

Doktori értekezés

IZOLÁLT AGYI HAJSZÁLEREK, MINT KISÉRLETI MODELL

A VÉR-AGY GÁT MECHANIZMUSÁNAK TANULMÁNYOZÁSÁHOZ

Irta

Irina L. Karnyushina

MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézet

1979



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
BEVEZETÉS	1.
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4.
1. <u>A vér-agy gát</u>	4.
1.1. A vér-agy gát anatómiája	4.
1.2. A permeabilitás és az anyagtranszport tipusai	8.
1.3. Az agyi hajszálerekben lokalizált enzimek hisztokémiája	10.
1.4. Biokémiai vizsgálatok agyi kapillárisokban	13.
1.5. Hormon receptorok és ciklikus nukleotidok	16.
1.6. A véráramlás szabályozása a véredényekben	17.
1.7. A hisztamin szerepe az idegi és szekretorikus folyamatokban	19.
2. <u>Az értekezésben ismertetésre kerülő kísérletes munka célkitűzései</u>	22.
3. <u>Módszerek</u>	23.
3.1. Kapillárisok izolálása patkány és tengeri malac agykéregből	23.
3.2. Enzim-meghatározások	25.
3.3. Hisztamin koncentráció meghatározása	27.
3.4. Fény- és elektronmikroszkópos hiszto- kémiai módszerek	28.



4. <u>Eredmények</u>	29.
4.1. Az izolált agyi kapillárisok morfológiai és biokémiai jellemzése	29.
4.2. A hisztamin metabolizmus enzimei és hisztamin koncentráció	34.
4.3. A hisztamin-érzékeny adenil cikláz jellemzése az agyi kapillárisokban	37.
4.4. Guanil cikláz	48.
4.5. Adenozintrifoszfátázok	52.
Az eredmények megvitatása	56.
Következtetések	71.
Az izolált agyi kapillárisokon végzett kutatások néhány gyakorlati vonatkozása	72.
Az értekezés tárgyköréből megjelent dolgozatok és előadások	74.
Köszönetnyilvánítás	77.
Irodalomjegyzék	78.

BEVEZETÉS

Tudományos érdeklődésünk és kutatásaink közép-pontjában a VÉR-AGY GÁT jelensége áll; azoknak a mechanizmusoknak a megfejtésén fáradozunk, amelyek a vérben keringő különböző anyagok számára az agy felé a szelektív permeabilitást biztosítják és fenntartják. A vér-agy gáton, mint szűrőn keresztül nemcsak az agy tápanyagokkal való ellátása valósul meg: ez a rendszer az idegsejtek védelmét is ellátja, pl. a vérbe került toxikus anyagok kizárásával.

Jelen munkában a vér-agy gát funkcióinak kutatása számára egyik lehetséges kísérleti modellt kívánjuk bemutatni: ismertetni az agykéregből izolált és tisztított kapilláris /hajszálér/ frakcióval végzett biokémiai és hisztokémiai kísérleteink eredményeit. Választásunkat az indokolta, hogy a kapillárisok a vér-agy gát funkcióiban az elsődleges, közvetlen szűrő szerepét töltik be a vér és az agysejtek között. Az általunk vizsgált biokémiai jelenségekből - azzal az engedménnyel, hogy a celluláris és szubcelluláris frakcionálás ugyan nem óvja meg a vizsgált szövet fizikai és ezzel együtt fiziológiai épségét, de alapjában véve alkalmas in vitro rendszerrel dolgozunk - következtetéseket kívánunk levonni az agyi kapillárisok endothel sejtjeinek szelektív permeabilitását szabályozó molekuláris mechanizmusokra vonatkozólag.

Vizsgálatainkban különös figyelmet szenteltünk a hisztamin hatásmechanizmusának. Ez az anyag a retikuloendoteliális rendszer egyik ismert aktivátora. A szövetekben, így az agyban is valószínűleg nagy szerepe van a hajszálerek működésében, hiszen köztudott, hogy a gyulladások során, bármi legyen is azok kiváltó oka, az ödémák kifejlődését a hisztamin lokális felhalmozódása előzi meg. Az ödéma kifejlődésének egyik fő oka pedig a hajszálerek permeabilitásának megváltozása illetve károsodása kell legyen.

Vizsgálatainkban felhasználtuk azokat az újabb adatokat, amelyek révén ismertté vált a hisztamin receptorok jelenléte a sejtek membránjaiban, valamint e receptorok funkcionális, regulatív kapcsolata az adenil cikláz rendszerrel. Ez utóbbit pedig igen sok biokémiai folyamat fontos regulátoraként ismerik.

Kísérleteinkben kutattuk a hisztamin receptorok jelenlétét az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben, a különböző típusu hisztamin receptorok arányát, az adenil cikláz, a guanil cikláz és ATPáz rendszereket az izolált agyi kapillárisokban.

Eredményeink egyrészt rámutatnak, hogy az izolált agyi kapillárisok alkalmas kísérleti modellként szolgálhatnak az endothel sejtek permeabilitása molekuláris mechanizmusainak tanulmányozásához, másrészt felhívják a figyelmet azokra a lehetőségekre, amelyeket a vazóaktív anyagok kutatása rejt az "izolált kapilláris" modell felhasználásával: az agyödémák gyógyszeres kezelésének és különböző gyógyszerek agyba való "bejutta-

tásának" lehetőségére. Mindez akkor válhat lehetővé, amikor megtanultuk a vér-agy gát permeabilitás-funkcióit mesterségesen befolyásolni.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A VÉR-AGY GÁT

Az első bizonyítékát annak, hogy a makromolekulák beáramlását a vérből az agyba különleges barrier akadályozza, még a század elején GOLDMANN /1909/ mutatta ki. Kisérleti állataiba intravénásan tripánkéket adott be /ez a festék a vérsavó fehérjéihez kovalensen kapcsolódik/ és ezt a festéket később minden szövetben ki tudta mutatni, csak az agyban nem. Az agysejteket csak intraventrikuláris, tehát az agyüregekbe történő befecskendezéssel lehetett megfesteni.

A szelektív áteresztőképességnek ez a jelensége a vér-agy gát elnevezést kapta. Megfejtésével ma is az élettan egész sor ágazata foglalkozik.

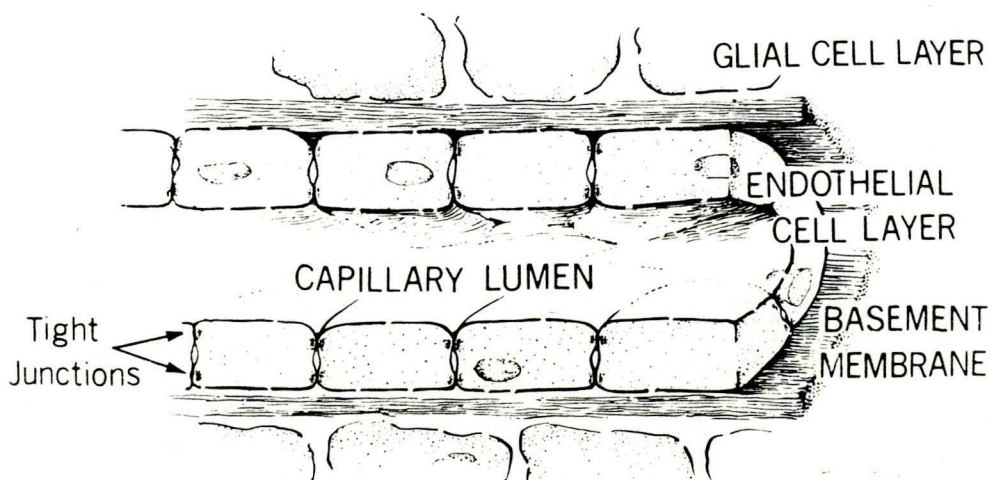
1.1. A vér-agy gát anatómiája

A vér-agy gát jelenti tulajdonképpen a "válaszfalat", amely a központi idegrendszer két fő alkotó elemét: az agyat és a cerebrospinális folyadékot választja el a vértől. Ide sorolhatók az agy-, a plexus choroideus-, a szubarachnoidális üreg- és az azt borító

arachnoid membrán hajszálerei.

A vér-agy gátat alkotó endothel sejtek folyamatosan bélelik a hajszálerek falát, egyik fő jellemzőjük, hogy azok igen szoros kapcsolódásukkal /tight junction/ érintkeznek egymással. A sejtek ilyen szoros kapcsolata gyakorlatilag lehetetlenné teszi az intercelluláris transzportot vagy a passzív diffúziót az anyagok igen széles skálája számára.

Jelen áttekintésben lényegében csak az agyi hajszálerek endothel sejtjeinek a vér-agy gát fenntartásában játszott szerepét kívánjuk tárgyalni. Ezek ugyanis a barrier legszámottevőbb elemei. CRONE /1963/ kiszámította, hogy 1 grammnyi agyszövetben a kapillárisok összfelszíne 240 cm^2 , amelyen keresztül igen aktív oxigén-, széndioxid-, metabolit-, aminosav-, stb. transzport zajlik.



1. ábra Az agyi kapillárisok sematikus felépítése.

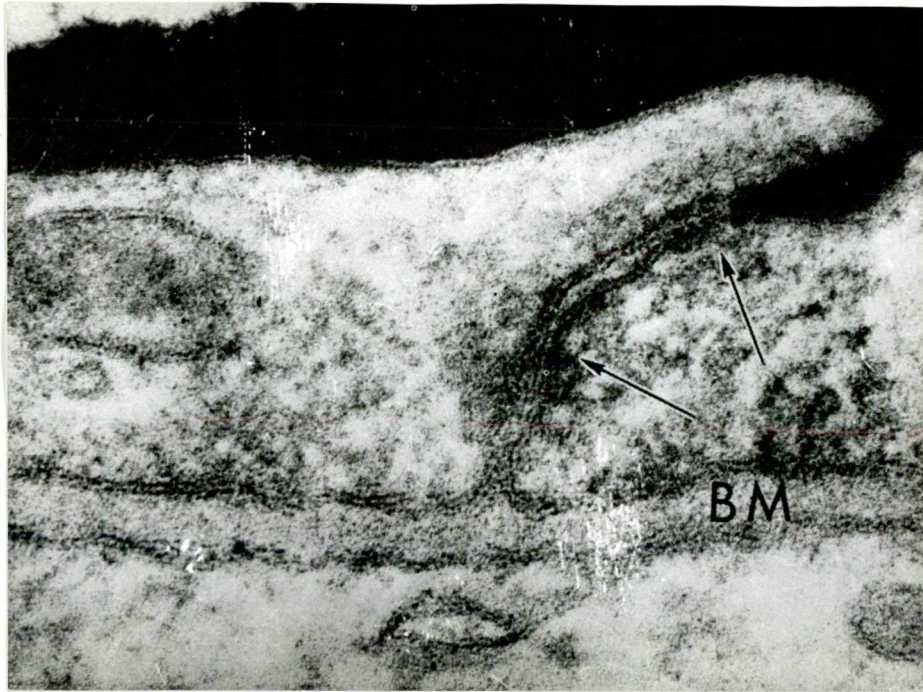
/RAPQPORT, 1976/.

Az 1. ábra az agyi hajszálerek felépítését mutatja. A kapillárisok cilindrikus alakját az endothel sejtek alkotják, amelyek a fent említett szoros kapcsolódásokkal érintkeznek egymással. E szoros kapcsolódások fontos szerepét a vér-agy gátban marker fehérjék /mikroperoxidáz, torna peroxidáz, ferritin, stb./ segítségével demonstrálták /BRIGHTMAN, 1965; REESE, KARNOVSKY, 1967/. E fehérjék diffúzióját sem a sejtek közötti szoros kapcsolódásokon, sem pedig az endothel sejtek citoplazmáján keresztül nem tapasztalták.

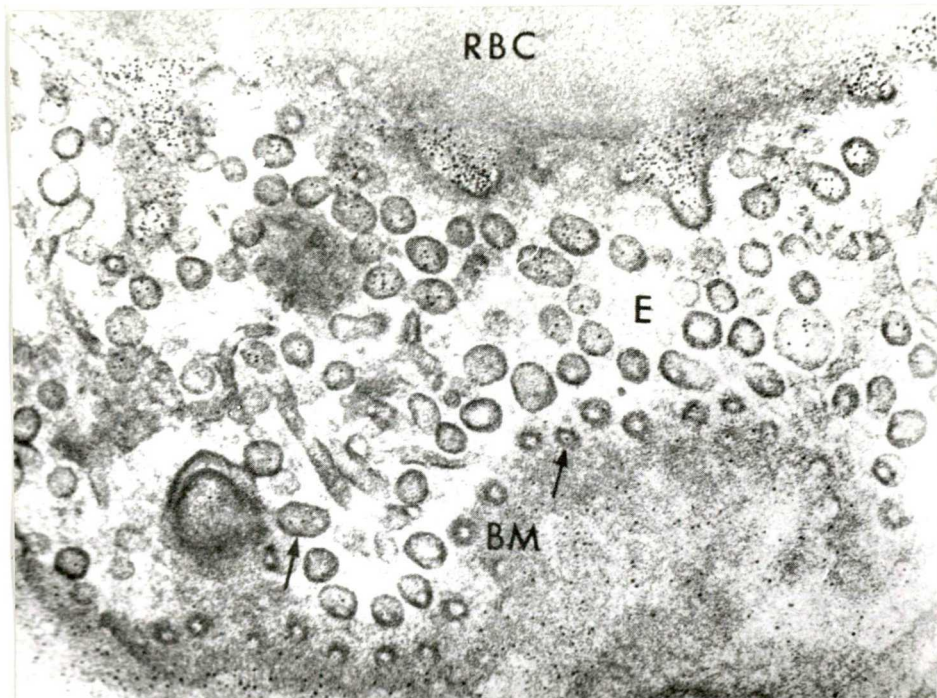
A kapillárisok külső felületét az u.n. bazális membrán borítja. A bazális membrán lényegesen különbözik a citoplazma membránoktól: elektronmikroszkóposan diffúz elektrodenz állagu, amelyben gyakran fibrilláris elemek találhatók. Mindez a bazális membrán meglehetősen komplex makromolekuláris összetételére utal. Hisztokémiai módszerekkel éppen a bazális membránban olyan fontos enzimeket mutattak ki, mint az AChE, ATP-áz, adenil cikláz /JOÓ, 1975/.

A bazális membrán fontos szerepére utalnak azok a kísérletek, amelyekben intraventrikuláris kollagenáz befecskendezéssel /ROBERT, 1977/, vagy enzim inhibitorokkal /elsősorban ATP-áz inhibitorral; JOÓ, 1979a/ megbontották a bazális membrán épségét, s ez a permeabilitás megváltoztatásához vezetett.

A bazális membránt glia talpak veszik körül, amelyek táplálók és védő funkciókon keresztül közvetítenek az idegsejtek felé.



2. ábra Agyi kapillárisról készült elektronmikroszkópos felvétel /175.000 x nagyítás/.
BM - bazális réteg; a nyilak az endothel sejtek szoros kapcsolódásait /tight junction/ mutatják. A fekete tér a kapilláris lumen, amelybe La/OH_3 -t perfundáltak. Látható, hogy az anyag az agyszövetbe nem képes bejutni. /RAPOPORT, 1976/.



3. ábra Szívizom kapilláris endothel sejtjeiről /E/ készült elektronmikroszkópos felvétel. Az agyi kapillárisokkal ellentétben igen intenzív a pinocitotikus vezikulumok /nyilakkal jelölve/ által bonyolított vezikuláris transzport. RBC - vörös vértestek a kapilláris lumenben. /RAPOPORT, 1976/.

A sejtek közötti szoros kapcsolódások mellett az agyi hajszálerek endothel sejtjeinek másik megkülönböztető sajátossága /a perifériás szövetek kapillárisaival ellentétben; 3. ábra/ a pinocitotikus vezikulumok csaknem teljes hiánya /2. ábra; RAPÓPORT, 1976/. Ahhoz, hogy ennek jelentőségét megértsük, általános vonásaiban összefoglaljuk ismereteinket a plazmamembránokon és sejteken keresztül folyó anyagtranszport eddig ismeretes mechanizmusairól.

1.2. A permeabilitás és az anyagtranszport típusai

a/ Passzív transzport /diffúzió/, amely lehet intercelluláris, vagy a membránpórusokon keresztüli anyagáramlás, amelynek mozgató ereje koncentráció- vagy elektrokémiai gradiens;

b/ Aktiv-, vagy energiafüggő transzport, amelyhez /pl. a sejten belüli és kívüli Na^+ , K^+ és Ca^{++} ionkoncentráció fenntartásához/ az energiát az ATP hidrolízise szolgáltatja;

c/ Az "elősegített" /facilitált/ transzport energia-donort nem igényel: a membránokban lokalizált "hordozók" segítségével történik. Ilyen pl. a cukrok transzportja.

A celluláris transzport ezen típusai lényegében a kisebb molekulaméretű és lipid-oldékony anyagokra alakultak ki /ezekkel részletesen pl. RAPÓPORT, /1976/ monográfiájában ismerkedhetünk meg/. Az agyi hajszálerek en-



dotheliális sejtjeiben ugyancsak megfigyelték a fenti 3 transzport típust.*

A makromolekulák, valamint a fenti transzport-típusokhoz "alkalmatlan" kis molekulák számára az u.n. vezikuláris transzport létezik. A vezikulák a citoplazma-membránból fűződnek le; magukkal ragadják a sejten kívüli térből a makromolekulákat és keresztül szállítják azokat a citoplazmán /pinocitózis/.

Az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben a vezikuláris transzport viszont igen alacsony szintű. Ez annál is figyelemreméltóbb, mivel ismeretes, hogy a cerebrospinalis folyadékban mindössze 0,4 % a fehérjekoncentráció a vérhez képest.

Ma még nem tudni, hogy milyen tényezők felelősek a vezikuláris transzport oly alacsony fokáért az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben. Ezzel kapcsolatban viszont meg kell említeni azt - a pinocitózis hiányával valószínűleg szoros kapcsolatban álló - tény, hogy más szövetek hajszálereivel ellentétben, az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben viszonylag kevés a kontraktilis fehérjék mennyisége /BECKER, SHUSTAK, 1972/.

* Az anyagok széles skálája transzportjának kvantitatív vizsgálatakor igen elterjedt Oldendorf módszere, /1970, 1971/ amely szerint a rádióaktív jelzéssel ellátott kérdéses anyag mellett belső mérési standardként triciált vizet használnak. A két "transzportált" rádióaktív jelzés aránya az u.n. agy-felvételi index, /"brain uptake index"/.

1.3. Az agyi hajszálerekben lokalizált enzimek hisztokémiája

Hisztokémiai módszerekkel az agyi kapillárisokban igen sok enzim jelenlétét sikerült ezideig kimutatni. A talán legkifejezettebb hisztokémiai reakciót a nem-specifikus alkálikus foszfataáz, az ATP-áz, a difoszfopiridin-nukleotid diaforáz /LANDERS et al., 1962/, a γ -glutamiltranszpeptidáz /ALBERT et al., 1966/, az acetilcholineszteráz, butirilcholineszteráz /JOÓ, VÁRKONYI, 1969/ és a DOPA-dekarboxiláz /BETLER et al., 1966/ adják, Kevésbé intenzív reakcióval több más enzimet is kimutattak.

Hisztokémiai módszerrel laboratóriumunkban mutatták ki először az adenil cikláz enzimet az agyi hajszálerek plazma-membránjában /a kapilláris-lumen felől/ és bazális membránjában /JOÓ et al., 1975b/.

Biológiai jelentőségüket tekintve a felsorolt enzimek közül néhányat emelnénk ki:

a/ γ -glutamil transzpeptidáz / γ -GT/ - több aminosav, illetve oligopeptid átviteléért felelős enzim, amely pontosabb funkcióját tekintve a γ -glutamil csoportot viszi át a glutationról az aminosavakra vagy peptidekre:

Glutation + aminosav /peptid/ = γ -glutamil-aminosav +
+ ciszteinilglicin

Hisztokémiai vizsgálatok igen intenzív enzimműködést mutattak ki az agyban, főként a choroid plexus-ban és az endothel sejtekben /ALBERT et al., 1966/. A γ -GT-nak

fontos reguláló szerepet tulajdonítanak a vér-agy gátban az aminosavak és bioaktív peptidek transzportjában /ORLOWSKI et al., 1974/.

b/ DOPA-dekarboxiláz - a Parkinson-kór /dopamin hiány/ kezelésében kulcsszerepe van. Ez az enzim a DOPA-t dopaminná alakítja át, amely számára a vér-agy gát /ugyanugy, mint az összes ismert neurotranszmitter számára!/ áthatolhatatlan. A DOPA magas koncentrációban alkalmazható mint gyógyszer dopamin prekursoraként. E tekintetben azonban még hatásosabb, ha a DOPA-val kombinálva az endothel sejtek DOPA-dekarboxilázát gátló anyagokat is adnak.

c/ Adenozintrifoszfátáz

Ez az enzim az ATP-ből anorganikus foszfát csoportot hasít le, ami által a makroerg kötésben rejlő energia felszabadul. Hisztokémiai módszerrel ATP-ázokat elsősorban a kapillárisok bazális membránjában mutattak ki /TORACK and BARNETT, 1964; FIRTH, 1977/. Igen lényeges megfigyelés, hogy az ouabain /specifikus $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -függő ATP-áz gátló/ $10^{-5} - 10^{-3}$ M koncentrációban szinte semmi hatást nem mutat az ATP-áz hisztokémiai reakció kifejlődésére. Ez arra utal, hogy a bazális membránban lokalizált ATP-áz aktivitás valószínűleg dikation / Ca^{++} -, Mg^{++} -/ függő. Az ATP-ázoknak a permeabilitás-barrier fenntartásának szabályozásában fontos szerepe van. $\text{Ca}^{++} - \text{Mg}^{++}$ -ATP-áz inhibitorok hatására ugyanis megfigyelték egyrészt a bazális membrán strukturális elváltozásait /fibrilláris elemek, kesztyűujjszerű kitüremkedések, stb./,

másrészt pedig az endothel sejtek permeabilitásának növekedését a makromolekulák számára /JOÓ, 1979/.

Az ATP-ázok sejten belüli lokalizációja hisztokémiai módszerekkel ezideig nem volt lehetséges, hiszen az ATP, mint szubsztrát, a sejtbe nem vihető be. Néhány szerző azonban jelentős ATP-áz aktivitást mutatott ki a kapilláris endothel sejtek pinocitotikus vezikulumaiban, mégpedig olyan szövetekben, amelyekben igen intenzív a transzcelluláris transzport /BARNETT, 1964/.

d/ Adenil cikláz

Ez az enzim az ATP ciklikus adenzinmonofoszfát-tá /cAMP/ való átalakítását katalizálja. SUTHERLAND már 1962-ben rámutatott arra, hogy a sejtekben zajló biokémiai folyamatok jelentős százaléka a cAMP koncentrációjától függ. Az utóbbi időkben általános a felfogás, miszerint a hormonok és neurotranszmitter anyagok zöme hatását a sejten belüli cAMP koncentráció megváltoztatásán keresztül fejti ki.

Az adenil cikláz lokalizációját a sejtmembránban mind hisztokémiai, mind pedig biokémiai módszerekkel kimutatták /WAGNER et al., 1972; GREENGARD, 1976/. Mai elképzelések szerint mobilis molekuláris kapcsolatot tételeznek fel a membránokban a hormon-receptor "helyek" és az adenil cikláz között /JACOBS and CUATRECASAS, 1977/.

Az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben az adenil

cikláz jelenlétét első ízben laboratóriumunkban mutatták ki /JOÓ et al., 1975a; 1975b/. Az enzimet elsősorban a bazális membránban találták, de aktivitást észleltek kapilláris-lumen oldala felől is a membránban.

Az adenil cikláznak a kapilláris permeabilitás regulációjában játszott szerepére utal az a megfigyelés, miszerint in vivo kísérletben dibutiril cAMP* beadása után egerekben az agyi kapillárisok endotheliális sejteiben pinocitotikus vezikulák jelentek meg /JOÓ, 1972/.

1.4. Biokémiai vizsgálatok agyi kapillárisokon

A hisztokémiai módszer valamely enzim működéséről alapjában véve csak minőségi /"van-nincs"/ információt ad. Ez az információ azonban feltétlenül hasznos és szükséges; többek között lehetővé teszi olyan munkahipotézisek felállítását, amelyek egy adott probléma megoldásában más diszciplínák /biokémia, farmakológia, fiziológia, stb./ módszereinek bevonását irányozzák elő.

Az agyi hajszálerek biokémiai analizise akkor vált lehetővé, amikor rendelkezésre állt olyan módszer is, amelynek segítségével az agyszövet-homogenizátumból a hajszálereket /mint maximálisan dúsított frakciót/ izolálni lehetett. 1973-ban módszert közöltünk az agykéreg-szövet kapillárisban dús frakciójának előállítására.

*A dibutiril ciklikus AMP lipid oldékony cAMP származék; a sejtekbe könnyen inkorporálódik, viszont csak igen lassan metabolizálódik.

sára /JOÓ, KARNYUSHINA, 1973/. Magát a módszert a későbbiekben részletesen ismertetjük /1. Módszertani rész/. Az utóbbi években számos laboratóriumban alkalmazták /és módosították/, s mindmáig igen hasznos eszköz a kapillárisok biokémiai vizsgálatához /BRENDDEL et al., 1974; GOLDSTEIN et al., 1975; MRSULJA et al., 1976; SELIVONDRICK and ROOTS, 1977; KOLBER et al., 1979/.

Brendel és munkatársai /1974/ igen nagy mennyiségű kapillárist izoláltak marha agyból és kimutatták, hogy az endotheliális sejtek sok jelzett szubsztrátumot / ^{14}C -D-glükózt, Na-piruvátot, L-glutaminsavat, oleinsavat, stb./ transzportálni képesek, sőt el is oxidálják azokat $^{14}\text{CO}_2$ -vé. Goldstein és munkatársai /1975, 1977/ patkány agyból származó hajszálerek metabolikus hatását vizsgálták. Többek között kimutatták, hogy a glükóz transzport az endothel sejtekben nem diffúzióval, mint más szövetekben, hanem az u.n. hordozó-transzport által valósul meg. SPATZ és munkatársai /1978/ azt is kimutatták, hogy patkányokban glükóz transzport intenzitása az életkortól is függ. Meg kell említenünk ugyanennek a kutatócsoportnak azokat az érdekes kísérleteit is, amelyeket mongol verseny egér /Mongolian gerbill/ agyából izolált kapillárisok transzport-funkcióinak vizsgálatára végeztek. Ennél az állatfajnál, mivel a két agyfélteke vérellátása többnyire anatómiailag tökéletesen izolált, egyoldalú carotis elzárással igen egyszerűen tanulmányozhatók voltak az izolált kapillárisok

valamint a szinaptoszóma frakció* posztischemiás elváltozásai /MICIC et al., 1978/. Az ugyanazon állatból nyert kontrollal szemben azt tapasztalták, hogy az artéria elzárása után mintegy 6 perccel erősen csökken a kapillárisokban a 2-dezoxi-D-glükóz felvétel, viszont a carotis-ligatura feloldása után kb. 1 órás regenerációs periódus elteltével jelentékenyen megemelkedett /SPATZ et al., 1977, 1978/.

Ezek a munkák, egyéb érdemeik mellett, arra is rámutatnak, hogy az izolált agyikapillárisok a biokémiai módszerekkel végzett analízis számára alkalmas objektumok, bennük in vitro körülmények között is hosszú ideig fennmarad /és tanulmányozható/ a metabolikus aktivitás és számos regulációs folyamat.

Az izolált agyi kapillárisok membránján keresztül folyó anyagranszporttal foglalkozó munkák közül kiemeljük BETZ és GOLDSTEIN nemrégiben megjelent közleményét /1978/, amelyben ismertetik azokat a megkülönböztető jellegeket, amelyeket a kapillárisok lumen felőli membránja és az agyszövet, illetve bazális réteg felőli membránja között fedeztek fel. Kimutatták az endothel sejtek membránjának "polaritását" a kísérletben /radioaktíve jelzett/ semleges aminosavak transzportjában. Mindez irányított és szigorúan szelektív transzport mechanizmusra utal.

*Az idegvégződéseket az agyszövetből izolálni lehet; ezek membránja a leszakadás helyén összezárul, s így szinaptoszómaként preparálhatók.

1.5. Hormon receptorok és ciklikus nukleotidok

Az utóbbi években igen intenzíven kutatják azokat a sejtfunkciókat, amelyek finom szabályozása az adenil cikláz, illetve guanil cikláz enzimek aktivitásán keresztül valósul meg. E szabályozási mód gyakran valamilyen hormonválasz sejten belüli történéseivel kapcsolatosak. Érthető tehát, miért van szükség azokra a vizsgálatokra, amelyek a hormon receptorok kimutatására és különböző típusaik lehetőség szerint mind teljesebb analizisére irányulnak. A különböző receptorokat néhány szerző izolált agyi hajszálér frakcióban is tanulmányozni kezdte. A receptorok jelenlétét ugyan mindmáig csak közvetett uton, az adenil cikláz rendszer aktivitásán keresztül többnyire farmakológiai tesztanyagok - hormon agonisták, illetve antagonisták - segítségével vizsgálják.

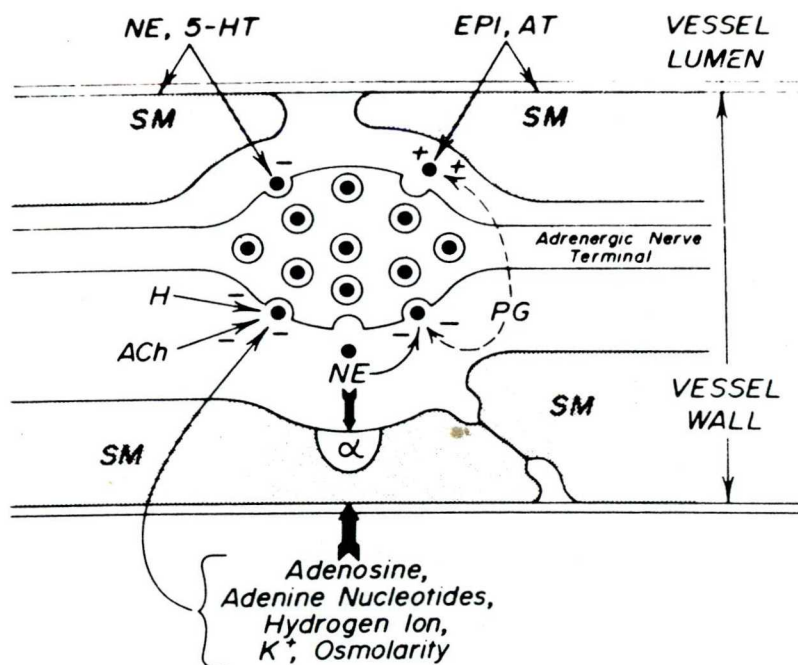
Nemrégiben közöltek néhány jelentős eredményt a β -adrenerg receptorok kimutatásáról és alapos biokémiai analiziséről agyi kapillárisokban /PALMER, 1978; NATHANSON és GLASER, 1979; HERBST, 1979/.

A kapillárisokban ezenkívül adenzin receptorokat is leírtak /HUANG, DRUMMOND, 1979/, továbbá prosztaglandin /GERRISTEN et al., 1979/ és hisztamin receptorok jelenlétét is kimutatták /JOÓ et al., 1975a/.

Ezek, és más egyéb hormonok a véredények keresztmetszet-változásainak regulációjában játszanak szerepet.

1.6. A véráramlás szabályozása a véredényekben

Perifériás erekkel végzett kísérletekben kimutatták, hogy a vérkeringés és vaszkuláris permeabilitás szabályozása a szimpatikus idegvégződések által és humorális bioaktív anyagok segítségével történik. Az 1977-ben Chicago-ban rendezett a véredények sima izomzatának aktivitás-változásaival, az adrenerg transzmitterek lokális regulációs szerepével foglalkozó szimpózium anyagából általánosítani lehet /4. ábra/ több hormon /hisztamin /H/, adenzin, szerotonin /5-HT/, acetilcholin /ACh/, norepinephrin /NE/, poszttaglandinok /PG/, stb./ szerepét a vérkeringés szabályozásában.



4. ábra A véredények sima izomzatának adrenerg innervációja. Sematikus kép SHEPHERD /1978/ nyomán.
SM - sima izom; H - hisztamin; ACh - acetilcholin; NE - norepinephrin; 5-HT - 5-Hidroxitriptamin /szerotonin/; PG - proszttaglandin; AT - angiotenzin; EPI - epinephrin. A "-" jelek a norepinephrin felszabadulás gátlását, a "+" jelek annak stimulációját demonstrálják.

A felsorolt hormonok többsége meghatározott típusu receptor-rendszereiken keresztül a norepinephrin felszabadulását gátolja, és ily módon vasodilatátor hatású. /BEVAN, 1978; MALIK, 1978; McGRATH and SHEPHERD, 1978; SHEPHERD et al., 1978; VERHAEGHE et al., 1978; ZIMMERMAN, 1978/.

A véráram /és vérnyomás/ szabályozása főbb vonásaiban tehát ismert. Vannak adatok az agy véredényei innervációját illetően is /HARTMANN, 1973; EDVINSSON et al., 1976/. Rhesus majmokon /amelyek ganglion cervicalis-át eltávolították/ végzett kísérletekben jelzett viz áramoltatással kimutatták, hogy a locus coeruleus noradrenerg idegtestjeinek carbachol-lal való ingerlésekor a véráram - az agyi féltekék felől a vérbe - hirtelen csökken és a $H_2^{15}O$ számára az erek permeabilitása felfokozódik /RAICHLE et al., 1975/.

Annak ellenére, hogy az adrenerg innerváció jelentősége az agyi véredények működésének szabályozásában általában tisztázottnak látszik, a permeabilitás szabályozása magukban az endothel sejtekben, mint a vér-agy gát fenntartásáért felelős legfontosabb elemekben, sok tekintetben egyáltalán nem ismert. Az agyi hajszálerek vizsgálata tehát remélhetőleg valamivel közelebb visz a vér-agy gát jelenségeinek megértéséhez.

Kísérleteinkben, amelyeket a későbbiekben részletesen ismertetni fogunk, az egyik fontos és jól ismert bioaktív anyag, a hisztamin szerepével foglalkozunk az agyi kapillárisok regulációs mechanizmusainak tanulmányozása kapcsán. Erről az anyagról /"hormonról"/ ismert, hogy igen sok élettani jelenség funkcionális



sérője.

1.7. A hisztamin szerepe az idegi és szekretorikus folyamatokban

A hisztamin szerepe a gyulladásos folyamatokban /legyen azok kiváltó oka akár mechanikai szövetkárosodás, akár immunreakció/ a véráramlás drasztikus változásai-val, az érintett szövetek hajszálerei permeabilitásának változásaival kapcsolatban keresendő, hiszen ezeket a jelenségeket általában a hisztamin lokális koncentrációjának megnövekedése kíséri.

Emlősökben a hisztamin-szintézis többnyire igen alacsony szintű. A hisztamin legnagyobb része mint a bélbaktériumok szintetikus tevékenységének eredménye, a bélfalon keresztül szivódik fel. A véráramból azután elsősorban a hízósejtekben és vér alakos elemeiben halmozódik fel; ott speciális granulákban raktározódik, gyakran szerotoninnal vagy heparinnal komplexben. Különböző extra behatásokra a hisztamin a vérbe áramlik és lokális vagy általános koncentráció növekedése a vérerek sima izomzatának hirtelen ernyedéséhez, az endothel sejtek membránpermeabilitásának fokozódásához vezet. A hisztamin hatását a perifériás szövetekben igen részletesen tanulmányozták /OWEN, 1977/. Kimutatták, hogy a hisztamin bioregulációs hatását két receptortípuson keresztül fejti ki, amelyeket feltételelesen H_1 és H_2 receptoroknak neveztek el. A farmakológusok több specifikus H_1 - illetve H_2 agonista és antagonistá hatásu anyagot találtak,

illetve szintetizáltak /BLACK et al., 1972; BRIMBLCOMBE et al., 1975; JOHNSON, MIZOGUCHI, 1977/. Kimutatták, hogy például a túlélő vastagbél /ileum/ szervpreparátum kizárólag H_1 típusu hisztamin receptorokat tartalmaz, a gyomormukóza szekréciós funkciója pedig tipikusan H_2 receptor-specifikusnak bizonyult. A jól elemzett farmakológiai hisztamin analógok segítségével bármely szövetben meg lehet határozni a H_1 illetve H_2 hisztamin receptorok jelenlétét, arányát.

Az utóbbi években a hisztamin mint lehetséges neurotranszmitter is magára vonta a figyelmet /SCHWARTZ, 1976; SNYDER, TAYLOR, 1972; GREEN et al., 1978/. Kimutatták, hogy az agyszövetben hisztamin szintézis folyik /GARBARG et al., 1974/ és a hisztamin megoszlása az agysejtekben nem egyenletes /TAYLOR, SNYDER, 1972/. Igen intenzív biokémiai és elektrofiziológiai kutatás folyik az u.n. hisztaminerg traktusok topográfiájára és az agyi hisztamin-érzékeny adenil cikláz jellemzésére vonatkozólag /MEGSTRAND et al., 1976; BARBIN et al., 1976; SCHWARTZ, 1977; SCHWARTZ et al., 1977; KANOF et al., 1977/. Meglehetősen újak azok az adatok is, amelyek a triciklikus antidepresszáns anyagoknak a hisztamin-érzékeny adenilát cikláz enzimet gátló hatását bizonyítják, s ezzel, mintegy közvetve, a hisztaminnak a depresszióban, az emberi pszichikum károsodásában játszott szerepére is utalnak /KANOF and GREENGARD, 1978; PERSINGER, 1977/.

Meg kell jegyeznünk, hogy a hisztamin agyi hatásmechanizmusait magyarázó jelentősebb hipotézisek általában agyszövet /legtöbbször hippocampus-/ homogenizátumokon végzett kísérletek eredményei alapján születtek; leggyak-

rabban hisztamin agonistáknak és antagonistáknak a hisztamin-érzékeny adenil ciklázra gyakorolt hatása detektálásán alapulnak. Több kísérletben pedig agyszövet vékonymetszeteket használtak. Ennek alapján érthető kell legyen, milyen jelentőséggel bír a hisztamin-érzékeny adenil cikláz vizsgálata izolált agyi hajszálerekben, hiszen minden grammnyi agyszövet, legyen az homogenizátum, vagy metszet, mintegy 240 cm^2 összfelületű kapillárist tartalmaz. Az izolált kapillárisokon végzett vizsgálatok tehát kétségtelenül figyelmet érdemelnek az agyszöveten /homogenizátumon/ kapott eredmények értelmezésekor.

2. AZ ÉRTEKEZÉSBEN ISMERTETÉSRE KERÜLŐ KISÉRLETES MUNKA CÉLKITÜZÉSEI

Felhasználva az agyi kapillárisok magas fokú tisztítására általunk kidolgozott módszert, tanulmányozni kívántuk :

1. a hisztamin-érzékeny adenil cikláz jelenlétét az agyi kapillárisokban, az idegszövetben azonos célból alkalmazott módszerekkel;
2. részletesen jellemezni a hisztaminerg rendszert /amely magában foglalja a hisztamin megoszlásának, metabolizmusa enzimeinek vizsgálatát/;
3. megállapítani a hisztamin receptorok molekuláris farmakológiai tulajdonságait, meghatározni a H_1 és H_2 receptorok arányát a kapillárisok endothel sejtjeiben ismert hisztamin receptor agonisták és antagonisták felhasználásával;
4. vizsgálni a hisztamin hatását olyan regulátor enzimekre, mint a guanilát cikláz- és a mono, illetve bivalens kation-függő ATP-ázok aktivitására.

3. MÓDSZEREK

3.1. Kapillárisok izolálása patkány és tengeri malac agykéregből

Az általunk 1973-ban kidolgozott módszer lényege az, hogy a feldarabolt agyszövetet meghatározott pórusnagyságu nylonszűrőn átnyomjuk és az így nyert homogenizátumból /amelyben a hajszálerek megőrzik strukturális épségüket/ differenciál-és sűrűség-gradiens centrifugálással a kapillárisokat szeparáljuk. A módszer kidolgozásában SELLINGER és munkatársai /1971/ tapasztalatát vettük át.

Homogenizálás

Egy kísérletben rendszerint 10 patkány vagy 5 tengeri malac agykérgét használtuk fel. Dekapitálás előtt az éterrel elaltatott állatok agyát a szíven keresztül 150 illetve 250 ml 0,9 %-os NaCl oldattal perfundáltuk. A homogenizálás előtt az agykérget a lehető legalaposabban megtisztítottuk a pia mater-től és myelintől. Tekintve, hogy a kapillárisokat az agyban tömegesen veszik körül asztrocita végtalpak, azt elősegítendő, hogy ezek a gliavégződés megduzzadjanak s így könnyebben leváljanak, a homogenizáláshoz 0,25 M szaharóz oldatot - 50 mM tris-HCl; pH 7,2, 5 mM EDTA - használtunk. Az EDTA jelenléte /lekötve a Ca^{++} ionokat/ szintén a sejtkontaktusok fellazítását szolgálja.

6-8 g agykéreg szövetet borotvapengével feldaraboltunk és a szaharóz oldatban fecskendőbe töltöttük. Ebből az anyagot 250 μ m pórusnagyságu nylonszítán /TOBLER, ERNST and TRALER Inc., Elmesford, N.Y. USA/ lassan átnyomtuk, majd a műveletet kétszer megismételtük. A második szűrőssorozatot hasonlóképpen végeztük 125 μ m pórusnagyságu nylonszűrővel. A homogenizálás és szűrés műveletét 4°C-on, hidegszobában végeztük. A szűrt homogenizátumot mintegy 10-szeresen higitottuk 0,25 M szaharóz /Tris, EDTA/ pufferrel, s további centrifugálással dolgoztuk fel.

Centrifugálás

Két alacsony fordulathál végzett előcentrifugálás /1500 g, 10 perc/ után, amelyek során csapadékbán csak a nagyobb méretű elemek /kapillárisok, glia sejtek, sejttöredékek, neuron perikarya, stb./ ülnek le. A csapadékot 3 térfogatnyi 0,25 M szaharóz pufferben szuszpendáltuk fel és 8 ml-ként óvatosan 3-lépcsős szaharóz gradiensre /1,5 M, 1,3 M, 1,0 M/ rétegeztük rá. Az anyagot 20.000 ford/perc-nél 30 percig centrifugáltuk Beckman L2 65 K ultracentrifugában SW 25.1 rotorban. Az összesen 4 rétegnek megfelelő frakciókat külön-külön gyűjtöttük össze. A kapilláris frakció a centrifugacső aljára ülepedik ki.

A kapillárisok preparálása mintegy 2 és fél órányi munkát jelent, és a kapilláris frakcióban kísérletenként mintegy 3-4 mg fehérjét nyertünk /LOWRY et al., 1951; módszerrel meghatározva/.

3.2. Enzim-meghatározások

3.2.1. Alkálikus foszfatáz/EC 3.1.3.1./

Az enzimaktivitás meghatározását BESSEY módszere /1946/ szerint végeztük, enzimszubsztrátként p-nitro-fenilfoszfátot alkalmaztunk, a reakcióterméket spektrofotometrikusan határoztuk meg.

3.2.2. γ -glutamil-transzpeptidáz / γ -GT/ /EC 2.3.2.4./

Meghatározására SZÁSZ /1969/ kinetikus módszerét használtuk. Az alkalmazott szubsztrátum γ -glutamil-p-nitroanilid volt. 0,1 ml vizsgálandó mintához, amelyet /akár agykéreg homogenizátumot, akár kapilláris frakciót/ az enzim-mérés előtt ultrahanggal kezeltünk, 1 ml szubsztrát-puffer elegyet adtunk: 4,4 mM γ -glutamil-p-nitroanilid; 50 mM Tris/HCl, pH 8,6, 22 mM glicilglicin; 11 mM $MgCl_2$. Az inkubálás során /szobahőmérsékleten/ percenként 405 nm-nél leolvastuk az extinkciót. A reakció lineáris; kiértékelése az eredeti közleményben javasolt módon történt.

3.2.3.-4. Az L-hisztidin dekarboxiláz /EC 4.1.1.22/

és hisztamin-N-metiltranszferáz

/EC 2.1.1.8/ aktivitást BARBIN és munkatársai /1976/ és TAYLOR és SNYDER /1972/ által leírt módszerekkel mértük.

Hisztidin dekarboxiláz. Enzimszubsztrátként triciált hisztidint használtunk, amelyet közvetlenül a kísérletek előtt igen alaposan tisztítottunk.

A reakció során szintetizált ^3H -hisztamint amberlit oszlopkromatográfiával választottuk el. A minták radioaktivitását toluol alapú szcintillációs keverékben mértük.

Hisztamin-N-metiltranszferáz. A meghatározásához alkalmazott enzim-izotóp mikromódszer szerint in vitro metildonorként ^{14}C -S-adenozil-L-metionint használtunk. Az inkubációs elegyből a metilhisztamint lugositott közegben chloroformmal extraháltuk, tovább tisztítottuk, majd radioaktivitását mértük.

3.2.5. Adenil cikláz /EC 4.6.1.1./

Meghatározásához az agykéreg szuszpenziót vagy a kapilláris frakciót teflon-üveg homogenizátorban 2 mM Tris/maleát, 2 mM EDTA pufferben /pH 7,8/ homogenizáltuk. Az adenil cikláz aktivitást HEGSTRAND et al., /1976/ módszerével mértük. Az inkubációs elegyek általában 30-50 μg fehérjét tartalmaztak. A mintákban az inkubáció során képződött cAMP mennyiségét BROWN és munkatársai /1971/ u.n. protein-kináz-kötési módszerével határoztuk meg. A protein kinázt nyúl izomból magunk preparáltuk.

3.2.6. Guanil cikláz /EC 4.6.1.2./ Meghatározását ARNOLD és munkatársai /1977/ módszerével végeztük. A kapillárisokból készített homogenizátumot 200 μl végtérfogatu inkubációs elegyben /amely 4 mM Mn^{++} -t és enzimszubsztrátként GTP-t tartalmazott/ 10 percen keresztül inkubáltuk 37°C hőmérsékleten. Foszfodieszteráz inhibitorként 1 mM isobutylmethylxantint használtunk.

3.2.7. Adenozin-trifoszfátázok /ATP-ázok/. Az ATP-ázok aktivitását kisebb változtatásokkal SUN és SAMORAJSKI /1970/ módszere szerint mértük. A különböző inkubációs elegyek azokat a különböző monovalens illetve bivalens fémionokat / Na^+ , K^+ , illetve Mg^{++} , vagy Mg^{++} és Ca^{++} / tartalmazták, amelyek az egyes ionfüggő ATP-ázok aktivitásához szükségesek, s emellett a megfelelő mintákban EGTA /elsősorban a Ca^{++} ionok megkötésére/ volt jelen. A mintákat 37°C -on 30 percig inkubáltuk, a reakciót triklórecetsav hozzáadásával állítottuk le, majd lecentrifugáltuk és a felülúszóban meghatároztuk a reakció során felszabaduló inorganikus foszfát mennyiségét RATHBUN és BETLACH /1968/ szerint.

3.3. Hisztamin koncentráció meghatározása

Az agykéreg homogenizátumot vagy a kapillárisban gazdag frakciót ultrahang kezeléssel roncsoltuk, majd 10 percig 95°C -on melegítettük. Ezt követően 10.000 g-vel /2 perc alatt/ lecentrifugáltuk és a felülúszóban TAYLOR és SNYDER /1972/ radioenzimatikus mikromódszerével meghatároztuk a hisztamin szintet.

E célra bárány agyból tisztított hisztamin-N-metiltranszferáz enzimet használtunk /BROWN et al., 1959/. A módszerben tulajdonképpen az S-adenozil-metionin izotóppal jelzett metilcsoportját visszük át in vitro a szöveti hisztamin molekulákra, s a keletkezett ^3H -metilhisztamint a fentebb leírt módon határoztuk meg.

3.4. Fény- és elektronmikroszkópos hisztokémiai módszerek

Az éterrel anesztetizált patkányokat paraformaldehid oldattal /Na-kakodiláttal pufferelve; pH 7,4/ perfundáltuk, azokból Vibratom^R segítségével vékony metszeteket készítettünk. A metszeteket az adenil cikláz, illetve guanil cikláz specifikus szubsztrátumait /5'-adenilil-, illetve 5'-guanilil-imidodifoszfátot/ tartalmazó oldatban inkubáltuk /REIK et al., 1970; SAITO és KEINO, 1976/. Fénymikroszkópos vizsgálat számára az inkubációs végterméket Na-szulfidot tartalmazó pufferben "hívtuk elő". Az elektronmikroszkópos megfigyelés számára pedig a metszeteket s-collidinnel pufferelt osmium tetraoxid oldatban utófixáltuk /60 perc/, majd Durcupanba ágyasztuk be. A beágyazott metszeteket Reichert OMU-2 ultramikrotommal szeleteltük, ólomcitrátos festés után, vagy anélkül, JEOL 100B elektronmikroszkóppal vizsgáltuk /REYNOLDS, 1963/. A kontroll mintákat szubsztrátumok nélkül inkubáltuk.

Az izolált kapilláris frakció fénymikroszkópos vizsgálata számára a preparátumot Karnovsky oldatban immerziós fixálásnak vetettük alá, s a nem-specifikus alkalikus foszfatáz aktivitását, amelyet az endothel sejtek markereként ismernek el, Gömöri-féle festéssel /1939/ vizualizáltuk. A kapilláris frakciót más esetben toluidin-kékkel festettük, vagy fázis-kontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. AZ IZOLÁLT AGYI KAPILLÁRISOK MORFOLÓGIAI ÉS BIOKÉMIAI JELLEMZÉSE

A kapilláris frakció fénymikroszkópos vizsgálata alapján /5. ábra/ megállapíthatjuk, hogy az izolált kapillárisok strukturája ép, felületük tiszta, idegsejtektől vagy idegsejt maradványoktól mentes. A toluidin-kék festéssel, amit a preparátumok jobb vizualizálása érdekében alkalmaztunk, metakromáziát mutató sejteket gyakorlatilag nem lehetett kimutatni, ami arra utal, hogy a kapilláris frakció hízósejteket sem tartalmaz /IBRAHIM, 1974/. A kapilláris frakció szennyezéseként jobbára a néhány nagyobb véreret és a kapillárisokkal együtt ülepedő, a preparálás során elkülönült sejtmagot tekinthetjük.

A 6. ábra a kapilláris frakció elektronmikroszkópos felvételét mutatja. A nagyfoku nagyítással készült felvételen látható, hogy a kapillárisok endothel sejtjei megőrizték épségüket, a bazális membrán is sértetlen. Amiben az in situ /agymetszetekben vizsgált/ kapillárisokhoz képest szembetűnő változást tapasztaltunk az izolált kapillárisok citoplazmájában; a pinocitotikus vezikulumok megnövekedett mennyi-



5. ábra Az agykéregből izolált kapilláris frakció fény-
mikroszkópos felvétele toluidin-kék festés
után.

A kapillárisok mellett néhány nagyobb átmérőjű
arteriola és venula látható.

a - 200 x nagyítással készült felvétel;

b - 750 x nagyítással készült felvétel.





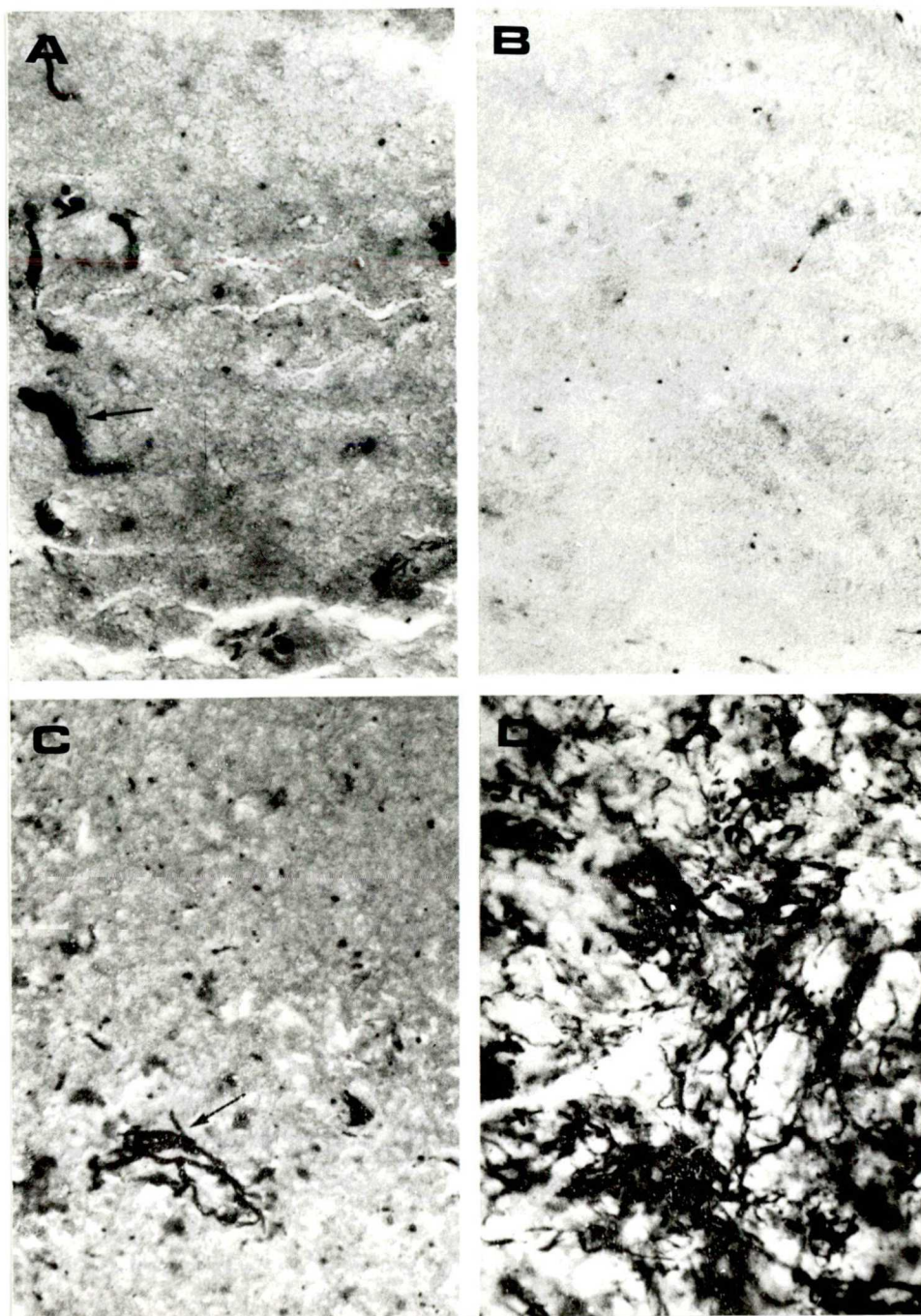
6. ábra A kapilláris frakcióból készített metszet elektronmikroszkópos képe /30.000 x nagyítás/.
L - kapilláris lumen; PV - pinocitotikus vezikulum; BM - bazális réteg; M - mitochondrium.

sége volt.

A kapilláris frakció morfometriai analizise /WEIBEL et al., 1966; módszere szerint; 37 véletlenszerűen választott 10.000-szeres nagyítással készült felvétel alapján/ a következő eredményeket adta: a frakció 98,23 %-át a kapillárisok alkotják; egyéb struktúrák jelentéktelen mennyiségben fordultak elő: sejtmembrán töredékek, 1,16 %; szinaptoszómák: 0,45 %; ismeretlen természetű struktúrák: 0,16 %.

A kapilláris preparátum tisztaságát néhány olyan enzim aktivitásának jelentős feldusulása is jellemzi, amelyeket az endothel sejtek markereiként ismernek, s mint ilyen, az izolált agyi kapillárisokban más szerzők is leírtak /GOLDSTEIN et al., 1975; SESSA et al., 1976/. Az 1 Táblázaton feltüntettük az alkális foszfátáz és a γ -glutamil transzpeptidáz specifikus aktivitásait, amelyeket az izolált kapillárisokban a kiindulási agykéreg homogenizátumhoz képest 68-szoros, illetve 22-szeres mértékűnek találtunk.

A 7. ábra az alkális foszfátáz aktivitás hisztokémiai lokalizálását demonstrálja az agyszövet homogenizátumból nyert frakciókban. A 7/A a lecentrifugált kiinduló homogenizátumból készített metszet alkális foszfátáz pozitív struktúráit mutatja, míg a B, C és D ábrarészek a sűrűségi gradiens centrifugálással elválasztott frakciók ugyanezen reakcióit demonstrálja. Az alkális foszfátáz reakció lényegében a D frakcióban /kapillárisok/ koncentrálódott. Tekintve, hogy az enzim az endothel típusu sejtek markere, az alkáli-



7. ábra Az alkalikus foszfatáz hisztokémiai kimutatása az agykéreg homogenizátum egyes frakcióiban.
A - kiinduló szövethomogenizátum; B, C - a sűrűséggradiens egyes frakciói. A mélyebbre ülepedő strukturákban néhány alkálikus foszfatáz-reakciót mutató kapilláris található /nyíl/; D - a kapilláris frakció igen intenzív reakciót ad /120 x nagyítás/.

kus foszfatáz reakció hisztokémiai vizsgálata is a kapillárisok nagyfoku tisztítását szemlélteti.

4.2. A HISZTAMIN METABOLIZMUS ENZIMEI ÉS HISZTAMIN KONCENTRÁCIÓ

Az agykéregből izolált kapilláris frakcióban a hisztamint szintetizáló enzimet, az L-hisztidin dekarboxilázt, igen alacsony, de még éppen mérhető aktivitással mutattuk ki /1. Táblázat/. Az agy legfontosabb hisztamint katabolizáló enzimének, a hisztamin-N-metiltranszferáznak aktivitását a kapilláris frakcióban alacsonyabbnak találtuk, mint a kiinduló homogenizátumban. A hisztamin koncentrációját a kapillárisokban /mg fehérjére számítva/ 2,7-szer magasabbnak mértük, s a kapillárisok hisztamin tartalma számításaink szerint az agy össz-hisztamin tartalmának mintegy 2 %-át teszi ki. A 2. Táblázat az agykéregből nyert különböző frakciókban mért hisztamin koncentrációt tünteti fel, összehasonlítva a homogenizátumhoz a centrifugálási procedurákat megelőzően hozzáadott ³H-hisztamin megoszlásával. A hisztamin megoszlásának ilyen "kettős" vizsgálata a preparálás során elképzelhető müterméket előidéző hisztamin "átcsoportosulást" zárja ki.

1. TÁBLÁZAT

TENGERI MALAC AGYKÉREGBŐL PREPARÁLT KAPILLÁRIS FRAKCIÓ BIOKÉMIAI JELLEMZÉSE

ENZIM MARKEREK	KIINDULÓ HOMOGENÁTUM	KAPILLÁRIS FRAKCIÓ	DUSULÁSI FAKTOR
KAPILLÁRIS SEJTEK MARKEREI			
Alkálikus foszfatáz (4) (nmole · mg ⁻¹ · min ⁻¹)	0,095 ± 0,014	6,47 ± 0,62	1 : 68
γ-glutamil transzpeptidáz (9) (nmole · mg ⁻¹ · min ⁻¹)	2,15 ± 0,45	47,5 ± 4,6	1 : 22
HISZTAMINERG RENDSZER MARKEREI			
L-hisztidin dekarboxiláz (5) (dpm · μg ⁻¹ · h ⁻¹)	5,4 ± 1,4	0,93 ± 0,2	1 : 0,17
Hisztamin-N-metiltranszferáz (6) (pmole · μg ⁻¹ · h ⁻¹)	3,3 ± 0,3	1,82 ± 0,07	1 : 0,55
Hisztamin koncentráció (3) (ng · mg ⁻¹)	0,25 ± 0,03	0,68 ± 0,10	1 : 2,7
Adenil cikláz (6) (pmole ciklikus AMP · mg ⁻¹ · min ⁻¹)			
Alapaktivitás	22,7 ± 4,4	63,2 ± 8,0	1 : 2,8
+ 10 ⁻⁴ M hisztamin	72,9 ± 15,1	117,7 ± 22,8	
stimuláció (%)	318 ± 53	185 ± 20	

A zárójelekben a mérések számát tüntettük fel.

2. TÁBLÁZAT

HISZTAMIN KONCENTRÁCIÓ ÉS ^3H -HISZTAMIN MEGOSZLÁS TENGERI MALAC AGYKÉREG FRAKCIÓIBAN

	ng/frakció	%	cpm/frakció	%
HOMOGENÁTUM	$133,5 \pm 7,5$	100	Exp.1. $8,1 \times 10^6$ Exp.2. $8,07 \times 10^6$	100
1000xg csapadék (gradiens előtt)	$67,0 \pm 6,0$	50	Exp.1. $0,76 \times 10^6$ Exp.2. $0,33 \times 10^6$	(átlag) 13,46
KAPILLÁRIS FRAKCIÓ	$2,5 \pm 0,3$	1,9	Exp.1. 4830 Exp.2. 4900	0,06

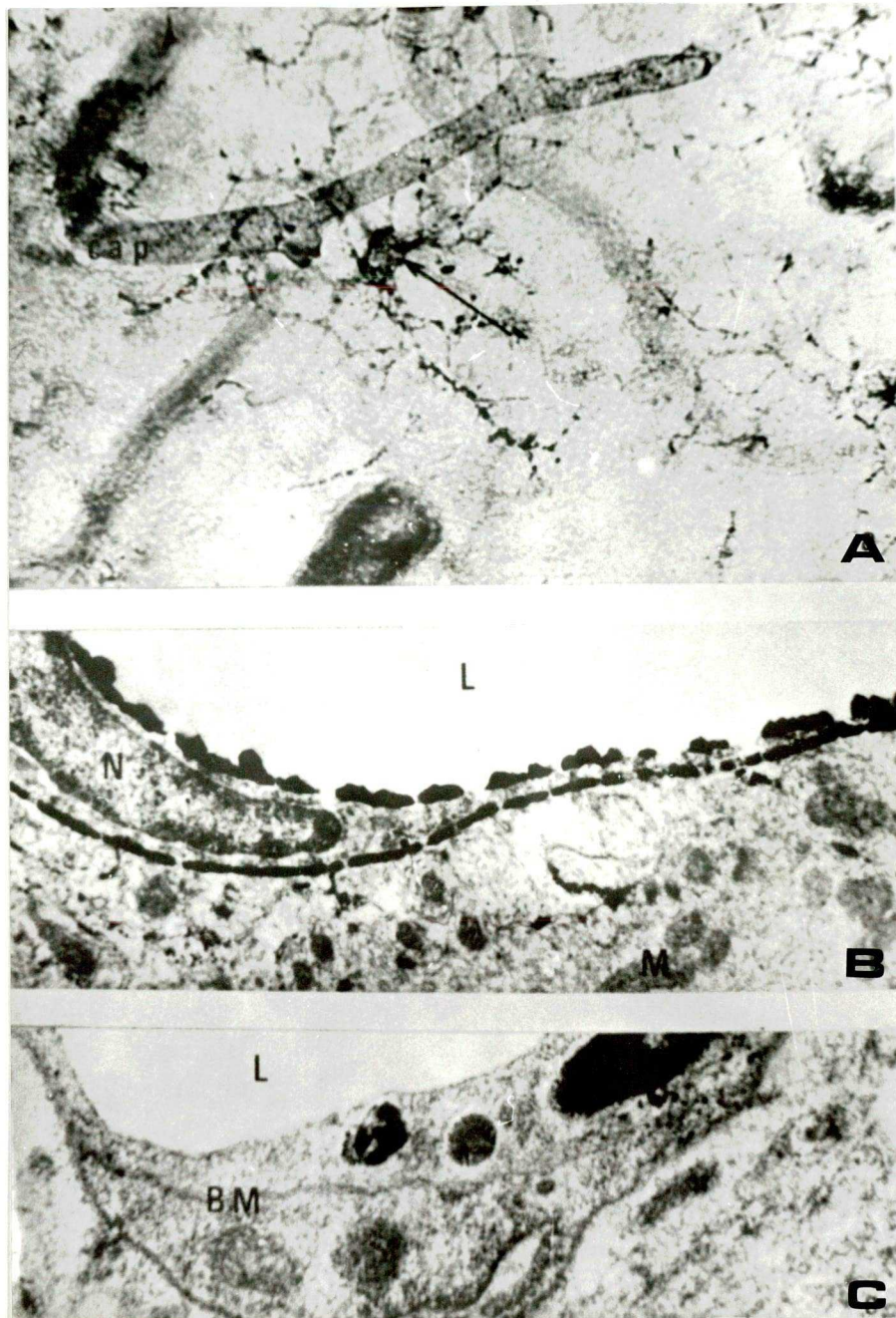
Az eredmények 3-3 kísérlet átlagai.

4.3. A HISZTAMIN-ÉRZÉKENY ADENIL CIKLÁZ JELLEMZÉSE AZ AGYI KAPILLÁRISOKBAN

Az adenil cikláz enzim alapaktivitását, valamint a 10^{-4} M hisztamin jelenlétében mérhető aktivitását a cortex homogenizátumban, valamint az abból preparált kapilláris frakcióban határoztuk meg /1. Táblázat/. Az enzim fajlagos aktivitása az izolált kapillárisokban magasabbnak bizonyult, mint a homogenizátumban, s 10^{-4} M hisztamin jelenléte az alapaktivitást majdnem kétszeres értékekre stimulálta.

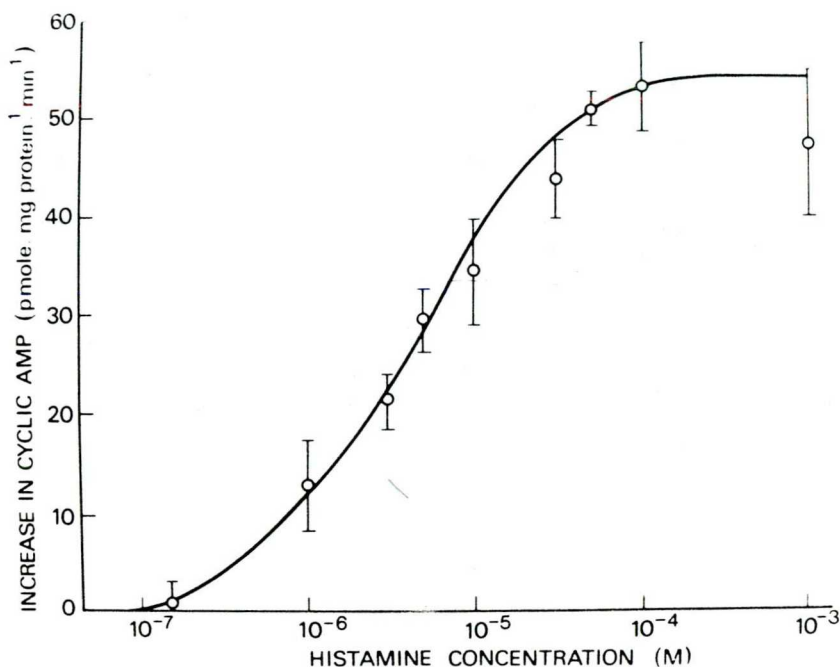
A 8. ábra az agykéreg adenil cikláz-pozitív hisztokémiai reakcióit demonstrálja. A fénymikroszkópos felvételen /8/A/ láthatjuk, hogy a kapillárisok igen erős festődése mellett az astrocyták is jelentős reakciót adtak. Az elektronmikroszkópos felvételeken az adenil cikláz reakcióterméket a kapillárisok lumenális és bazális membránjain lokalizáltuk, s azokat ugyancsak megfigyelhetjük az astrociták felszíni membránján is /8/B/. A kontrollfelvételen /8/C/ sem a kapillárisokban, sem az astrocitákon elektrondenz precipitátumot nem láttunk.

A biokémiai preparátumban vizsgáltuk a növekvő hisztaminkoncentráció hatását a kapillárisok adenil cikláz aktivitására /9. ábra/. A fél-maximális stimulációt előidéző hisztamin koncentráció $/EC_{50}/$ 5×10^{-6} M körüli értéknek bizonyult; a lehetséges maximális stimulációt 10^{-4} M hisztamin váltotta ki. A különböző



8. ábra Az adenil cikláz hisztokémiai lokalizációja az agyi kapillárisokban.
A - fénymikroszkópos felvétel /400 x nagyítás/; nyíllal az astrocitát jelöltük;
B - elektronmikroszkópos felvétel /30.000 x nagyítás/;
C - szubsztrát nélkül inkubált kontroll preparátum képe.
L - kapilláris lumen;
BM - bazális réteg.

preparátumokban a maximális stimuláció az alap-enzim-aktivitás 1,4 - 2,4-szeres értékét eredményezte.



9. ábra Az adenil cikláz hisztaminnal való stimulációja az agyi kapillárisokban. Az egyes pontok a cAMP szintézis alapértékének $55,4 \pm 2,9$ pmole cAMP $\times$ mg fehérje $\times$ min⁻¹ a hisztaminkoncentrációtól függő emelkedését mutatják. 5 kísérlet /3-3 párhuzamos mintával/ eredményei.

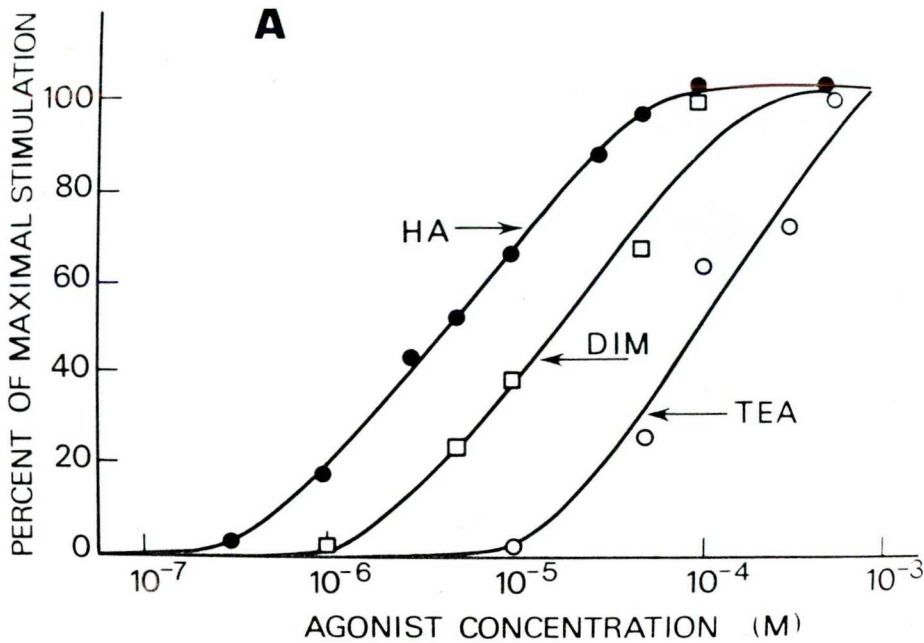
A hisztamin receptor/-ok/ természetét /H₁ vagy H₂/, amelyen keresztül a hisztamin-érzékeny adenil cikláz stimuláció megvalósul, a hisztamin különböző farmakológiai agonistái, illetve antagonistái segítségével vizsgáltuk.



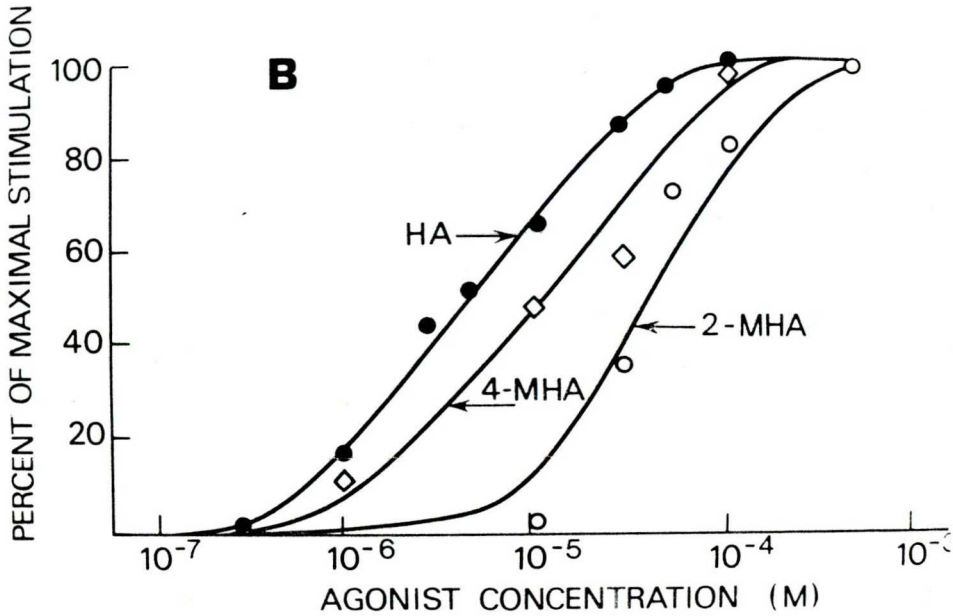
Két H_1 -receptor agonista /2-metilhisztamin és 2-tiazoliletilamin/ koncentráció-válasz görbéit és két H_2 -receptor agonista /dimaprit és 4-metilhisztamin/ koncentráció-válasz görbéit hasonlítottuk össze a hisztaminével /10. ábra/. Mint azt az ábra szövegében is leírtuk, az egyes agonisták által kiváltott maximális adenilcikláz stimuláció abszolút értékei különböznek, ami a vegyületek természetének tudható be. A 10. ábra adatai az egyes maximális stimulációk százalékos értékeit tükrözik. Az egyes agonistákra jellemző EC_{50} értékeket azok "relatív hatékonyságának" kiszámításához használtuk fel. A számítások eredményeit a 3. Táblázatban tüntettük fel, s az összehasonlítás érdekében ugyanezen táblázatban idézzük a perifériás szövetekben jól jellemzett H_1 - és H_2 -receptorokra vonatkozó irodalmi adatokat: az ileum kontrakciót kiváltó H_1 -agonisták és a gyomor szekréciót fokozó H_2 -agonisták relatív hatékonyságának jellemzőit.

H_1 -receptor antagonistaként mepyramint, H_2 -receptor antagonistaként cimetidint és metiamidot alkalmaztunk.

Kísérleteinkben H_1 -receptor antagonistaként mepyramint használtunk. A hisztamin-érzékeny adenilcikláz aktivitás gátlásának kvantitatív vizsgálatát konstans hisztamin-koncentráció és változtatott inhibitor /mepyramin/ koncentráció mellett végeztük. A 11. ábrán feltüntetett adatok szerint a fél-maximális inhibíciót előidéző mepyramin koncentráció



10.A ábra Az adenil cikláz aktivitás stimulációja az agyi kapillárisokban hisztaminnal és különböző H_1 - és H_2 -agonistákkal. Az eredményeket a hisztamin /HA/, dimaprit /DIM/ és 2-thiazolylethylamine /TEA/ /10.A ábra/ valamint a 4-metilhisztamin /4-MHA/ és 2-metilhisztamin /2-MHA/ /10.B ábra/ által kiváltott maximális stimuláció százalékában fejeztük ki. A cAMP szintézis abszolút értékeit /pmole cAMP $\times$ mg^{-1} fehérje $\times$ min^{-1} / a különböző agonisták szupramaximális koncentrációinál a következőnek találtuk : $87,9 \pm 9,8, 10^{-4}$ M HA-nal; $77 \pm 1,2, 10^{-4}$ M DIM-tal és $80,6 \pm 2,2 10^{-4}$ M TEA-nal. Az alapszint $62,1 \pm 2,9$ volt.



10.B ábra Az adenil cikláz aktivitás stimulációja 4-metilhisztaminnal és 2-metilhisztaminnal.
A cAMP szintézis adatai: $139,4 \pm 7,0, 10^{-4}$ M 4-MHA-nal; $130 \pm 8,6, 5 \times 10^{-4}$ M 2-MHA-nal és $144,7 \pm 9,3, 10^{-4}$ M hisztaminnal; alapszint $84,6 \pm 6,2$ pmole cAMP $\times$ mg $^{-1}$ fehérje $\times$ min $^{-1}$.
A 10.A és 10.B ábrákon két különálló kísérlet eredményeit tüntetük fel; az egyes pontok 6-6 párhuzamos mérés eredményeinek átlagértékei..

3. TÁBLÁZAT

HISZTAMIN AGONISTÁK "RELATIV HATÉKONYSÁGÁNAK" ÖSSZEHASONLÍTÁSA A CORTEX KAPILLÁRIS
FRAKCIÓBAN MÉRT ADENIL CIKLÁZ STIMULÁCIÓ, ill. A PERIFÉRIÁS SZÖVETEK BEN MÉRT
BIOLÓGIAI VÁLASZOK ALAPJÁN

AGONISTA	ADENIL CIKLÁZ A KAPILLÁRISOKBAN	GYOMOR SZEKRÉCIÓ (patkány - H ₂)	ILEUM KONTRAKCIÓ (teng. malac - H ₁)
Hisztamin	100	100 ^a	100 ^a
Dimaprit	25	19,5 ^b	0,0001 ^b
4-metilhisztamin	36	39 ^a	0,3 ^a
2-metilhisztamin	5	2 ^a	16,5 ^a
2-tiazoliletiamin	5	0,3 ^c	26 ^c

A "relativ hatékonyságot" (R.P.) az alábbi képlet szerint számítottuk :

$$R.P. = (EC_{50}^{\text{hisztamin}} / EC_{50}^{\text{agonista}}) \times 100$$

^aJOHNSON és MIZOGUCHI (1977),

^bPARSONS et al., (1977),

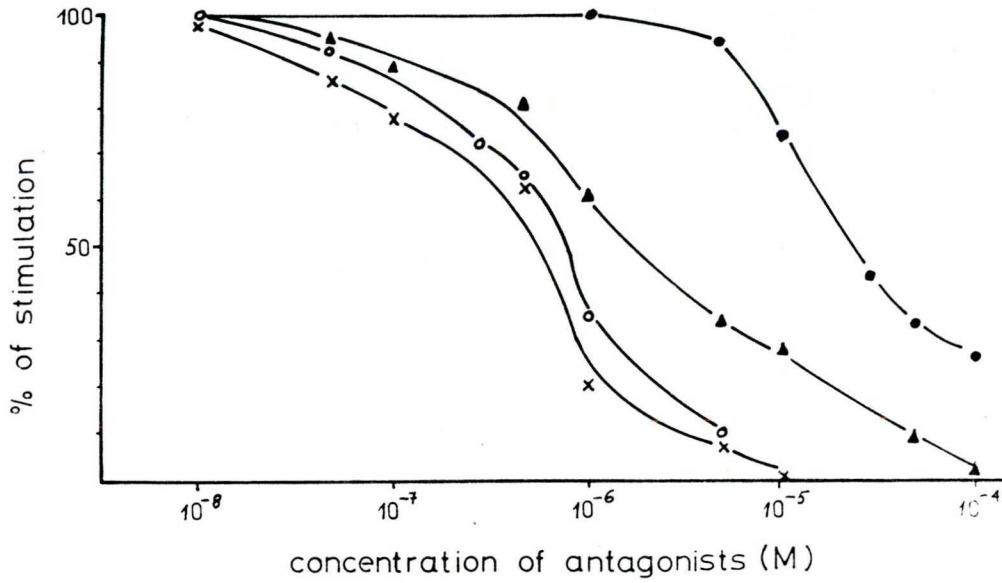
^cDURANT et al., (1975).

$/IC_{50}/$ 6×10^{-7} M körüli érték volt. Kompetitív inhibíciót feltételezve, a $K_i = IC_{50} / (1 + S/K_a)$ képlettel /CHENG és PRUSOFF, 1973/ kiszámíthatjuk az inhibíciós állandó $/K_i/$ értékét. A képletben S- az alkalmazott hisztaminkoncentráció $/10^{-4}$ M/ és K_a - az adenil cikláz félmaximális stimulációját kiváltó hisztaminkoncentráció $/5 \times 10^{-6}$ M/. Adataink alapján a K_i értéke $1,1 \times 10^{-6}$ M-t kaptunk.

Olyan kísérletekben, amelyekben az adenil cikláz stimulációt H_1 -agonistával váltottuk ki /TEA; 11. ábra/, megfigyelhettük ugyan a párhuzamosan adott H_1 -antagonista mepyramin stimuláció gátló hatását: az adenil cikláz stimuláció koncentráció görbéjének balra, tehát az alacsonyabb koncentrációk felé való eltolódását, de a kapillárisok esetében a görbék alapján számított K_i értéke $/3,1 \times 10^{-7}$ M/ így is mintegy két nagyságrenddel magasabb volt, mint a "tisztán" H_1 rendszerben /ileum/ leírt K_i értékek $/5 \times 10^{-10}$ M; ARUNLAKSHANA és SCHILD, 1959/.

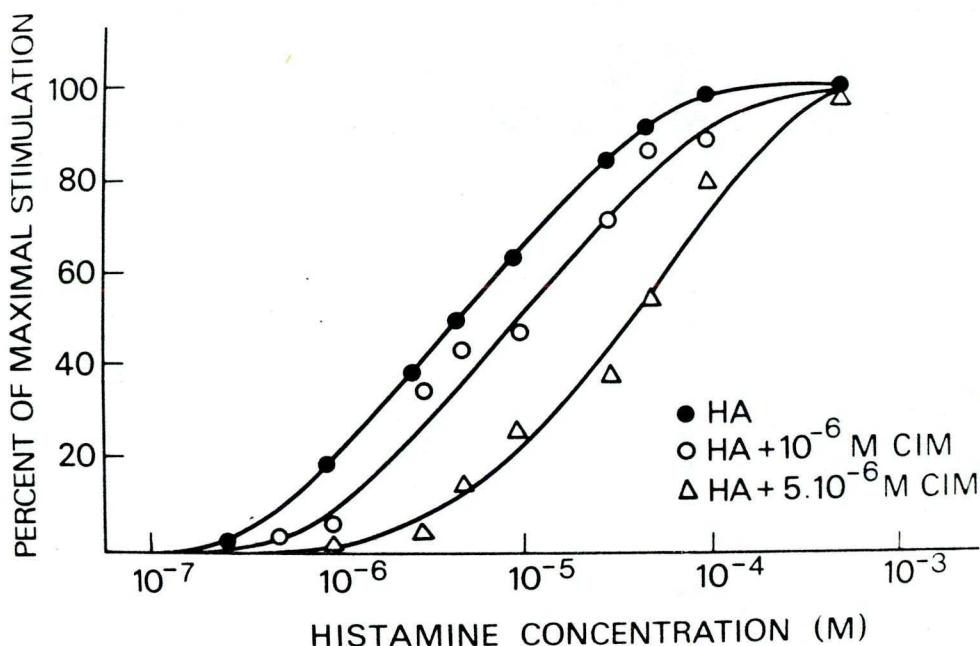
A cimetidin $/H_2$ -antagonista/ mind a hisztaminnal, mind pedig a 4-metilhisztaminnal $/H_2$ -agonista/ szemben a H_1 antagonistákhoz képest mintegy 2 nagyságrenddel alacsonyabb koncentráció-intervallumban bizonyult hatékony cikláz-stimuláció inhibitornak.

Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a kapillárisokban kimutatható hisztamin-érzékeny adenil cikláz rendszer a H_2 -receptor antagonistákra mutat specifikus érzékenységet, tehát a kapillárisokban H_2 típusu hisztamin receptorok vannak.



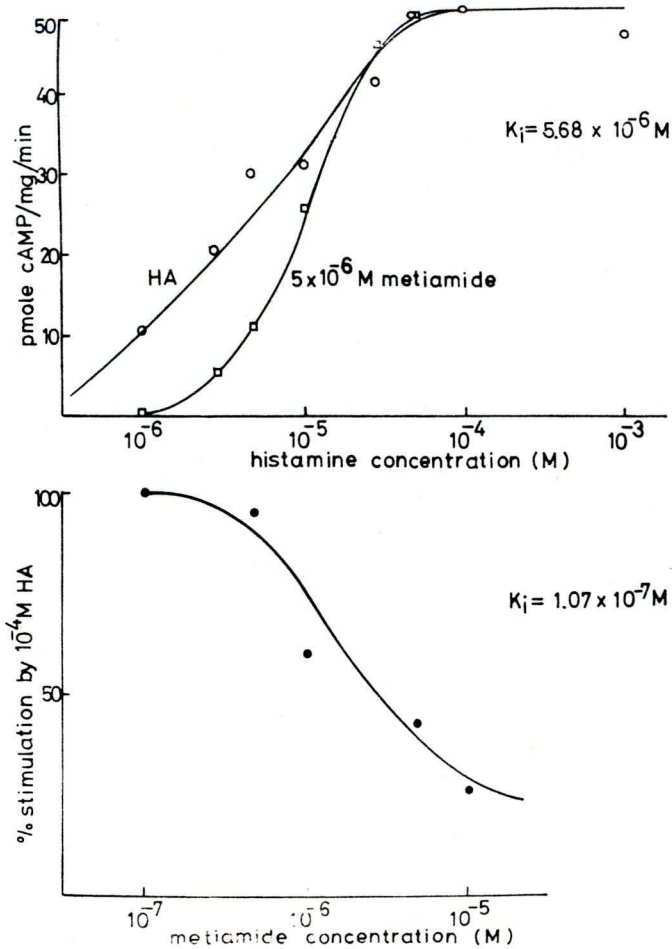
11. ábra Hisztamin antagonisták koncentráció-függő hatása a hisztaminnal vagy annak agonistáival stimulált adenil ciklázra agyi kapillárisokban.

- 10^{-4} M HA mepyraminnal szemben;
- ▲— 5×10^{-4} M TEA - mepyramin;
- 10^{-4} M HA - cimetidin;
- x— 10^{-4} M 4-MHA - cimetidin.



12. ábra A hisztamin által indukált adenil cikláz stimuláció gátlása cimetidinnel. Az agyi kapilláris frakció homogenizátumait különböző hisztamin koncentráció mellett inkubáltuk 10^{-6} M cimetidin /o/ vagy 5×10^{-6} M cimetidin /△/ jelenlétében, illetve cimetidin nélkül /●/. Az eredményeket a maximális hisztamin-válasz százalékában fejeztük ki. Az adenil cikláz alapaktivitást az alkalmazott antagonisták koncentrációk lényegében nem befolyásolták.

A 12. ábra az adenil cikláz aktivitásának különböző hisztaminkoncentrációk által előidézett stimulálását demonstrálja, amelyet a cimetidin két különböző koncentrációjának / 10^{-6} M és 5×10^{-6} M/ jelenlétében mértünk. A koncentráció-válasz görbe párhuzamos eltolódása - a hisztamin által kiváltott maximális válasz megváltozása nélkül - az antagonisták kompetitív inhibitor tulajdonságára utal. A kapott görbék adataiból



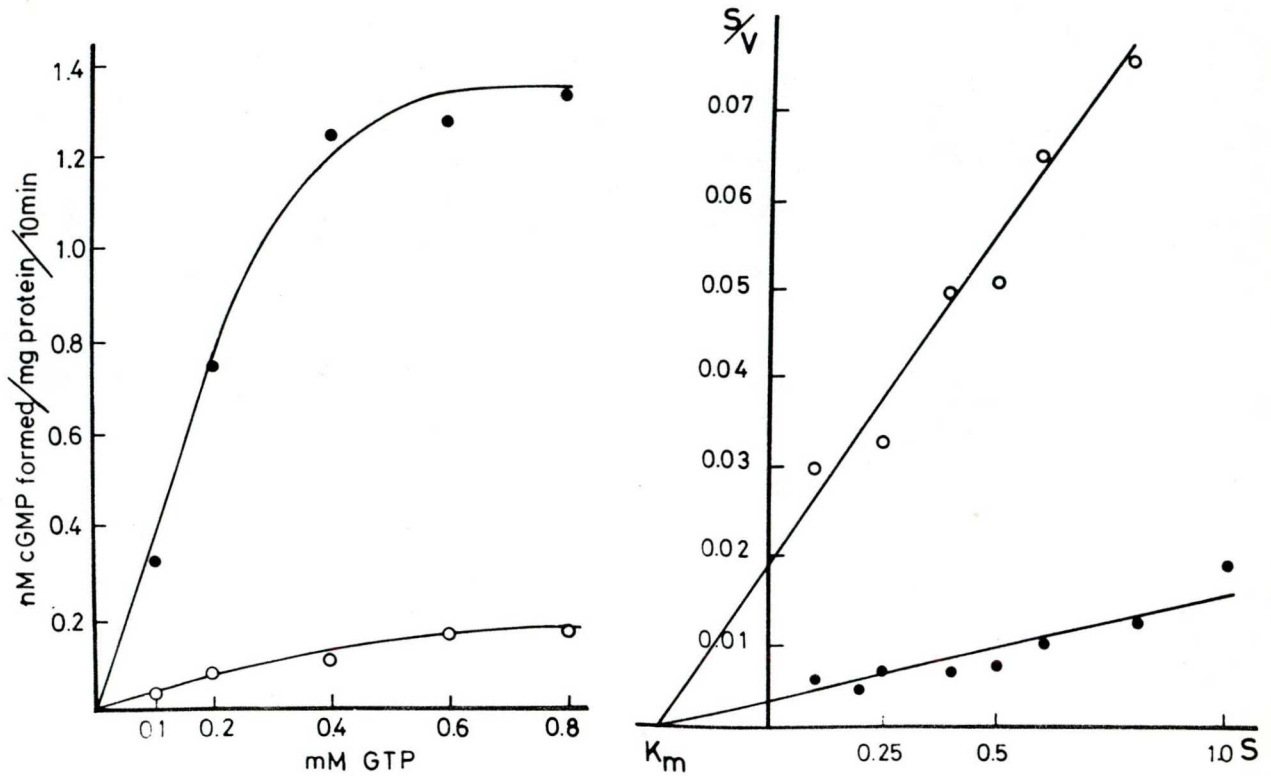
13. ábra A metiamid H_2 -antagonista koncentráció-függő hatása a hisztamin-érzékeny adenil cikláz aktivitásra.
 A - adenil cikláz stimuláció különböző hisztamin koncentráció mellett metiamid hozzáadás nélkül, illetve 5×10^{-6} M metiamid jelenlétében;
 B - a 10^{-4} M hisztaminnal kiváltott adenil cikláz stimuláció gátlása különböző metiamid koncentráció hatására.

a cimetidin inhibíciós állandóját $/K_i/$ is ki lehetett számítani a $K_i = I/(K'_a/K_a - 1)$ képlet alapján /CHENG és PRUSOFF, 1973/, amelyben K_a és K'_a az adenil cikláz fél-maximális stimulációját kiváltó hisztamin koncentrációk, amelyeket az antagonista nélkül, illetve jelenlétében határoznak meg; I pedig az antagonista koncentrációja. A cimetidin két alkalmazott koncentrációjánál kapott K_i értékek igen jól megfelelnek egymásnak: $6,9 \times 10^{-7}$ M, illetve $8,1 \times 10^{-7}$ M. 4-metilhisztamin alkalmazásakor hasonló cimetidin-gátlási görbéket kaptunk, amelyek alapján a K_i érték $3,7 \times 10^{-7}$ M-nak adódott.

Adatainkat kiegészítik a metiamiddal - egy, a cimetidinnél gyengébb hatású H_2 -antagonistával /BLACK et al., 1972/ - kapott eredményeink /13. ábra/, amelyek szerint ez az anyag szintén gátolja a hisztamin-érzékeny adenil cikláz.

4.4. GUANIL CIKLÁZ

Aktivitását a GTP szubsztrátból időegység alatt keletkező ciklikus GMP mennyiségével mértük. A guanil cikláz enzim alapaktivitása az agykéregből izolált kapilláris frakcióban $20,1 \pm 1,7$ pmol cGMP $\times$ mg $^{-1}$ $\times$ min $^{-1}$. A ciklikus GMP felhalmozódása az inkubációs kísérletben mintegy 15 percen keresztül lineáris volt, s lineáris függést mutatott a fehérje koncentrációtól is /az alkalmazott 50 μ g/minta és 200 μ g/minta koncentráció-határokon belül/. Az enzim K_m értéke 0,25 mM értéknek adódott /14. ábra/. Több bioaktív



14. ábra Az agyi kapillárisok guanil cikláz aktivitása a szubsztrátkoncentráció függvényében /14.A/.
Az enzim K_m értékének grafikus számítása HANES /1932/* szerint /14.B/.

—○— az enzim alapaktivitása a kapilláris homogenizátumban;
—●— 1 % Triton X 100 mellett mért aktivitás.

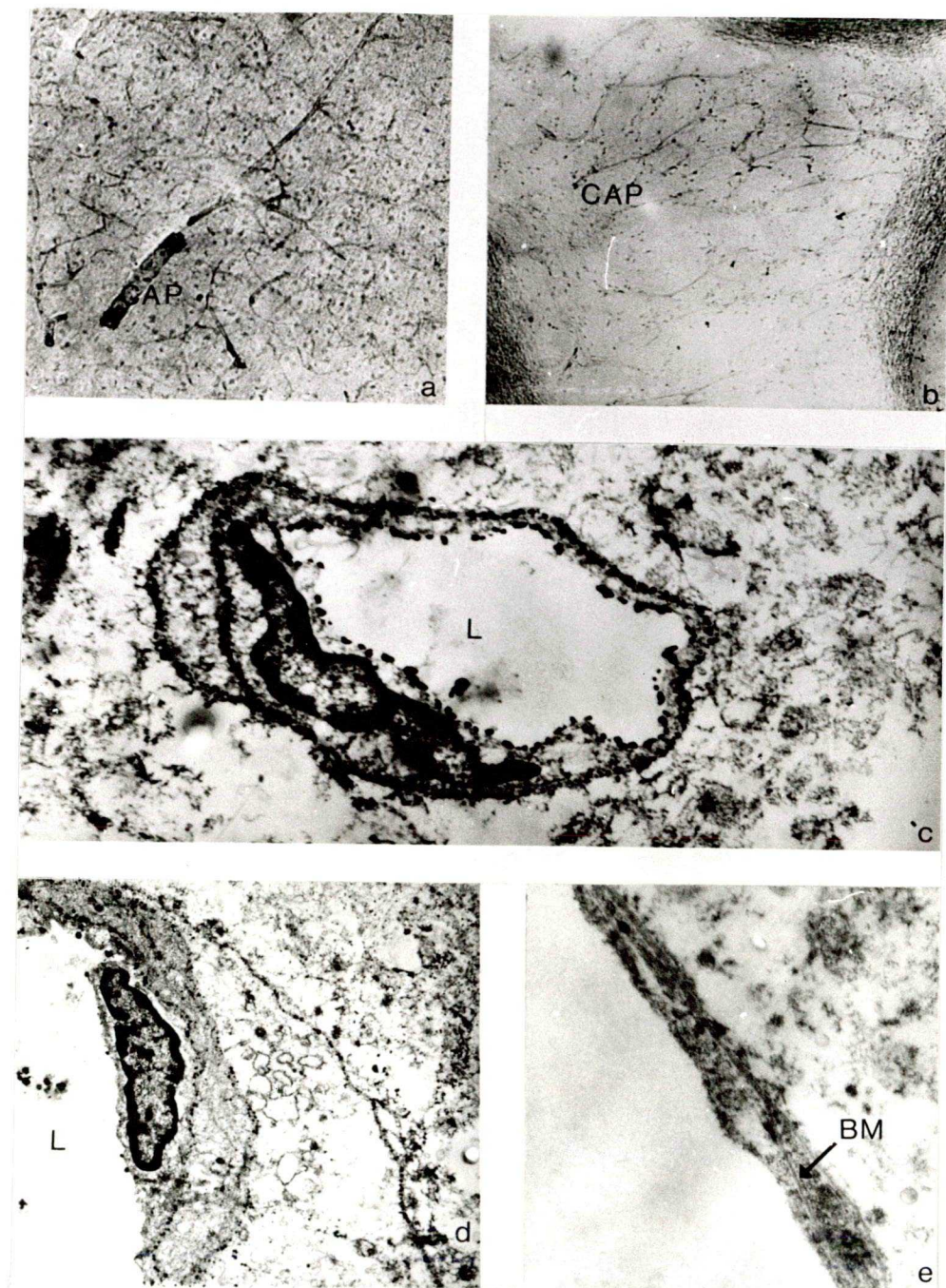
* HANES, C.S. /1932/ Biochem. J. 26, 1406.

4. TÁBLÁZAT

NEUROTRANZMITTEREK HATÁSA TENGERI MALAC AGYKÉREGBŐL IZOLÁLT KAPILLÁRIS FRAKCIÓBAN
MÉRT GUANILCIKLÁZ AKTIVITÁSRA

GTP (szubsztrát) koncentráció (mM)	Kontroll	+ 10^{-4} M hisztamin	+ 10^{-4} M acetylcholin	+ 5×10^{-5} M enkephalin
0,25	14 $\pm$ 2,8	11,7 $\pm$ 2,8	17,2 $\pm$ 4,7	15,6 $\pm$ 1,5
0,5	20,9 $\pm$ 5,8	24,8 $\pm$ 5,5	32,4 $\pm$ 10,4	26,1 $\pm$ 3,1
1,0	23,9 $\pm$ 2,4	27,0 $\pm$ 9,8	-	39,1 $\pm$ 4,5
2,0	23,1 $\pm$ 1,9	13,3 $\pm$ 4,2	17,2 $\pm$ 3,3	22,3 $\pm$ 0,6

Az enzimaktivitást pmol cGMP x mg⁻¹ fehérje x min⁻¹ egységekben fejeztük ki;
az eredmények két kísérlet (3-3 párhuzamos minta) átlagai ($\pm$ SD).



15. ábra A guanil cikláz hisztokémiai kimutatása agyszövet metszetekben.
 a, b - fénymikroszkópos felvételek /400 x nagyítással/;
 c, d - kapilláríst tartalmazó metszetrészek elektronmikroszkópos képei /15.000 x nagyítással/;
 e - szubsztrát nélküli kontroll /30.000 x nagyítással/;
 CAP - kapillárisok; L - kapilláris lumen;
 Gl - gliatalp; BM - kapilláris bazális rétege.

anyaggal tettünk kísérletet a guanil cikláz aktivitásának stimulálására /4. Táblázat/. Ebben mind az acetilcholin, hisztamin, mind az enkephalin/ 10^{-4} M/ hatástalannak bizonyult. A Triton X-100 detergens viszont mintegy hatszorosára növelte a guanil cikláz aktivitását / $120 \pm 16,3$ pmol ciklikus GMP $\times$ mg^{-1} $\times$ min^{-1} /. A K_m érték azonban ebben az esetben változatlannak bizonyult /14. ábra/.

A hisztokémiai eljárás szerint /1. MÓDSZEREK/ a guanil cikláz reakció végtermékét a kapillárisokban mind fény-, mind pedig elektronmikroszkóppal ki lehetett mutatni /15. ábra/. Az elektronmikroszkópos vizsgálat azt mutatta ki /15, c,d ábra/, hogy az enzim elektron-denz reakció végterméke a kapillárisok lumenális- és bazális membránjaiban halmozódik fel. A 15.e ábra a szubsztrát alkalmazása nélkül készített kontroll-felvételeket tartalmazza.

4.5. ADENOZINTRIFOSZFATÁZOK

TORACK és BARNETT /1964/ mutatta ki először hisztokémiai módszerrel, hogy agyszövet metszetekben az ATP-áz aktivitás a kapillárisok bazális rétegében lokalizálható. Az agykéreg kapilláris frakciójában analizáltuk az ATP-ázok aktivitását: meghatároztuk a három típusu ionfüggő ATP-ázt /5. Táblázat/. A táblázatból is kitűnik, hogy a kapillárisokban a Ca^{++} -/ Mg^{++} /-ATP-áz aktivitása dusul fel jelentősen /mintegy 26-szorosára a kiinduló agykéreg homogenizátumhoz képest/. A 6. Táblázatban foglaltuk össze néhány neuro-

5. TÁBLÁZAT

ADENOZIN-TRIFOSZFATÁZOK FAJLAGOS AKTIVITÁSA* TENGERI MALAC AGYKÉREG HOMOGENIZÁTUMBAN ÉS A KAPILLÁRIS FRAKCIÓBAN



ENZIM	HOMOGENIZÁTUM	KAPILLÁRIS FRAKCIÓ	DUSULÁSI FAKTOR
$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-áz}$	1988 ± 202	3125 ± 52	$1 : 1,57$
$\text{Mg}^{++} - \text{ATP-áz}$	5574 ± 815	5423 ± 465	$1 : 0,97$
$\text{Ca}^{++}(\text{Mg}^{++}) - \text{ATP-áz}$	48 ± 26	1269 ± 180	$1 : 26,4$

* Az ATP-ázok fajlagos aktivitását $\text{nmol } P_i \times \text{mg}^{-1} \text{ fehérje} \times 30 \text{ min}^{-1}$ egységekben tüntettük fel, 3-3 kísérlet átlageredményei alapján.

Az enzim meghatározáshoz használt inkubációs elegyek 2 mM ATP-t, 5 mM MgCl_2 -t és 20 mM KCl-t tartalmaztak, valamint a/ 100 mM NaCl + 1 mM EGTA-t - a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - és $\text{Mg}^{++} - \text{ATP-áz}$ ok méréséhez; b/ 100 mM KCl + 1 mM EGTA-t - a $\text{Mg}^{++} - \text{ATP-áz}$ méréséhez, és c/ 100 mM KCl-t - a $\text{Ca}^{++}(\text{Mg}^{++}) -$ és $\text{Mg}^{++} - \text{ATP-áz}$ ok méréséhez.

A kontroll méréseket szubsztrát (ATP) nélküli, illetve enzimforrás nélküli elegyekkel végeztük. A táblázatban figyelembe vettük a kettős aktivitásmérések adatait: a Mg^{++} -függő ATP-áz aktivitását a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -, ill. $\text{Ca}^{++}(\text{Mg}^{++}) - \text{ATP-áz}$ ok aktivitásának kiértékeléséhez levontuk.

6. TÁBLÁZAT

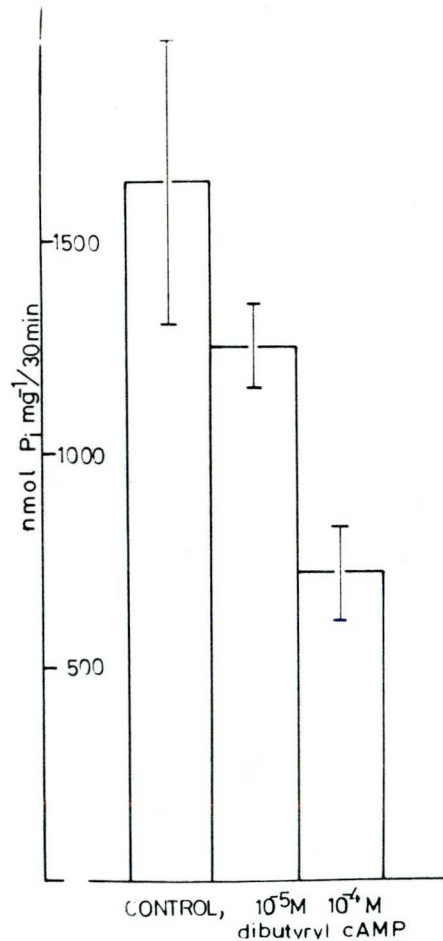
NEUROTRANSZMITTEREK HATÁSA AZ ATP-ÁZOK SPECIFIKUS AKTIVITÁSÁRA A KAPILLÁRIS FRAKCIÓBAN

Enzimek	Kontroll spec. akt. nmol P _i /mg*30'	Hisztamin 10 ⁻³ M nmol P _i /mg*30'	Dopamin 10 ⁻³ M nmol P _i /mg*30'	Noradrenalin 10 ⁻³ M nmol P _i /mg*30'
Na ⁺ -, K ⁺ - -ATP-áz	3450 ± 240	2340 ± 485	2260 ± 300	2870 ± 370
Mg ⁺⁺ -ATP-áz	5400 ± 330	4950 ± 295	5380 ± 130	5150 ± 320
Ca ⁺⁺ (Mg ⁺⁺)-ATP-áz	2010 ± 310	1080 ± 210	1030 ± 190	600 ± 270

Tipikus kísérlet eredményei; 4 különálló kísérlet (3-3 párhuzamos méréssel)
eredményei a fentiekkel összhangban voltak.

* mg fehérje.

transzmitter ATP-áz aktivitásokra gyakorolt hatása előzetes vizsgálatának adatait. A vizsgált transzmitterek a Na^+ , K^+ és Ca^{++} - Mg^{++} -ATP-ázok aktivitását többnyire valamelyest gátolták. A jelenség részletesebb analizise további kísérleteket igényel, amit az az érdekes megfigyelés is indokol, hogy a Ca^{++} Mg^{++} -ATP-áz aktivitását in vitro a kapilláris-homogenizátumhoz adott dibutiril-cAMP is gátolta, mégpedig a koncentrációtól függő mértékben /16. ábra/.



16. ábra Dibutiril cAMP hatása az agyi kapillárisok Ca^{++} Mg^{++} -ATP-áz aktivitására in vitro.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Hat évvel ezelőtt közöltük az agyi kapillárisok tisztítására elsőként kidolgozott módszert /JOÓ és KARNUSHINA, 1973/. Hogy azóta viszonylag rövid idő telt el, részben megkönnyíti eredményeink tárgyalását, hiszen a tisztított kapillárisokkal végzett munkákból aránylag kevés jelent még meg. Másrészt viszont tanui lehetünk a kutatók mind élenkebb érdeklődésének az agyi kapillárisok iránt, hiszen azok a vér-agy gát kémcsőben jól kezelhető, biokémiai vizsgálatok számára tökéletesen megfelelő modelljének tekinthetők /HJELLE et al., 1978/. Tudomásunk szerint ma a világon mintegy 10 laboratórium kutatja a különböző anyagok transzport mechanizmusait a kapillárisok izolálási módszerének felhasználásával. A kapillárisok izolálására máig már több módosított eljárás is napvilágot látott; a laboratóriumunkban rutinszerűen előállítható kapilláris frakcióról viszont elmondhatjuk, hogy az mind morfológiai, mind biokémiai jellemzőit tekintve előnyösen tűnik ki az irodalomban eddig közölt hasonló preparátumok közül. Véleményünk szerint rendkívül fontos kitüntetője az általunk preparált kapillárisoknak az, hogy azokból a vér elemei hiá-

nyoznak; ezek jelenléte távolról sem lenne közömbös a biokémiai eredmények értékelésekor. Megfigyeltük, hogy a kapillárisok izolálása után a pinocitózis aktivációjára emlékeztető sajátos jelenség figyelhető meg: elektronmikroszkópos preparátumokon a kapillárisokban a normálisnál több vezikulumot láthatunk /6. ábra/. Ennek az okát ma még nem ismerjük; talán a 0,9 %-os NaCl oldattal való perfúzió - ami kiválthat hipervolémiát /HORTON és HEDLEY-WHITE, 1979/ - de lehet a preparálás során a centrifugálásnál használt magas /1,5 M/ szaharózkoncentráció hipertóniás hatásának eredménye is. Zavaró tényezőnek tartjuk a kapilláris frakcióban a nagyobb arteiolák és venulák jelenlétét is, mivel ezek külön sejttípusokat, pl. sima izomsejteket vihetnek be a vizsgálandó rendszerbe. Ezek azonban szerencsére a preparátumban a kapillárisok összességéhez képest csak kis mennyiségben vannak jelen, s nagyobb mennyiségű kiindulási agyszövetből /cortex homogenátum/ elképzelhető a még nagyobb fokú kapilláris tisztítás. A kapilláris frakcióban jelenlévő csekély mennyiségű sejtmag ezideig nem jelentett zavaró tényezőt. Ezekről üveggyöngyön keresztül való szűréssel más szerzők /GOLDSTEIN et al., 1975/ igyekeztek megszabadulni, de a mi tapasztalataink szerint ez egyidejűleg jelentős mennyiségű kapilláris elvesztéséhez is vezet. Más, e célra kipróbált módszerek szintén számos, a kapilláris preparálást károsan befolyásoló tényezőt tartalmaznak.

Amikor az izolált agyi kapillárisokon végzett biokémiai kísérleteink eredményeinek megvitatására

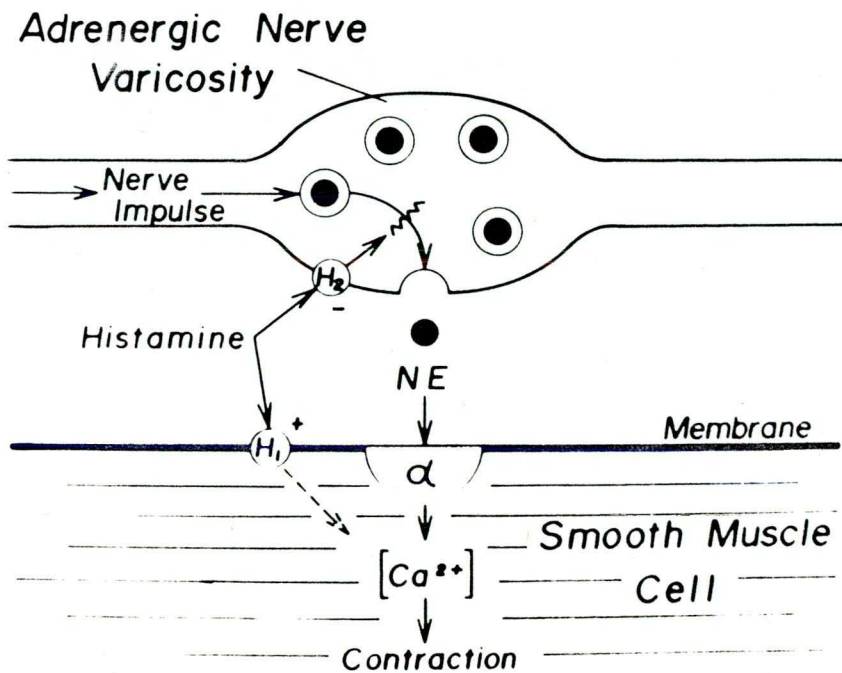
térünk át, fordítsuk elsőként figyelmünket a hisztaminnak, mint érdeklődésünk középpontjában álló bioaktiv anyagnak a kapillárisok endothel sejtjeire gyakorolt hatása mechanizmusának elemzésére.

A hisztamin koncentrációját az agykéreg homogenizátum frakcióiban /1. és 2. Táblázat; 35-36 old./ TAYLOR és SNYDER /1972/ rendkívül érzékeny radioenzimikus módszerrel határoztuk meg. Azt találtuk, hogy az agyszövet össz-hisztamin tartalmának 2 %-a a kapilláris frakcióban lokalizálódik. Ez az első pillantásra nem túl magasnak tűnő hisztamin mennyiség a kapillárisok igen "stabil" velejárója: a fehérje koncentrációhoz viszonyítva a kapillárisokban a hisztaminkoncentráció mintegy 2,8-szor magasabb, mint a teljes agyszövet homogenizátumban. Lényegében azonos hisztamin koncentrációról számolt be nemrégiben JAROTT et al., /1979/. Mi azon a véleményen vagyunk, hogy a hisztamin a kapillárisok endothel sejtjeiben lokalizálódik, bár egyelőre nem tudjuk, hogy szabad vagy kötött formában. EL ACKAD és BRODY /1975/ fluoreszcenciás módszerrel kimutatták, hogy a hisztamin a perifériás véredények falaiban lokalizált. A hisztamin szintézisének és katabolizmusának enzimeit /a hisztidin dekarboxiláz és hisztamin-N-metiltranszferáz/, bár mérhető aktivitással voltak jelen a kapillárisokban, fajlagos aktivitásuk mindig lényegesen alacsonyabb volt, mint a teljes cortex homogenátumban /1. Táblázat/. Ebből arra is lehet következtetni, hogy a kapilláris frakcióban nincsenek hisztaminerg szinaptoszómák, amelyekre magas hisztidin-dekarboxiláz aktivitás és alacsony hisztamin koncentráció jel-

lemző /GARBARG et al., 1976/. A kapilláris frakcióról készült elektronmikroszkópos felvételeken is valóban csak elvétve lehetett szinaptoszómákat találni, és ahol jelen is voltak, általában nem kötődtek szorosan a kapillárisok felszínéhez. Ezen megfigyelésünk ellentétben áll pl. LAI et al., /1975/ közlésével, miszerint a kapilláris frakcióban norepinephrin és annak metabolizmusa enzimeinek dusulását tapasztalták, ami adrenerg szinaptoszómák jelenlétére utalna. Az általunk használt procedurák szerint, az agyszövet Ca-mentes közegben való homogenizációja is nagyon valószínűtlenné teszi, hogy az adrenerg szinaptoszómák a kapillárisok vagy nagyobb erek felületéhez kötődve maradjanak.

Elvileg kapillárisokhoz szorosan kapcsolódó hizósejtekről /IBRAHIM, 1974/ képzelhető el, hogy a frakció magas hisztamin tartalmáért részben felelősek lehetnek. A hizósejtek az agyban azonban csak kevés számban találhatók, s mennyiségük függ az agy patológiás állapotaitól, vagy az állatok életkorától is /PESINGER et al., 1977; PICATOSTE et al., 1977/. A hizósejtekben viszont a hisztamin viszonylag magas koncentrációja mellett a hisztidin-dekarboxiláz alacsony aktivitását irták le. /SCHWARTZ, 1976/ A toluidin-kékkel való sejt-festéssel, amely igen alkalmas a metachromáziát mutató hizósejtek kimutatására, az általunk preparált kapilláris frakcióban csak rendkívül alacsony mennyiségű hizósejtet találtunk. Vizsgálatokat végeztünk ezenkívül a hizósejtekből a hisztamint specifikusan felszabadító vegyülettel, az u.n. Compound 48/80-nal mind az izolált

kapillárisokon in vitro, mind pedig in vivo /intra-ventrikulárisan injektálva/, s kimutattuk, hogy a vegyület nem befolyásolta a kapillárisok hisztamin tartalmát /az eredményeinket nem tüntettük fel/. A hisztamin tehát nagy valószínűséggel nem hizósejt eredetű a kapilláris frakcióban. Elképzelhető azonban, tekintettel a hisztamin igen erős kötődő tulajdonságára, hogy a kapilláris preparálás során a szövet-hisztamin "átcsoportosulása" is bekövetkezhet az egyes preparált frakciók között, ezt azonban egyértelműen kizártuk a homogenizálás és preparálás során mesterségesen adott ^3H -hisztaminnak a gradiens-frakciók közötti megoszlásának analizisével /2. Táblázat/. Eszerint a radioaktív hisztaminnak csak 0,06 %-át találtuk a kapilláris frakcióban, ami kizárja a műterméket előidéző "átcsoportosulás" lehetőségét. A hisztamin fiziológiásan magas koncentrációja minden bizonnyal regulációs jelentőséggel bír: SCHAYER /1973/ fel is tételezi a hisztamin regulációs szerepét az agy mikrocirkulációjának szabályozásában, a mechanizmusról azonban még nincsenek bizonyító érvényű adatok. McGRATH és SHEPHERD /1978/ úgy vélik, hogy a hisztamin véráramlásban játszott szabályozó szerepe a norepinephrin kiválasztás gátlásában keresendő: azokból az adrenerg idegvégződésekből, amelyek a véreredények sima izomzatának innervációját látják el /17. ábra/.



17. ábra A hisztamin feltételezett hatásmechanizmusa a véredények sima izmainak adrenerg innervációjában.

/McGRATH és SHEPHERD, 1978/.

H₁ és H₂ - a hisztamin receptorok feltételezett lokalizációja;

NE - norepinephrin.

A hisztamin vasodilatator hatása ily módon a H₂ típusu receptorokon keresztül valósulna meg; ezekről pedig ismeretes, hogy az adenil cikláz rendszerrel vannak funkcionális kapcsolatban. /A H₁ típusu receptorokról pedig úgy vélik, hogy a guanil cikláz rendszerrel is közvetlen regulációs kapcsolatban állnak /GREENGARD, 1976; BARTFAI, 1978/. Ezen irodalmi adatok és modellek csupán a véredények lumen-keresztmetszetének szabályozására vonatkoznak, a hisztaminnak az endothel-sejt permeabilitását szabályozó szerepéről nincsenek pontos elképzeléseink. A perifériás szövetekben, pl. a

zsírszövetben, a kapillárisok endothel sejtjeiben található pinocitotikus vezikulákban noradrenalinral stimulálható adenil cikláz aktivitást mutattak ki /WAGNER et al., 1972/; a szívizom kapillárisokban az adenil cikláz pedig hisztamin-érzékeny volt /WOLLENBERGER et al., 1973/. Ezen adatok, valamint saját megfigyeléseink alapján arra következtettünk, hogy az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben az adenil cikláz rendszer stimulációja illetve cAMP koncentráció sejten belüli növekedése megelőzi a pinocitózis fokozódását. /JOÓ, 1972; JOÓ és KARNUSHINA, 1978/.

Laboratóriumunkban korábban közölt előzetes kísérleti adatokból /JOÓ et al., 1975/ már következtetni lehetett arra, hogy az agyi kapillárisokban az adenil cikláz rendszert hisztaminnal stimulálni lehet. Ez a megfigyelés késztetett arra, hogy a hisztamin adenil cikláz rendszerre kifejtett hatásának specifikitását és mechanizmusát kutatni kezdjük az agyi kapillárisokban.

A hisztamin agonisták és antagonisták alkalmazásával kapott eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy az izolált agyi kapillárisokban hisztamin-érzékeny, azaz hisztaminnal stimulálható adenil cikláz rendszer működik, amely specifikus funkcionális kapcsolatban áll a H_2 típusu hisztamin receptorokkal. Ezt a megállapításunkat a következő megfigyelésekre alapoztuk :

- 1./ H_2 -specifikus hisztamin agonisták és antagonisták hatásukat már igen alacsony koncentrációban kifejtik, s ezek a koncentrációk igen közeliek a tisztán H_2 típusu receptort tartalmazó szöveteknél meg-

figyelt aktiv agonista vagy antagonistá koncentrációkhoz;

- 2./ H_1 -receptor agonisták BLACK et al., /1972/ megfigyelése szerint magasabb $/10^{-4}$ M/ koncentrációkban alkalmazva képesek kölcsönhatásba lépni a H_2 típusu receptorokkal;
- 3./ a mepyramin stimulációt gátló hatása csak viszonylag magasabb koncentrációk mellett érvényesül $/10^{-5} - 10^{-4}$ M/, amit szintén tekinthetünk ezen H_1 -antagonista H_2 receptorokkal való nem-specifikus kölcsönhatása eredményeként. Ezt látszik alátámasztani GREEN et al., /1978/ tisztán H_2 -receptort tartalmazó rendszeren tett hasonló megfigyelése.

A kapillárisokban levő hisztamin-receptor típusát illetően azonban nehéz kategorikus álláspontra helyezkedni. A probléma ma még valószínűleg metodikai jellegű nehézségeket is magában hordoz.

A H_2 típusu receptor mellett szólnak GREENGARD és munkatársai adatai /HEGSTRAND et al., 1976; KANOF et al., 1977/, akik az általunk is alkalmazott adenil cikláz aktivitás meghatározási módszerét használva, tengeri malac hippocampus homogenizátumban az adenil cikláz rendszert csak a H_2 típusu hisztamin receptorokon keresztül tudták stimulálni. Bár az általunk preparált frakcióban valamivel alacsonyabb adenil cikláz aktivitást mértünk, mint az idézett szerzők, de a rendszer agonistákra és antagonistákra való érzékenysége hasonló jellegű volt. J.-C. SCHWARTZ munkacsoportja ugyanakkor - inkubált hippocampus szeletekkel kísér-

letezve - az adenil cikláz rendszert mindkét típusu hisztamin receptoron keresztül érzékenynek találták /BAUDRY et al., 1975; PALACIOS et al., 1978/, hasonlóképpen PSYCHOYOS /1978/ eredményeihez, aki sejtmentes preparátummal dolgozott /igaz, meg lehetőszen hosszadalmas módszerrel/. A két hisztamin-receptor típus lehetséges kölcsönhatását feltételező néhány mai elképzelés hiveinek nézetei többnyire abban különböznek, hogy két különböző receptor-molekula létezik-e, /OWEN, 1977; SCHWARTZ et al., 1977/ vagy csupán ugyanazon receptor konformáció-változásai eredményezik a H_1 illetve H_2 típusu farmakológiai válaszok különbözőségét /KENAKIN et al., 1974/. Más vélemények szerint a hisztamin-érzékenység és a receptor specifitása például adenozin jelenlététől is függ DISMUKES et al., /1976/.

Eredményeink alapján úgy is vélhetjük, hogy a hisztamin koncentráció-függő hatása esetleg két fázisu : rendszerünkben a hisztamin az adenil cikláz specifikus módon - a H_2 receptorok nagyobb érzékenységén keresztül -, vagy aspecifikusan / H_1 receptorok által?/ stimulálja. Erre utalnak PALACIOS és munkatársai /1978/ hippocampus agyszeleteken kapott megfigyelései, /lásd pl. 12. ábra/.

Ez utóbbiak azonban a fenti feltételezés bizonyításához nagyobb számú mérést és azok pontosabb matematikai analízisét igénylik.

Szintén nyitott kérdés a hisztamin receptor vagy receptorok lokalizációja. Az aminosavak számára például az endothel sejtek permeabilitása különbözik a kapilláris-lumen irányába, illetve az idegsejtek felé /BETZ és GOLDSTEIN, 1978/. Különbséget feltételezhetünk tehát az "aktív" receptorok számában a kapillárisok belső és külső oldalain. Ugyanerre következtethetünk azokból a kísérletekből is /BROMAN és LINDBERG-BROMAN, 1945; WESTERGAARD és BRIGHTMAN, 1973/, amelyekben intravénás hisztamin injekcióval egerekben és patkányokban nem lehetett fokozni az agyi endothel sejtek permeabilitását. Magunk is hasonló jelenséget tapasztaltunk /KARNUSHINA, JANKA, JOÓ; nem publikált adatok/ néhány korábbi kutyaikkal végzett kísérletben: viszonylag magas hisztamin dózisok carotis-on keresztül való beadása után sem tapasztaltunk a I^{131} izotóppal jelölt borjú szérumalbumin beáramlását a vérből az agyszövetbe. FÖLDES és KELENTEI /1954/ azonban annak idején arról számolt be, hogy hisztamin beadásával a vér-agy gátat károsítani lehetett. Mindezek az adatok a hisztamin receptorok lokalizációjának problémáját illetően csak közvetett jellegűek.

A hisztamin hatásával is kapcsolatos lehet - különösen, ha nem zárjuk ki a H_1 receptorok jelenlétének lehetőségét - más regulációs rendszer/-ek/ működésének feltételezése. Ilyennek tekinthetjük például a guanil cikláz rendszert, amelynek jelenlétét az agyi kapillárisokban laboratóriumunkban mi mutattuk ki elsőként /KARNUSHINA et al., 1979c/. A guanil cikláz enzimet azonban különböző neurotranszmitterekkel in vitro nem lehetett stimulálni /lásd 4. Táblázat/, s a hisztamin ugyancsak hatástalannak bizonyult. A guanil cikláz aktiválhatóságának feltételei sejtmentes rendszerekben mindezideig nem ismeretesek.

Annak ellenére, hogy a guanil cikláz általában "regulációs" enzimnek tekintik /lásd GOLDBERG össze-foglalója, 1977/, működésének és szerepének mechanizmusa mindezideig kevésbé kutatott. STUDY et al., /1978/ kimutatta, hogy neuroblasztóma sejtekben a cGMP-szint kapcsolatban áll az u.n. Ca^{++} -csatornák működésével: a Ca^{++} ionok gátolják az adenil cikláz aktivitást, s ugyanakkor stimulálják a guanil cikláz aktivitását. Az adenil ciklázal ellentétben ezt az enzimet először a citoplazmában, oldott formában mutatták ki, s csak később jelentek meg a membránhoz kötött guanil ciklázról szóló közlemények /GOLDBERG, 1977/. Ez utóbbi enzimfajta különbözött az oldott enzimtől. A két enzimet például meg lehet különböztetni a detergenssekkel való aktiválhatóság alapján: a memb-

ránhoz kapcsolódó guanil cikláz jelentősen aktiválható detergenssekkel, míg a citoplazmatikus enzim nem. Kísérleti eredményeinkből /14. ábra/ arra következtettünk, hogy az agyi kapillárisokban főleg a membránhoz kötött guanil cikláz enzim található. Természetesen ennek bizonyítására a legmeggyőzőbb módszer a kapillárisok szubcelluláris frakcióinak elemzése lenne, ami számunkra is a jövő egyik feladatát jelenti.

A guanil cikláz kimutatását célzó hisztokémiai és biokémiai jellegű vizsgálataink eredményei összhangban vannak egymással. Hisztokémiai preparátumokon a legintenzívebb guanil cikláz reakciót az endothel sejtek bazális membránján és kapilláris-lumen felőli membránján láttuk /15. ábra/. A guanil cikláz jelenlétét az agyi kapillárisokban tehát bizonyítottnak tekinthetjük. Annak tisztázását, hogy az enzimnek milyen szabályozó szerepe van a kapillárisokban, a további kutatások egyik feladatának tekinthetjük.

A következő feladat, amelyet kitűztünk, a mono-, illetve bivalens kation függő ATP-ázok biokémiai jellemzése volt az izolált agyi kapillárisokban. Az ATP-ázok fontos szerepére a vér-agy gát fenntartásában a bivalens kation függő ATP-ázok inhibitorainak alkalmazásával végzett kísérletek eredményei utaltak /JOÓ, 1975; 1979/.

Kísérleteinkben az izolált agyi kapillárisokban mind a három típusu, tehát Na^+ , K^+ -függő, Mg^{++} -függő és $\text{Ca}^{++}[\text{Mg}^{++}]$ -függő, ATP-ázt ki tudtuk mutatni. Az izolált kapillárisokat illetően ATP-ázokra vonatkozó adatokkal csak két közleményről tudunk /EISENBERG és

és SUDDITH, 1977; SUDDITH, 1978/. E szerzők a Na^+ , K^+ -ATP-áz aktivitását az általunk mért értéknél mintegy másfélszer magasabbnak találták, ami a preparátumok természetes különbözőségén kívül azzal is magyarázható, hogy esetükben a kontamináló vérelemek a Na^+ , K^+ -ATP-áz aktivitás jelentős többletét okozhatják.

Bizonyos fokiig meglepőnek, de mindenképpen figyelemreméltónak találtuk azt a tényt, hogy az agyi kapillárisokban meglehetősen magas Ca^{++} -függő ATP-ázt mérünk. A sejtfiziológiai jelenségek közül ugyanis éppen a membránpermeabilitással és a vezikuláris transzporttal kapcsolatos folyamatok mutatnak legnagyobb fokú érzékenységet a Ca^{++} ionkoncentrációra, tekintet nélkül arra, hogy az exocitózis vagy pinocitózis. A kapillárisok endothel sejtjeinek rendkívül alacsony pinocitotikus aktivitását ismerve találtuk meglepőnek a jelentős Ca^{++} -dependens ATP-áz aktivitást. Hisztokémiai adataink szerint ez az aktivitás legkifejezettebben a kapillárisok bazális rétegében detektálható; a dikation-függő ATP-ázok gátlása pedig éppen a bazális réteg szerkezetének megbomlásához vezetett, ami viszont maga után vonta a vér-agy gát károsodását is /JOÓ, 1979/. Mindezzel talán kapcsolatba hozható az a fentebb már említett megfigyelésünk is, miszerint az izolált kapillárisokról készített elektronmikroszkópos felvételeken az endothel sejtekben jelentős számú pinocitotikus vezikulákat találtunk. Elképzelhető, hogy a jelenség a kapilláris preparálás során aktivált Ca^{++} -depen-

dens ATP-áz következménye. Megjegyezzük, hogy LE BEUX és WILLEMOT /1978/ az agy hajszálereinek endothel sejtjeiben actin-szerű filamentumokat irtak le, ami szintén Ca^{++} -ATP-áz jelenlétét sugallja.

Jelenleg is dolgozunk a kapillárisok $\text{Ca}^{++}[\text{Mg}^{++}]$ -függő ATP-áz aktivitásának részletekbe menő biokémiai analizisén: tisztázni kívánjuk azokat a tényezőket, amelyek ennek az enzimnek az aktivitását szabályozzák. Eddigi eredményeinket a 6. Táblázatban foglaltuk össze. /54. old./.

A kapillárisokban az ATP-áz aktivitásokat az inkubációs elegybe adott különböző neurotranszmitterek jelenlétében határoztuk meg. DESAIAH és HO /1977/ eredményeivel ellentétben /e szerzők szinaptoszómákban norepinephrin és dopamin hatására az ATP-ázok stimulációját figyelték meg/ kísérleteinkben a hisztaminnak és a vizsgált transzmittereknek a Na^{+} , K^{+} -ATP-ázra és a $\text{Ca}^{++}[\text{Mg}^{++}]$ -ATP-ázra inkább gátló hatása volt. Az utóbbi enzimet viszont a dibutiril cAMP is gátolta, mégpedig a koncentrációtól függő módon /16. ábra/.

E megfigyeléseinkből arra lehet következtetni, hogy az adenil cikláz rendszer és az ATP-áz "rendszer" közvetlen funkcionális kapcsolatban áll egymással, ami a két enzimrendszer kölcsönhatását jelzi, mint azt SCHEID és munkatársai /1979/ sima izom szövettenyészetben már bizonyítottak.

Az ATP-ázokra vonatkozólag megállapíthatjuk, hogy azok lokalizációja a kapillárisok bazális rétegében szintén e struktúra igen fontos szerepére utal a vér-agy gát szerveződésében. A bazális réteg magas prokollagén tartalmának köszönhető a kapillárisok rugal-

massága, a pro-kollagén térbeli szerveződése viszont nagy valószínűséggel függ az ATP-áz aktivitástól. Az agyi kapillárisok bazális rétegének tisztítására és biokémiai jellemzésére már megtörténtek az első kísérletek /CARLSON et al., 1978/, de az ezekben alkalmazott magas detergens koncentráció egyáltalán nem tekinthető optimális tényezőnek e struktúra integritásának megőrzéséhez.

KÖVETKEZTETÉSEK

- 1./ Kimutattuk, hogy az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben viszonylag magas a hisztamin tartalom, de a hisztamin metabolizmus emellett rendkívül alacsony intenzitású.
- 2./ Bebizonyítottuk a hisztaminnal stimulálható adenil cikláz rendszer jelenlétét izolált agyi kapillárisokban; az adenil cikláz lényegesen érzékenyebbnek bizonyult a hisztaminnal a H_2 típusu receptorokon keresztül való stimulációra, mint a H_1 receptorokon keresztül.
- 3./ Hisztokémiai és biokémiai módszerekkel első ízben sikerült kimutatnunk a guanil cikláz enzim jelenlétét az agyi kapillárisok endothel sejtjeiben.
- 4./ Meghatároztuk a különböző ionfüggő adenosin-trifoszfatazok aktivitását az agykéregből izolált kapillárisokban; kimutattuk, hogy a dibutiril ciklikus AMP csökkenti az ATP-ázok aktivitását.

AZ IZOLÁLT AGYI KAPILLÁRISOKON VÉGZETT KUTATÁSOK
NÉHÁNY GYAKORLATI VONATKOZÁSA

Bár kutatásainkban figyelmünket a hisztaminnak az izolált agyi kapillárisokban jelenlévő regulátor enzimekre gyakorolt hatására koncentráltuk, munkánk egyik fő célja az volt, hogy rámutassunk az izolált kapillárisok, mint kutatási rendszer alkalmazhatóságára a vér-agy gáttal és hisztamin-hatással kapcsolatos kérdések tanulmányozásában. Kétségtelen, hogy az in vitro rendszeren való vizsgálatok megfelelően megalapozott élettani kutatási háttérrel igényelnek, ami az eredmények kiegészítését és hitelesítését lehetővé teszi in vivo körülmények között is.

Az izolált agyi kapillárisokkal végzett biokémiai vizsgálatok segítségünkre vannak tehát a vér-agy gát fenntartása mechanizmusainak megértésében, de gyakorlati, főként orvosi problémák szempontjából is fontosak lehetnek :

1./ Ismeretes, hogy több idegrendszerre ható gyógyszer hatása, vagy éppen nem kívánt mellékhatása függ a gyógyszer és az agyi hajszálerek endothel sejtjeinek kölcsönhatásaitól is /OLDENDORF, 1974/. A tisztított kapilláris frakció tehát alkalmas és talán ma már elengedhetetlen eszköze azoknak a vizsgálá-

toknak, amelyek célja annak kimutatása, hogy egyes anyagokat a kapilláris sejtek átengedni vagy akkumulálni képesek, vagy éppen metabolizálják. E vizsgálatokra alkalmas teszt-rendszer jelenleg kidolgozás alatt áll laboratóriumunkban; az erre irányuló munkákat az Egyesül Gyógyszer- és Tápszergyárral szoros munkakapcsolatban végezzük.

2./ Több betegség, amely a keringési rendszer patológias károsodásával jár /magas vérnyomás, érelmeszesedés, cukorbetegség, autoimmun betegségek, stb./ elsősorban a kapillárisokon manifesztálódik. A kapillárisok vizsgálatát a betegségekkel kapcsolatban is rendkívül fontosnak véljük.

3./ S mivel figyelmünket elsősorban a vér-agy gát permeabilitási jelenségei felé összpontosítjuk, kiemeljük a vér-agy gát károsodásának rendkívül súlyos következményeit, mivel annak kiváltó okai igen sokfélék: sérülés, mérgezés, műtéti beavatkozás, vírusfertőzés, stb. A vér-agy gát károsodásával járó agyödémát pedig igen nehéz, gyakran lehetetlen gyógyítani /CSANDA, 1978/. Kísérletek folynak H_2 hisztamin-receptor antagonisták felhasználására, mint az /egyelőre kísérletesen kiváltott/ agyödéma és perifériás szöveti ödéma megelőzésének lehetséges módjára, s az előzetes munkák ezideig reményt keltő eredményeket adtak /BRIMBLECOMB et al., 1976; JOÓ et al., 1976; JOÓ, 1979b/.

AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉBŐL MEGJELENT

DOLGOZATOK ÉS ELŐADÁSOK

1. Joó, F. and I. Karnushina /1973/: A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. Cytobios, 8, 41-48.
2. Joó, F. és I. Karnushina /1978/: Az agyi kapillárisok pinocitózisának és makromolekuláris transzportjának cAMP-mediált szabályozása. MTA Biol. Oszt. Közl. 21, 299-309.
3. Karnushina, I.L., J.M. Palacios, G.Barbin, E.Dux, F.Joó and J.-C. Schwartz /1979a/: Histamin-related enzymes and histamin receptors in isolated brain capillaries. Agents and Actions 9, 89-90.
4. Karnushina, I.L., J.M.Palacios, G.Barbin, E.Dux, F.Joó and J.-C.Schwartz /1979b/: Studies on a capillary-rich fraction isolated from brain: histaminergic components and characterization of the histamin receptors linked to adenylate cyclase. J. Neurochem. /közlés alatt/.
5. Karnushina, I.L., I.Tóth and F.Joó /1979c/: Presence of guanylate cyclase in rat brain capillaries: histochemical and biochemical evidences. Brain Res. /közlés alatt/.

Előadások :

1. Joó, F. and I.Karnushina /1973/: Isolation of capillary-rich fraction from rat brain. X. International Congress of Neurology, Barcelona.
2. Joó F. és Karnyushina, I. /1975/: A hajszálerek izolálása agyszövetből. Membrán-transzport Konferencia, Tihany.
3. Karnushina, I.L., J.-M. Palacios, G.Barbin, E.Dux, F.Joó and J.-C. Schwartz /1978/: Histamin-related enzymes and histamine receptors in isolated brain capillaries. 7th Meeting of the European Branch of Histamine Club, Lodz.
4. Karnyushina, I.L., Kelemen, K. és Joó, F. /1979/: Agyból izolált hajszálerek biokémiai jellemzése: adenil cikláz és adenzintrifoszfátázok. Membrán-transzport konferencia, Sümeg.
5. Joó, F., I.Karnushina, I.Tóth and E.Dux /1979/: Role of the hormon receptors in regulating the permeability of the blood-brain barrier. Symposium on biogenic amine and peptide receptors, Szeged.
6. Joó, F. and I.Karnushina /1979/: ATP-ase activity of brain capillaries: histochemical localization and biochemical characteristics; International Symposium on the Pathophysiology of Cerebral Metabolism, Beograd.
7. Tóth, I., I.Karnushina and F.Joó /1979/: Evidence on the presence of guanylate cyclase in brain capillaries; International Symposium on the Pathophysiology of Cerebral Metabolism, Beograd.

8. Karnushina, I.L., E.Dux and F.Joó /1979/: Detailed study on the histamine-sensitive adenylate cyclase confined to isolated brain capillaries of guinea pig cortex.
International Symposium on the Pathophysiology of Cerebral Metabolism, Beograd.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki Dr. Joó Ferencnek, aki mint szakmai vezető és kolléga mindent megtett, hogy a jelen munkát elkészíthettem.

Külön köszönetet mondok férjemnek, Dr. Bajszár Györgynek, aki a disszertációm megírásában felbecsülhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönet illeti J.-C. Schwartz professzort, Monique Garbarg-t és Gilles Barbin-t /INSERM Neurológiai Kutatólaboratórium, Párizs/ és Wollemann Mária professzort /MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet/ munkánkhoz nyújtott segítségükért és a hasznos konzultációkért, valamint a Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézete Molekuláris Neurológiai Csoportja minden munkatársát, amiért egyaránt odaadással osztottak a kutatás gondjaiban és örömeiben.

Külön megköszönöm Gazdagh Gabriellának a fényképek elkészítésében, Rácz Zsuzsannának pedig az értekezés megformálásában nyújtott értékes segítségét.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Albert, Z., M. Orlowski, Z. Rzucidlo, J. Orlowska
/1966/: Studies on γ -glutamyl transpeptidase
activity and its histochemical localization
in the central nervous system of man and
different animal species. Acta Histochem.
/Jena/ 25, 312-320.
2. Arnold, W.P., C.K. Mittal, S. Katsuki and F. Murad
/1977/: Nitric oxide activates guanylate
cyclase and increase guanosine 3':5'-cyclic
monophosphate levels in various tissue prepa-
rations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74,
3203-3207.
3. Arunlakshana, O. and H.O. Schild /1959/: Some
quantitative uses of drug antagonists.
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 14, 48-58.
4. Baca, G.M. and G.C. Palmer /1978/: Presence of
hormonally-sensitive adenylate cyclase
receptors in capillary-enriched fractions
from rat cerebral cortex. Blood vessels 15,
286-298.
5. Barbin, G., M. Garbarg, J.C. Schwartz and J. Storm-
-Mathisen /1976/: Histamine synthesizing
afferents to the hippocampal region. J. Neuro-
chem. 26, 259-263.

6. Barrnett, R.J. /1964/: Localization of enzymatic activity at the fine structural level. J. R. Micr. Soc. 83, 143-151.
7. Bartfai, T. /1978/: Cyclic nucleotides in the central nervous system. TIBS, 121-124.
8. Baudry, M., M.P. Martres and J.C. Schwartz /1975/: H_1 - and H_2 -receptors in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea-pig brain slices. Nature 253, 362-363.
9. Becker, C.G., S.R. Shustak /1972/: Contractile protein in endothelial cells: Comparison of cerebral capillaries with those in heart and skeletal muscle and with liver sinusoids. Circulation /Suppl.2./ II-87.
10. Bertler, A., B. Falck, Ch. Owman and E. Rosengren /1966/: The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms. Pharmacol. Rev. 18, 369-385.
11. Bessey, O.A., O.H. Lowry, M.J. Brock /1946/: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem. 164, 321-329.
12. Betz, A.L. and G.W. Goldstein /1978/: Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. Science 202, 225-227.

13. Bevan, J.A. /1978/: Norepinephrine and the presynaptic control of adrenergic transmitter release. Federation Proceedings, vol. 37, No.2.
14. Black, J.W., W.A.M. Duncan, C.J. Durant, C.R. Ganellin and E.M. Parsons /1972/: Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. Nature 236, 385-390.
15. Bradbury, M.W.B., C. S.Patlak and W.H. Oldendorf /1975/: Analysis of brain uptake and loss of radiotracers after intracarotid injection. American Journal of Physiology, Vol. 229, 1110-1115.
16. Brendel, K., E. Meezan and E.C. Carlson /1974/: Isolated brain microvessels: a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. Science 185, 953-955.
17. Brightman, M.W. /1965/: The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. I. Ependymal distribution. J. Cell Biol. 26, 99-123.
18. Brimblecombe, R.W., H.E. Farrington, M.K. Lavender and D.A.A. Owen /1976/: Histamine H₂-receptor antagonists and thermal injury in rats. Burns, 3, 8-13.
19. Brimblecombe, R.W., W.A.M. Duncan, G.J. Durant, J.C. Emmett, C.R. Ganellin and M.E. Parsons /1975/: Cimetidine - a non-thiourea H₂-receptor antagonist. J. Int. Med. Res. 3, 86-92.

20. Brown, B.L., J.D.M. Albano, R.P. Ekins and A.M. Sgherzi /1971/: A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. Biochem. J. 121, 561-562.
21. Brown, D.D., R. Tomchick, J. Axelrod /1959/: The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme. J. Biol. Chem. 234, 2948-2950.
22. Broman, T. and A.M. Lindberg-Broman /1945/: An experimental study of disorders in the permeability of the cerebral vessels /"the blood-brain-barriers"/ produced by chemical and physico-chemical agents. Acta Physiol. Scand. 10, 102-125.
23. Carlson, E.C., K. Brendel, J. Hjelle and E. Meezan /1978/: Ultrastructural and biochemical analyses of isolated basement membranes from kidney glomeruli and tubules and brain and retinal microvessels. Journ. of Ultrastructure Res. 62, 26-53.
24. Cheng, Y.C. and W.H. Prusoff /1973/: Relationship between the inhibition constant / K_i / and the concentration of inhibitor which cause 50 per cent inhibition / I_{50} / of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108.

25. Crone, C. /1963/: The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the "indicator diffusion" method. Acta Physiol. Scand. 58, 292-305.
26. Csanda, E. /1978/: Az agy-oedema és kezelésének időszerü kérdései, Orvosi Hetilap, 119., 49, 2983-2993.
27. Desai, D. and I.K. Ho /1977/: Kinetics of catecholamine sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP-ase activity in mouse brain synaptosomes. Biochemical Pharmacology. 26, 2029-2035.
28. Dismukes, K.R., M. Rogers, J.M. Daly /1976/: Cyclic AMP formation in guinea-pig brain slices: effect of M_1 and M_2 histaminergic agonists. J. Neurochem. 26, 785-790.
29. Durant, G.J., C.R. Ganellin and M.E. Parsons /1975/: Chemical differentiation of histamine H_1 - and H_2 -receptor agonists. J. Med. Chem. 18, 905-909.
30. Edvinsson, L., C. Owman and N.-O. Sjöberg /1976/: Autonomic nerves, mast cells and amine receptors in human brain vessels. A histochemical and pharmacological study. Brain Res. 115, 377-393.
31. Eisenberg, H.M. and R.L. Suddith /1977/: Sodium-potassium ATPase in brain capillaries. Soc. for Neurosci. Abstract 3, 217.

32. El Ackad, T.M. and M.J. Brody /1975/: Evidence for non-mast-cell histamine in the vascular wall. Blood Vessels 12, 181-191.
33. Firth, J.A. /1977/: Cytochemical localization of the K^+ regulation interface between blood and brain. Experientia 33, 1093-1094.
34. Földes, I. and B. Kelentei /1954/: Studies on the haemato-encephalic barrier, II. The effects of histamine with special reference to the passage of antibiotics. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 5, 149-162.
35. Garbarg, M., G. Barbin, J. Feger, J.-C. Schwartz /1974/: Histaminergic pathway in rat brain evidenced by lesions of the medial forebrain bundle. Science, 186, 833-835.
36. Gerristen, M.E., T.P. Parks and M.P. Printz /1979/: Prostaglandin E_2 is the major enzymatic product of endoperoxide $/PGH_2/$ metabolism in isolated bovine cerebral microvessels. Fed. Proc. 38, 752.
37. Goldberg, N.D. and M.K. Haddox /1977/: Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. Ann. Rev. Biochem. 46, 823-896.
38. Goldmann, E.E. /1909/: Die aussere und innere sekretion und kranken organismus im lichte der "vitalen färbung". Beitr. Z. Klin. Chir., 64, 192-265.
39. Goldstein, G.W., J.S. Wolinsky, J. Csejtey, I. Diamond /1975/: Isolation of metabolically active capillaries from rat brain. Journ. of Neurochem. 25, 715-717.

40. Goldstein, G.W., J. Csejtey and I. Diamond /1977/:
Carrier mediated glucose transport in
capillaries isolated from rat brain,
Journal of Neurochemistry, 28, 725-728.
41. Green, J.P., C.L. Johnson and H. Weinstein /1978/:
Histamine as a neurotransmitter, in Psycho-
pharmacology: A generation of Progress
/LIPTON M.A., DI MASCIO A. and KILLAM K.F.,
eds./, Raven Press, New York, 319-332.
42. Greengrad, P. /1976/: Possible role for cyclic
nucleotides and phosphorylated membrane
proteins in postsynaptic actions of neuro-
transmitters, Nature, 260, 101-108.
43. Gömöri, G. /1939/: Microtechnical demonstration
of phosphatase in tissue sections. Proc.
Soc. Exp. Biol. 42, 23-26.
44. Hartman, B.K. /1973/: The innervation of cerebral
blood vessels by central noradrenergic
neurons. In Frontiers in catecholamine
research. /Pergamon Press, New York/ 91-96.
45. Hegstrand, L.R., P.D. Kanof and P. Greengard
/1976/: Histamine-sensitive adenylate
cyclase in mammalian brain. Nature 260,
163-165.
46. Herbst, T.J., M.E. Raichle, J.A. Ferrendelli
/1979/: β -Adrenergic regulation of adenosine
3', 5'-monophosphate concentration in brain
microvessels. Science, 204, 330-332.

47. Hjelle, J.T., J. Baird-Lambert, G. Cardinale, S.Spector and S.Udenfriend /1978/: Isolated microvessels: the blood-brain barrier in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4544-4548.
48. Horton, J.C. and E.T. Hedley-Whyte /1979/: Protein movement across the blood-brain barrier in hypervolemia, Brain Research, 169, 610-614.
49. Huang, M. and G.I. Drummond /1979/: Adenylate cyclase in cerebral microvessels: action of guanine nucleotides, adenosine, and other agonists. Mol. Pharmac. 16, 462-472.
50. Ibrahim, M.Z.M. /1974/: The mast-cells of the mammalian central nervous system. Part I. Morphology, distribution and histochemistry. J. Neurol. Sci. 21, 431-478.
51. Jacobs, S. and P. Cuatrecasas /1977/: The mobile receptor hypothesis for cell membrane receptor action. TIBS, 3, 280-282.
52. Jarrott, B., J.T. Hjelle and S. Spector /1979/: Association of histamine with cerebral microvessels in regions of bovine brain. Brain Research, 168, 323-330.
53. Johnson, C.L. and H. Mizoguchi /1977/: The interaction of histamine and guanyl-nucleotides with cardiac adenylate cyclase and its relationship to cardiac contractility. J. Pharmacol. Exp. Ther. 200, 174-186.

54. Joó, F., T. Várkonyi /1969/: Correlation between the cholinesterase activity of capillaries and the blood-brain barrier in the rat. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.* 20, 359-372.
55. Joó, F. /1972/: Effect on N^6O^2 -dibutyryl cyclic 3':5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice. *Experientia*, 28, 1470.
56. Joó, F. and I. Karnushina /1973/: A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios*, 8, 41-48.
57. Joó F. /1975/: Néhány enzim jelentősége az agyi kapillárisok permeabilitásának szabályozásában. Kandidátusi értekezés.
58. Joó, F., Z. Rakonczay, M. Wollemann /1975.a/: cAMP-mediated regulation of the permeability in the brain capillaries. *Experientia*, 31, 582-583.
59. Joó, F., I. Tóth and G. Jancsó /1975.b/: Brain adenylate cyclase: its common occurrence in the capillaries and astrocytes. *Naturwissenschaften*, 8, 397.
60. Joó, F., A. Szücs, and E. Csanda /1976/: Metiamide-treatment of brain oedema in animals exposed to ^{90}Y ttrium irradiation. *J. Pharm. Pharmac.* 28, 162-163.

61. Joó, F. és I. Karnushina /1978/: Az agyi kapillárisok pinocitózisának és makromolekuláris transzportjának cAMP-mediált szabályozása. MTA Biol. Oszt. Közl. 21, 299-309.
62. Joó, F. /1979.a/: The role of adenosine triphosphatase in the maintenance of molecular organization of the basal lamina in the brain capillaries. Frontiers in Matrix Biology, Ed.: A.M.Robert, R.Boniface and L.Robert. S.Karger, New York, 166-182.
63. Joó, F. /1979.b/: Significance of adenylate cyclase in the regulation of the permeability of brain capillaries. From: Pathophysiology of cerebral energy metabolism. Ed.: B.B.Mrsulja, L.M.Rakié, I.Klatro and M.Spatz. Plenum Publishing Corporation. 211-237.
64. Kanof, P.D., L.R.Hegstrand, P.Greengard /1977/: Biochemical characterization of histamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain. Archives of Biochemistry, and Biophysics, 182, 321-334.
65. Kanof, P.D. and P.Greengard /1978/: Brain histamine receptors as targets for antidepressant drugs. Nature, 272, 329-333.
66. Karnushina, I.L., J.M.Palacios, G.Barbin, E.Dux, F. Joó and J.-C. Schwartz /1979.a/: Histamine-related enzymes and histamine receptors in isolated brain capillaries. Agents and Actions 9, 89-90.

67. Karnushina, I.L., J.M.Palacios, G.Barbin, E.Dux, F.Joó and J.-C.Schwartz /1979.b/: Studies on a capillary-rich fraction isolated from brain: histaminergic components and characterization of the histamine receptors linked to adenylate cyclase. J. Neurochem. /submitted for publication/.
68. Karnushina, I.L., I.Tóth and F. Joó /1979.c/: Presence of guanylate cyclase in rat brain capillaries: histochemical and biochemical evidences. Brain Res. /közlés alatt/.
69. Kolber, A.R., C.R.Bagnell, M.R.Krigman, J.Hayward and P.Morell /1979/: Transport of sugars into microvessels isolated from rat brain: a model for the blood-brain barrier. J. Neurochem. 33, 419-432.
70. Lai, F.M., S.Udenfriend and S.Spector /1975/: Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4622-4625.
71. Landers, J.W., J.L.Chason, J.E.Gonzalez, W.Palutke /1962/: Morphology and enzymatic activity of rat cerebral capillaries. Lab. Invest. 11, 1253-1259.
72. LeBeux, Y.J. and J.Willemot /1978/: Actin-like filaments in the endothelial cells of adult rat brain capillaries. Exp.Neurology, 58, 446-454.

73. Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall
/1951/: Protein measurements with the folin
phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
74. Malik, K.U. /1978/: Prostaglandins - modulation of
adrenergic nervous system. Fed. Proc. 37,
203-207.
75. McGrath, M.A. and J.T. Shepherd /1978/: Histamine and
5-hydroxytryptamine-inhibition of transmitter
release mediated by H_2 - and 5-hydroxytryp-
tamine receptors. Fed. Proc. 37, 195-198.
76. Micic, D., M.E.Swink, I.Klatzo, M.Spatz /1978/:
Transient ischemic alteration of synaptosomal
neutral amino acid uptake. Experientia, 34,
1461.
77. Mrsulja, B.B., B.J.Mrsulja, T.Fujimoto, I.Klatzo
and M.Spatz /1976/: Isolation of brain
capillaries: a simplified technique. Brain
Research, 110, 361-365.
78. Nathanson, J.A. and G.H.Glaser /1979/: Identification
of β -adrenergic-sensitive adenylate cyclase
in intracranial blood vessels. Nature 278,
567-569.
79. Oldendorf, W.H. /1970/: Measurement of brain uptake
of radiolabeled substances using a tritiated
water internal standard. Brain Research, 24,
372-376.



80. Oldendorf, W.H. /1971/: Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines and hexoses after arterial injection. *Physiology*, 221, 1629-1639.
81. Oldendorf, W.H. /1974/: Blood-brain barrier permeability to drugs. *Ann. rev. of pharmacol.* 14, 239-248.
82. Orlowski, M., G.Sessa and J.P.Green /1974/: γ -glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood brain barrier for aminoacids. *Science*, 184, 66-68.
83. Owen, D.A.A. /1977/: Histamine receptors in the cardiovascular system. *Gen. Pharmac.* 8, 141-156.
84. Palacios, J.M., M. Garbarg, G.Barbin and J.-C.Schwartz /1978/: Pharmacological characterization of histamine receptors mediating the stimulation of cyclic AMP accumulation in slices from guinea-pig hippocampus. *Mol. Pharmacol.* 14, 971-982.
85. Parsons, M.E., D.A.A.Owen, C.R.Ganellin and G.J.Durant /1977/: Dimaptrit-/S-/3-(N,N-dimethylamino) propyl/ isothiourea/ - A highly specific histamine H₂-receptor agonist. Part I. Pharmacology, Agents and Actions, 7, 31-37.
86. Persinger, M.A. /1977/: Mast cells in the brain : Possibilities for physiological psychology. *Phys. Psychology*, 5, 166-176.

87. Picatoste, F., I. Blanco and J.M. Palacios /1977/:
The presence of two cellular pools of
rat brain histamine. J. Neurochem. 29,
735-738.
88. Pickard, J.D., F. Durity, F.A. Welsh, T.W. Langfitt,
A.M. Harper and E.T. MacKenzie /1977/:
Osmotic opening of the blood-brain barrier:
value in pharmacological studies on the
cerebral circulation. Brain Research,
122, 170-176.
89. Psychoyos, S. /1978/: H_1 - and H_2 -histamine
receptors linked to adenylate cyclase in
cell-free preparations of guinea pig
cerebral cortex. Life Sciences, 23, 2155-2162.
90. Raichle, M.E., B.K. Hartman, J.O. Eichling, L.G. Sharpe
/1975/: Central noradrenergic regulation of
cerebral blood flow and vascular permeabi-
lity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72,
3726-3730.
91. Rapoport, S.I. /1976/: Blood-brain barrier in
physiology and medicine. Raven Press, New
York.
92. Rathbun, W.B. and M.V. Betlach /1969/: Estimation of
enzymatically produced orthophosphate in the
presence of cysteine and adenosinetriphosphate.
Anal. Biochem. 28, 436-445.
93. Reese, T.S., M.J. Karnovsky /1967/: Fine structural
localization of a blood-brain barrier to
exogenous peroxidase. J. Cell Biol. 34,
207-217.

94. Reik, L., G.L.Petzold, J.A.Higgins, P.Greengard,
and R.J.Barrnett /1970/: Hormone-sensi-
tive adenyl cyclase: cytochemical
localization in rat liver. Science, 168,
382-384.
95. Reynolds, E.S. /1963/: The use of lead citrate
at high pH as an electron opaque stain
in electron microscopy. J. Cell Biol.
17, 208-212.
96. Robert, A.M., G.Godeau, M.Miskulin, F.Moati
/1977/: Mechanism of action collagenase
on the permeability of the blood-brain
barrier. Neurochemical Research, 2, 449-455.
97. Saito, T. and H.Keino /1976/: Ultrastructural
demonstration of guanylate cyclase activity
in rat kidney. Fifth Internat. Congress of
Histochemistry, 303, Bucharest-Romania.
98. Schayer, R.W. /1973/: Histamine and microcircula-
tion. Life Sciences, 15, 391-401.
99. Scheid, C.R., T.W.Honeyman, F.S.Fay /1979/:
Mechanism of β -adrenergic relaxation of
smooth muscle. Nature, 277, 4-10.
100. Schwartz, J.-C. /1976/: Histamine as a transmitter
in brain. Life Sciences, 17, 503-518.
101. Schwartz, J.-C. /1977/: Histaminergic mechanism
in brain. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.
17, 325-339.

102. Schwartz, J.-C., J.M.Palacios, G.Barbin, Th.T.Quach,
M.Garbarg and H.L.Haas, P.Wolf /1977/:
Histamine receptors in mammalian brain :
characters and modifications studied
electrophysiologically and biochemically.
Histamine Receptors, ed. T.O.Yellin,
Spectrum, New York.
103. Schultz, G., J.G.Hardman, K.Schultz, C.E.Baird,
and E.W.Sutherland /1973/: The importance
of calcium ions for the regulation of
guanosine 3':5'-cyclic monophosphate
levels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70,
3889-3893.
104. Selivonchick, D.P. and B.I.Roots /1977/: Lipid and
fatty acyl composition of rat brain
endothelia isolated by a new technique.
Lipids, 12, 165-169.
105. Sellinger, O.Z., J.M.Azcurra, D.E.Johnson,
W.G.Ohlsson, Z.Lodin /1971/: Independence
of protein synthesis and drug uptake in nerve
cell bodies and glial cells isolated by a
new technique. Nature New Biology, 230,
263-256.
106. Sessa, G., M.Orlowski and J.P.Green /1976/:
Isolation from bovine brain of a fraction
containing capillaries and a fraction
containing membrane fragments of the choroid
plexus. J. Neurobiol. 7, 51-61.

107. Shepherd, J.T. /1978/: Alteration in activity of vascular smooth muscle by local modulation of adrenergic transmitter release. Fed. Proc. 37, 179-180.
108. Shepherd, J.T., R.R.Lorenz, G.M.Tyce and P.M.Vanhoutte /1978/: Acetylcholine-inhibition of transmitter release from adrenergic nerve terminals mediated by muscarinic receptors. Fed. Proc. 37, 191-194.
109. Snyder, S.H., K.M.Taylor /1972/: Histamine in the brain: a neurotransmitter? In Perspectives in Neuropharmacology ed. S.H.Snyder; 43-73. N.Y. Oxford Univ. Press.
110. Spatz, M., B.B.Mrsulja, D.Micic, B.J.Mrsulja and I.Klatzo /1977/: Ischemic and post-ischemic effects on the 2-deoxy-D-³H/glucose uptake in cerebral capillaries. Brain Research, 120, 141-145.
111. Spatz, M., D.Micic, B.B.Mrsulja, M.Swink and J.Micic /1978/: Changes in the capillary lactate and 2-deoxy-D-glucose uptake in developing brain. Brain Research, 151, 619-622.
112. Steiner, A.L., R.E.Weelman, C.W.Parker and D.M.Kipnis /1972/: Radioimmunoassay for the measurement of cyclic nucleotides. In:Advances in cyclic nucleotide research, 2, 51-61. Raven Press. New York.

113. Study, R.E., X.O.Breakefield, T.Bartfai,
P.Greengard /1978/: Voltage-sensitive
calcium channels regulate guanosine
3',5'-cyclic monophosphate levels in
neuroblastoma cells. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 75, 12, 6295-6299.
114. Suddith, R.L., J.S.Crawford and H.M.Eisenberg
/1978/: Isolated brain microvessels: sodium-
-potassium ATP-ase and potassium transport.
J. Cell Biol.79, 103a.
115. Sun, A.Y. and T.Samorajski /1970/: Effects of
ethanol on the activity of adenosine-
-triphosphatase and acetyl-cholinesterase
in synaptosomes isolated from guinea pig
brain. J.Neurochem. 17, 1365-1372.
116. Sutherland, E.W., T.W.Rall and T.Menon /1962/:
Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation
and properties. J. Biol. Chem. 237, 1220-1227.
117. Szasz, G. /1969/: A kinetic photometric method for
serum γ -glutamyl transpeptidase. Clin.
Chem. 15, 124-136.
118. Taylor, K. and S.H.Snyder /1972/: Isotopic micro-
assay of histamine, histidine decarboxylase,
histamine methyltransferase in brain tissue.
J. Neurochem, 19, 1343-1358.
119. Torack, R.M. and R.J.Barnett /1964/: The fine
structural localization of nucleoside phos-
phatase activity in the blood-brain barrier.
J.Neurophat. exp.Neurol. 23, 46-59.

120. Verhaeghe, R.H., R.R.Lorenz, M.A.McGrath,
J.T.Shepherd and P.M.Vanhoutte /1978/:
Metabolic modulation of neurotransmitter
release-adenosine, adenine nucleotides,
potassium, hyperosmolarity, and hydrogen
ion. Fed. Proc. 37, 207-211.
121. Wagner, R.C., P.Kreiner, R.J.Barnett and
M.W.Bitensky /1972/: Biochemical characteriza-
tion and cytochemical localization of a
catecholamine-sensitive adenylate cyclase
in isolated capillary endothelium. Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 11, 3175-3179.
122. Weibel, E.R., G.S.Kistler and W.F.Scherle /1966/:
Practical stereological methods for
morphometric cytology. J. Cell. Biol.
30, 23-38.
123. Westergaard, E. and M.W.Brightman /1973/:
Transport of protein across normal cerebral
arterioles. J. Comp. Neurol. 152, 17-44.
124. Wollenberger, A., W.Schulze and E.G.Krause /1973/:
Cytochemical examination of the effect of
histamine on adenylate cyclase activity in
guinea pig heart tissue. J.Mol. and Cel.
Cardiology, 5, 421-427.
125. Zimmerman, B.G. /1978/: Actions of angiotensin
on adrenergic nerve endings. Fed. Proc.
37, 199-202.

