrenergic neurons. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 261, 325-358, /1971/.

16. DAHLSTRÖM, A., EVANS, C.A.N., HÄGENDAL, C.J., HEIWALL, P.-O.,
és SAUNDERS, N.R., Rapid transport of ACh in rat
sciatic nerve proximal and distal to a lesion.
J. of Neural Transmiss., 35, 1-11, /1974/.
17. DAHLSTRÖM, A., HEIWALL, P.-O. és LARSON, P.A., Comparison
between the effect of colchicin and lumicolchi-
cine on axonal transport in rat motor neurons.
J. of Neural Transmiss., 37, 305-311, /1975/.
18. DAVIS, G.A. és ARANOFF, B.W., Metabolic behaviour of
isozymes of acetylcholinesterase. Nature, 220,
277-280, /1968/.
19. DIXON, M. és WEBB, E.C., "Enzymes" Academic Press, New
York /1964/.
20. DZIEGIELEWSKA, K.M., SAUNDERS, N.R., EVANS, C.A.N., SHACEL,
C.J., HÄGENDALL, P.O., HEIWALL, P.-O. és DAHLSTRÖM
A.B., Effects of colchicine and vimblastine on
axonal transport of choline acetyltransferase
in rat sciatic nerve. Acta physiol. scand., 96,
486-494, /1976/.
21. Edström, A. és HANSON, M., Retrograde axonal transport
of proteins in vitro in frog sciatic nerves.
Brain Research, 61, 311-320, /1973/.
22. ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.K., ANDRES, V. és FEATHERSTONE
R.M., A new and rapid colorimetric determinati-
on of acetylcholinesterase activity.
Biochem. Pharmac., 7, 88-95, /1961/.
23. ERDMANN, G., WIEGAND, A. és WELHÖNER, M.H., Intraaxonal
and extraaxonal transport of ^{123}I -tetanus toxin
in early local tetanus. Archives of Pharmacology
290/4, 357-373, /1975/.

24. EVANS, C.A.N. és SAUNDERS, N.R., The distribution of acethylcholine in normal and in regenerating nerves. *J. Phisiology*, 192, 79-92, /1967/.
25. FERNANDEZ, H.L. és REMIREZ, B.U., Muscle fibrillation induced by blockage of axoplasmic transport in motor nerves. *Brain Res.*, 79, 385-395, /1974/.
26. FERNANDEZ, H.F. és INESTROSA, N.C., Role of axoplas-mic transport in neurotrophic regulation of muscle end plate AChE. *Nature*, 262, 55-56, /1976/
27. FONNUM, F., FRIZELL, M. and SJÖSTRAND, J., Transport, turnover and distribution of choline acethyl-transferase and acethylcholinesterase in the vagus and hypoglossal nerves of the rabbit. *J. Neurochem.*, 21, 1109-1120, /1973/.
28. FONNUM, F., FRIZELL, M. és SJÖSTRAND, J., Redistribution of choline acethyltransferase and acethylcholin-esterase in isolated nerve segment of the rabbit vagus nerve. *J. Neurochem.*, 26, 427-429, /1976/.
29. FITZGERARD, T.J. és MAYFIELD, N.G., Effect of cholchi cine on polimerisation of tubulin from rats, mice, hamsters and quinea-pigs. *Experientia*, 32, 83-84, /1976/.
30. FRIZELL, M., HASSELGRIN, P.O. és SJÖSTRAND, J., Axoplas-mic transport of AChE and ChAc in the vagus and hypoglossal nerve of the rabbit. *Exp. Brain Res.*, 10, 526-531, /1970/.
31. FRIZELL, M. és SJÖSTRAND, J., Transport of proteins, glycoproteins and cholinergic enzymes in rege-nerating hypoglossal neurons. *J. Neurochem.*, 22, 845-850, /1974/.

32. FRIZELL, M., McLEAN, W.G. és SJÖSTRAND, J., Slow axonal transport of proteins : Blockade by interruption of contact between cell body and axon. Brain Res., 86, 67-73 /1975/.
33. FRIZELL, M., McLEAN, W.G. és SJÖSTRAND, J., Retrograde axonal transport of rapidly migrating labelled proteins and glycoproteins in regenerating peripheral nerves. J. Neurochem., 27, 191-196 /1976/.
34. GRAFSTEIN, B., Transport of protein by goldfish optic nerve fibers. Science, 157, 196-198 /1967/.
35. GRAFSTEIN, B., McEWEN, B.O. és SHELANSKI, M.L., Axonal transport of neurotubule protein. Nature, 227, 289-290 /1970/.
36. GRAFSTEIN, B., Transneuronal transfer of radioactivity in the central nervous system. Science, 172, 177-179 /1971/.
37. GWYN, D.G. és FLUMERFELT, B.A., Acetylcholinesterase in non-cholinergic neurones: A histochemical study of dorsal root ganglion cells in the rat. Brain Res., 34, 193-198 /1971/.
38. HÄGGENDAL, C.J., DAHLSTRÖM, A.B. és SAUNDERS, N.R., Axonal transport and Ach in rat preganglionic neurons. Brain Res., 58, 494-499 /1973/.
39. HATTORI, T. és McGEER, P.L., Elektron microscopic identification of cholinesterase-containing structures in the corpus striatum by diisopropyl fluorophosphate uptake. Exp. Neurol., 45, 541-548 /1974/.



40. HEBB, C. és SILVER, A., The effect of transection on the level of choline acetylase in the goat's sciatic nerve. *Endocrinology*, 71, 196-202/1962/.
41. HEBB, C. és SILVER, A., Axoplasmic flow of protein. *Profides of the Biological Fluids*, /Amsterdam 1975/
42. HEILBRONN, E. és PETTERSSON, H., Acetylcholin and related enzymes in normal and ligated cholinergic nerves from *Torpedo mormorata*. *Acta Physiol. Scand.*, 88, 590-592 /1973/.
43. HEIWALL, P.-O., SAUNDERS, N. R., DAHLSTRÖM, A. és HÄGGENDAL J., The effect of local application of vinblastine or colchicine on ACh accumulation in rat sciatic nerve. *Acta Physiol. Scand.*, 96, 478-485 /1976/.
44. HOFFMANN, W. W., STRUPPLER, A., WEINDL, A. és VELKO, F., Neuromuscular transmission with colchicine-treated nerves. *Brain Research*, 49, 207-213, /1973/
45. HÖHFELT, T. és DAHLSTRÖM, A., Effects of two mitosis inhibitors/colchicine and vinblastine/on the distribution and axonal transport of noradrenalin storage particles, studied by fluorescence and electron microscop. *Z. Zellforsch.*, 119, 460-482 /1971/.
46. JAMES, K. A. C., BRAX, J. J., MORGAN, I. G. és AUSTIN, L., The effects of colchicine on the transport of axonal protein in the chicken. *Biochem. J.*, 117, 767-771 /1970/.
47. JUNTUNEN, J., Effects of colchicine and vinblastin on neurotubules of the sciatic nerve and cholin-

- esterases in the developing myoneuronal junction of the rat. Z. Zellforsch., 142, 193-204 /1973/.
48. KARLSON, J.O. és SJÖSTRAND, J., Transport of labelled proteins in the optic nerve and tract of the rabbit. Brain Res., 11, 431-439 /1968/.
49. KARLSSON, J.O., HANSON, H.A. és SJÖSTRAND, J., Effect of colchicin on axonal transport and morphology of retinal ganglion cells. Z. Zellforsch., 115, 265-283 /1971/.
50. KÁSA, P., és CSILLIK, B., Electron microscopic localisation of cholinesterase by a cooper-lead-thiocholine technique. J. Neurochem., 13, 1345-1349 /1966/.
51. KÁSA, P., Acetylcholinesterase transport in the central and peripheral nervous tissue: the role of tubules in the enzyme transport. Nature, 218, 1265-1267 /1968/.
52. KÁSA, P. és CSILLIK, B., AChE synthesis in cholinergic neurons: Electron histochemistry of enzyme translocations. Histochemie, 12, 175-183 /1968/.
53. KÁSA, P., MANN, S.P., KARCSU, S., TOTH, L. és JORDAN, S., Transport of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the rat sciatic nerve: A biochemical and electron histochemical study. J. Neurochem. 21, 431-436 /1973/.
54. KERKUT, G.A., SHAPIRA, A. és WALLER, R.J., The transport of ^{14}C -labelled material from CNS -- muscle along a nerve trunk. Comp. Biochem. Physiol. 23 729-748 /1967/.

55. KIRKPATRICH, J.B., Mikrotubules in brain homogenates.
Science V. 162, 187-188 /1969/.
56. KOENIG, E. és KOELLE, G.B., Acetylcholinesterase regeneration in peripheral nerve after irreversible inactivation. Science 132, 1249-1250 /1960/.
57. KOENIG, E. és KOELLE, G.B., Mode of regeneration of acetylcholinesterase in cholinergic neurons following irreversible inactivations.
J. Neurochem. 8, 169-188 /1961/.
58. KOENIG, E., Synthetic mechanism in the axon-I. Local axonal synthesis of acetylcholinesterase.
J. Neurochem. 12, 343-355 /1965/.
59. KREUTZBERG, G.W. és SCHUBERT, P., Neuronal activity and axonal flow. In Metabolic Regulation and Functional Activity in the Central Nervous System, H. Herken and E. Gennazzani /Eds./, Springer, Berlin, pp, 84-93. /1973/.
60. KREUTZBERG, G.W. és Toth, L., Dendritic secretion: A way for the neuron to communicate with the vasculature. Die Naturwissenschaften 61, 1974 /
61. KREUTZBERG, G.W. és SCHUBERT, P., The cellular dynamics of intraneuronal transport. The Use of Axonal Transport for Studies of Neuronal Connectivity, W.M. Cowan and M. Cuénod /Eds./ Elsevier, Amsterdam pp. 85-109 /1975/.
62. KRISTENSSON, K. és OLSON, Y., Retrograd transport of HRP in transected axons. II. Relations between rate of transfer from the site of injury to the periphery and onset of chromatolysis. J. Neurocytology 4, 653-661 /1975/.

63. LaVAIL,J.H. és LaVAIL,M.M., Retrograd axonal transport in the central neurons. Science,176, 1416-1417 /1972/.
64. LaVAIL,J.H. és LaVAIL,M.M., The retrograde intraaxonal transport of HRP in the chick visual system: A light and electron microscopic study. The Journal of Comparative Neurology 157,303-357 /1974/.
65. LIVETT,B.G.,GEFFEN,L.B. és AUSTIN,L.,Proximo-distal transport of ^{14}C -noradrenalin and protein in symphatetic nerves. J. Neurochem. 15,931-939 /1968/.
66. LOMO,T.,Neurotrophic control of colchicine effects on muscle? Nature 249, 473-474 /1974/.
67. LUBINSKA,L.,NIEWIERKO,S.,ODERFIELD,B. és SZWARCZ,L., The distribution of AChE in peripheral nerves. J. Neurochem. 20, 25-41 /1963/.
68. LUBINSKA,L.,NIEWIERKO,B. és ODERFELD-NOVAK,B., Behaviour of AChE in isolated nerve segments. J. Neurochem. 11, 493-503 /1964/.
69. LUBINSKA,L.,Axoplasmic streaming in regenerating and normal nerve fibres. In: Progress in Brain Research,Vol. 13,M. Singer and J.P.Schade,eds. /Elsevier,Amsterdam/ pp. 1-71.
70. Marx,J.L., Mikrotubules: versatile organelles. Science 181, /1973/.
71. MASSARELLI,R.,SENSENBRENNER,M,EBEL,A. és MANDEL,P., Choline uptake in nerve cell cultures. Neurobiology 4, 293-300 /1974/.

72. MCGREGOR, A.M., KOMIYA, Y., KIDMAN, A.D. és AUSTIN, L.,
The blockage of axoplasmic flow of proteins
by colchicine and cytochalasin A and B.
J. Neurochem. 21, 1059-1066 /1973/.
73. MIANI, N., Proximo-distal movement of phospholipid in
the axoplasm of the intact and regenerating
neurons. In : Mechanism of Neural Regeneration
/Progress in Brain Research, Vol. 13./ M. Singer and
J.P. Schade /Eds./ Elsevier, Amsterdam, pp. 115-126.
/1964/.
74. NIEMIERKO, S. és LUBINSKA, L., Two fractions of axonal
AChE exhibiting different behaviour in severed
nerves. J. Neurochem. 14, 761-769 /1967/.
75. NOOTEN, G.F. és COYLE, J.T., Axonal transport of catech-
olamine synthesizing and metabolising enzymes.
J. Neurochem. 20, 1361-1371 /1973/.
76. OCHS, S. és HOLLINGSWORTH, D., Dependence of fast
axoplasmic transport in nerve on oxidative meta-
bolism. J. Neurochem. 18, 107-114 /1971/.
77. OCHS, S., Energy metabolism and supply of $\sim P$ to the
fast axoplasmic transport mechanism in nerve.
Federation Proc. 33, 1049-1058 /1974/.
78. OCHS, S., Batrachotoxin block of fast axoplasmic trans-
port in mammalian nerve fibers. Science 187,
1087-1089 /1975/.
79. PARTLOW, L.M., ROSS, C.D., MOTWANI, R. és MCDOUGAL, D.B.,
Transport of axonal enzymes in surviving segments
of frog sciatic nerve. J. Gener. Physiology 60,
388-405 /1972/.

80. PETERSON, R.P., HURWITZ, R.M. és LYNDSEY, R., Migration of axonal protein : Absence of a protein cc. gradient and effect of inhibition of protein synthesis. Exp. Brain Res. 4, /1967/.
81. PILAR, G. és LAUDMESSER, L., Axotomy mimicked by localised colchicine application. Science 177, /1972/
82. RAHMAN, H., Different modes of substance flow in the optic tract. Acta Neuropath. Suppl. V. 162-170 /1971/.
83. ROESSMANN, U. és FRIEDE, R.L., Early enzyme histochemical changes following transection of dorsal spinal funiculi. Exp. Neurology 12, 230-237 /1965/
84. ROSENFELD, C., ZACKROFF, R.V. és WEISENBERG, R.C., Magnesium stimulation of calcium binding to tubulin and calcium induced depolymerisation of microtubules. FEBS Letters 65, 144-147 /1976/.
85. SHELANSKI, M.L., Chemistry of the filaments and tubules of brain. J. Histochem. and Cytochem. 21, 529-539 /1973/.
86. SINGER, M., DAVIS, M.H. és ARKOWITZ, E.S., Acetylcholinesterase activity in the regenerating forelimb of the adult newt. J. Embryol. exp. Morph. 8, 98-111 /1960/.
87. SINGER, M. és SALPETER, M.M., Transport of tritium-labelled L-histidine through the Schwann and myelin sheaths into the axon of peripheral nerves Nature 210, 1225-1227 /1966/.
88. SJÖSTRAND, J., Rapid axoplasmic transport of labelled proteins in the vagus and hypoglossal nerves. Exp. Brain Res. 8, 105-102 /1969/.

89. SJÖSTRAND, J., FRIZELL, M. és HASSELGREN, P.-O., Effects of colchicin on axonal transport in peripheral nerves. J. Neurochem. 17, 1563-1570 /1970/.
90. SJÖSTRAND, J., Fast and slow components of axoplasmic transport in the hypoglossal and vagus nerves of the rabbit. Brain Res. 18, 461-467 /1970/.
91. SOMOGYI, P. és CHUBB, I. W., The recovery of acetylcholinesterase activity in the superior cervical ganglion of the rat following its inhibition by diisopropylphosphorofluoridate: a biochemical and cytochemical study. Neurosci. 1, 413-421 /1976/.
92. SRINIVASAN, R., KERZMAR, A. G. és BERNSOHN, J., Rat brain acetylcholinesterase and its isoenzymes after intracerebral administration of DFP. Biochem. Pharmac. 22., 2739-2745 /1976/.
93. STOFCKEL, K., SCHWAB, M. és THOENEN, H., Specificity of retrograd transport of nerve growth factor/NGF/ in sensory neurons : a biochemical and morphological study. Brain Res. 89, 1-14 /1975/.
94. STOFCKEL, K., SCHWAB, M. és THOENEN, H., Comparison between the retrograde axonal transport of NGF and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. Brain Res. 99, 1-16 /1975/.
95. SUSZKIW, J. B., BEACH, R. L. és PILAR, G. R., Choline uptake by cholinergic neuron cell somas. J. Neurochem. 26, 1123-1131 /1976/.
96. SUSZKIW, J. B. és PILAR, G. B., Selective localisation of a high affinity choline uptake system and its role in ACh formation in cholinergic nerve terminals. J. Neurochem. 26, 1133-1138 /1976/.

97. TAYLOR, A.C. és WEISS, P., Demonstration of axonal flow by movement of tritium labelled protein in mature optic nerve fibers. N. A. of Sciences 54, 1521-1527 /1965/.
98. TORNÝOS, SZ., Radicotomia et radicoligatura posterior: a spinális ganglionok topográfiája és műtétén a patkányban. Kísérletes Orvostudomány 24, 379-382 /1972/.
99. TUČEK, S., Transport and changes of activity of choline acetyltransferase in the peripheral strump of an interrupted nerve. Brain Res. 82, 249-261 /1974/.
100. WEISS, P. és HISCOE, H.B., Experiments of the mechanism of nerve growth. J. Exp. Zool. 107, 315-396/1948/
101. WEISS, P. és PILLAI, A., Convektion and fare of mitochondria in nerve fibers: axonal flow as veliche. N.A. of Sciences 54, /1965/.
102. WELSCH, F. és DETTBARN, W.D., Inhibition of cholinesterases of rat diafragm muscle by organophosphates and spontaneous recoveri of enzyme activity in vitro. Biochem. Pharmac. 21, 1030-1049 /1972/.
103. WILSON, L., Action of drugs on microtubules . Life Sci. 17, 303-310 /1975/.
104. WOOTEN, G.F. és COYLE, J.T., Axonal transport of catecholamine synthesizing and metabolising enzymes. J. Neurochim. 20, 1361-1371 /1975/.
105. YAMAMURA, H.I. és SNYDER, S.H., Choline: high-affinity uptake by rat brain synaptosomes. Science 176, 626-628 /1972/.
106. YAMAMURA, H.J., High affinity transport of choline synaptosomes of rat. J. Neurochem. 21, 1355-1364 /1973/



