

Diss. B 775

A Pentobarbital gátló hatása egyes aminosavak  
anyagcserejére

D o k t o r i é r t e k e z é s

A József Attila Tudományegyetem Természettudományi  
Karához benyújtja

Kiss Zoltán

Készült a József Attila Tudományegyetem Állatélettani  
Intézet Biokémiai Csoportjában Dr. Fehér Ottó és  
Dr. Matkovics Béla vezetésével

S z e g e d

1971



Diss. B 775



Az értekezésben használt rövidítések

Ach	- Acetylcholin
AchE	- Acetylcholineszteráz /3/ 1. 1. 7 <sup>+</sup> /
L-Ala	- L-Alanin
AlKT	- L-Alanin-L-Ketoglutársav Transzamináz /2. 6. 1. 2/
AlOT	L-Alanin-Oxálecetsav Transzamináz
Asp	- Aszparaginsav
AszKT	- Aszparaginsav-L-Ketoglutársav Transzamináz /2. 6. 1. 1/
EPSP	- Excitatorikus postsynaptikus potenciál
GABA	- Gamma-aminovajsav
GABA-T	- Gamma-aminovajsav-L-Ketoglutársav Transzamináz /2. 6. 1. 19/
GOH	- Glutaminsavdehidrogenáz /L-glutamate:NAD oxido- reductase, 1. 4. 1. 2/
Glu	- Glutaminsav
Glu-NH <sub>2</sub>	- Glutamin
GOT	- Glutaminsav-Oxálecetsav Transzamináz /2. 6. 1. 1/
GNPT	- Glutamin-Piroszőlősav Transzamináz
GPT	- Glutaminsav-Piroszőlősav Transzamináz /2. 6. 1. 2/

\*Barman /13/ osztályzása szerint

## Tartalom

B e v e z e t é s . . . . .	1	oldal
I r o d a l m i r é s z . . . . .	2	"
A görcs mechanizmusa . . . . .	2	"
A görcsgátlás mechanizmusa. Barbiturátok . . . . .	7	"
A barbiturátok hatása az aminosavanyag- cserére. Munkahipotézis . . . . .	13	"
M ó d s z e r . . . . .	18	"
A preparátum előkészítése. Ingerlés . . . . .	18	"
Aminosav meghatározás . . . . .	20	"
E r e d m é n y e k . . . . .	28	"
Az aminosavszint alakulása a kontrol el- távolítása után . . . . .	28	"
Az aminosavszint változása pentobarbitalos narkózis alatt . . . . .	28	"
Az aminosavszint változása ingerlés után . . . . .	29	"
A GOT vizsgálata . . . . .	35	"
A GDH vizsgálata - . . . . .	35	"
Az AszKt vizsgálata . . . . .	36	"
Az ALKT és ALOT vizsgálata . . . . .	39	"
A GABA-T vizsgálata . . . . .	40	"
M e g b e s z é l é s . . . . .	45	"
Ö s s z e g z é s . . . . .	52	"
I r o d a l m i j e g y z é k . . . . .	54	"

## I.

### Bevezetés

Dolgozatom fő célja beszámolni azokról a tapasztalatokról, amelyeket egy görcsgátló vegyület vizsgálata során nyertünk.

A görcs kísérletes kiváltása igen fontos kutatási eszköz. Egyrészt segít a neuronális folyamatok részmechanizmusainak megértésében, másrészt olyan görcsgátló szerek kikísérletezését eredményezte a múltban és fogja eredményezni a jövőben, amelyek az epilepsziás rohamok gyógykezelésére szolgálnak.

Kísérleteinkben arra igyekeztünk választ kapni, hogy a görcs különböző szakaszaiban mutatkozó anomáliáknak az aminosav anyagcserében van-e valami jelentősége a görcs kiváltásában, intenzitásában vagy időtartamában? Másképpen fogalmazva, az aminosavanyagcsere megváltozása befolyásolja-e a neuronális aktivitás fokát, vagy a neuronális aktivitás megváltozásának következménye-e az aminosavanyagcserében mutatkozó zavar?

Problémafelvetésünk részletesebb kifejtése előtt szükségesnek tartjuk összefoglalni a görcs keletkezési és gátlási mechanizmusának legáltalánosabb jegyeit, és az ezekben fontos szerepet játszó azon elektrofiziológiai és biokémiai folyamatokkal foglalkozó irodalmat, amely szorosan kapcsolódik témánkhoz.

## II.

### Irodalmi rész

#### A görcs mechanizmusa

Klinikailag pszichomotoros epilepsziát /kérgi eredetű/, továbbá "grand mal"-t és "petit mal"-t /mindkettő centrencephalikus eredetű/szoktak megkülönböztetni. Az epilepsziás "nagy roham" /grand mal/ legfeljebb néhány percig tartó eszméletvesztéses állapot, amelyben mind a négy végtagon, valamint a nyak izomzatában először tónusos görcsök támadnak, amelyeket azután klonusos rángások követnek. A nagy rohamok halmozottan alakulnak ki, és súlyos állapotot idézhetnek elő /"status epilepticus"/. A "kis roham" /petit mal/ másodpercekig tartó tudatvesztéses állapot, amely főleg gyermekkorban alakul ki és egy nap alatt halmozottan igen sokszor jelentkezhet.

Kísérletre alkalmas görcsöket lehet kiváltani kémiai anyagokkal /kemoshock/, az agy elektromos izgatásával /elektroshock/, alkalmas agyi laesiókkal /kísérletes focialis epilepszia/ és néhány species esetében hangingerrel. A legtöbb központi idegrendszeri izgató szer nagy adagban görcsöt okoz. Ennek oka lehet a vegyület közvetlen görcsokozó hatása, de számos esetben indirekt uton /asphyxia, extrém hőmérséklet növekedés, kalcium vagy cukorszint csökkenés a vérben, stb./ alakul ki a görcs. Általában a görcsokozókat corticalis, centrencephalikus illetve spinalis támadáspontuakra osztják. A görcskeltők celluláris szintű hatás-

módjuk alapján aszerint is megkülönböztethetők, hogy miként hatnak a pre- illetve a posztszinaptikus gátlásra. A sztrichnin pl. csak a posztszinaptikus gátlást függeszti fel, amíg a picrotoxin csak a preszinaptikus gátlást /76/.

A görcsös rohamot a paroxysmalis hyperszinkronizáció jellemzi, amely a dendritaktivitás szinkronizációját jelenti, ahol a funkcionálisan össze nem függő neuronok kisülése szinkronizálódik /78/. Az epilepsziás fókuszcsoport alacsony ingerküszöbvel rendelkezik és ez vonatkozik a vele kapcsolatban álló képződményekre is. Az epilepsziás neuron autonóm aktivitása lényegében dendrit depolarizációnak felel meg, amely repetitív spike aktivitást eredményez /78; 113; 128/. Ezen potenciálok áramlásakor az intercalaris neuronok is aktiválódnak.

Biokémiai szempontból a görcs leginkább a nagy energiafogyasztással jellemezhető. Az ATP és a Kreatinfoszfát mennyisége nagy mértékben csökken a görcs folyamán, függetlenül attól, hogy milyen módszerrel váltották ki a görcsöt /47; 63; 71; 72; 102; 120/. A makroerg foszfátkötést tartalmazó vegyületek szintje az agyban közvetlenül összefügg a glükóz anyagcsere alakulásával. Görcs alatt a glükóz lebontása jelentősen növekszik /63; 102/, a kezdeti szakaszban meghaladja a 10 mikromol/g/perc-t /84/, amely mintegy tízszerese a normál glükóz fogyasztásnak.

A görcs kialakulásával párhuzamosan az egyes aminosavak szintjében is jellemző változás áll be. A glutaminsav mennyisége a görcs kezdeti fázisában csökken a legtöbb agyrészletben /19; 38; 102; 106; 122/, majd későbbi fázisban eléri, sőt meghaladja a kontrol szintet. Kivétel a Hyppe-

campus, ahol a görcs minden szakaszában növekszik a glutaminsavtartalom /75; 156/. Erre alapozva Wiechert és Göllnitz /75; 156/ szerint a Hypocampus különösen fontos szereppel bír a görcs kialakulásában.

A glutamin szint szintén csökken a görcs kezdeti szakaszában /38; 48; 102; 106/, mennyisége azonban gyorsan helyreáll, amely érthetővé válik ha megfontoljuk, hogy a glutaminsav-glutamin rendszer az ammónia eltávolításának egyik fő útja az agyban /22; 84; 102; 117; 152/. Az aszparaginsav mennyisége a görcs minden fázisában csökken, míg az l-alanin mennyisége kezdeti csökkenés után gyors emelkedést mutat /106/. A GABA tartalom a prekonvulzív stádiumban csökken /106/, a posztkonvulzív stádiumban viszont emelkedik /102/.

Sok szerző a neuronális aktivitás alakulása szempontjából nagy jelentőséget tulajdonít a glutaminsav-glutamin-GABA trio mennyiségi és egymáshoz viszonyított arányuk alakulásának /75; 79; 80; 156/. A glutaminsav az idegsejtek membránját depolarizálja és így mint ingerlő mediátor funkcionálhat, bár ez utóbbi lehetőség egyelőre csak feltételezés maradt /28; 39; 79; 80; 84; 90; 102; 117/.

A GABA a rágok idegrendszerében gátló mediátor funkciót teljesít /15/ és fennáll annak lehetősége, hogy a gerincesek központi idegrendszerében is betöltse ezt a szerepet, de ez sincs még meggyőzően bizonyítva /28; 65; 84; 85; 108; 137; 138/. A glutaminsav és a GABA mediátor jellegét feltételezve egyes kutatók szerint a görcs kiváltásában a glutaminsav mennyiségének illetve a glutaminsav-



GABA arány megváltozásának fontos szerepe lehet /75; 156/. Hasonlóan fontosságot tulajdonítanak sokan a GABA-nak a görcs feltartóztatásában /59; 85; 95; 125; 132/. Más kutatók szerint a GABA mennyiségének növekedése és a görcsgátlás foka között nincs összefüggés /1; 2; 30; 106; 144; 157/. Számítások szerint mindenesetre a GABA elegendő mennyiségben van jelen az idegvégződésekben ahhoz, hogy esetleges gátló hatását érvényesíteni tudja /80; 82; 137; 138/.

A görcs mechanizmusában az aminosavak lehetséges szerepe nem szűkül le feltételezett mediátor jellegükre. Az aminosavak - különösen a glutaminsav - jelentős mértékben oxidatív szubsztrátként szerepelnek az agyszövet anyagcseréjében és görcs folyamán fokozottabb az ilyen célokra történő felhasználás mértéke /63; 84; 102; 106; 117/. Weilmalherbe /152/ megállapítása szerint növekvő neuronális aktivitás során az idegsejt energiaszükséglete meghaladja azt a határt, amelyet a glükóz lebontás tud biztosítani és ebben az esetben az aminosavak mint segédenergiaforrás szerepelnek.

A görcs mechanizmusának biokémiájában fontos szerepet játszhatnak a mediátor anyagok. Az acetylcholin mennyisége csökken a görcs alatt /22; 63; 117/, amely megfelelhet a kötött állapotból való felszabadulás és az AchE-al történő elbontás sebességének gyorsulásának.

Van olyan elképzelés, hogy a monoaminok szintjének változása játszik szerepet a görcs létrehozásában illetve

érzékenységében /29/. Az tény, hogy a MAO gátlók általában görcsgátlóak /157/.

A *d*-phenilhydantoin, amely hatásos görcsgátló, az agy szerotonin tartalmát megemeli /7; 30/. Shapdryver /109/ szerint az aktuális dopamin szint az agyban meghatározó tényező a görcs keletkezése szempontjából.

Jelenleg nincs egységes és bizonyított magyarázat a görcs keletkezésének mechanizmusára vonatkozóan. A 40-es éves végén a kutatók az agy ammónia szintjének növekedésében látták a görcs okát /29; 125/ és ez az elképzelés még a legújabb irodalomban is felmerül /104/ annak ellenére, hogy többen - s ezek közül legmeggyőzőbben Takahashi /78/ - kimutatták, hogy az agy ammóniaszintje és elektromos aktivitása között nincs összefüggés. A görcs keletkezésének magyarázatát többen az intra- és extracelluláris ionkoncentráció megváltozásának tényével próbálják nyújtani. Az idevonatkozó eredmények közül kiemelkedik Woodbury /78/ felfedezése. Ennek lényege az, hogy a görcs előtti fázisban növekszik az intracelluláris Na mennyisége az agyban, amely az idegsejt membránjának növekvő depolarizációját idézi elő. Egy új szempontra világítanak rá Nairo /103/ eredményei, miszerint a szénsav anhidrázt gátló anyagok görcs gátlónak bizonyultak. A szerző szerint ezt a hatást a kialakuló CO<sub>2</sub> felesleg okozza. Grand mal esetében viszont jóval nagyobb enzimaktivitást találtak az agyban. Cytokémiai vizsgálatok ugyanakkor kiderítették, hogy az enzim a gliában lokalizálódik. Ez az eredmény arra utal, hogy az intracelluláris pH

alakulása komoly szerepet játszhat ha nem is a görcs kiváltásában, de annak érzékenységében.

A görcs folyamán tapasztalható esetleges ultrastrukturális változásokról eddig még nem számoltak be. Ilyen azonban elképzelhető, amelyre Bazán /14/ eredményei alapján gondolhatunk, aki azt tapasztalta, hogy a szabad zsírsavak mennyisége megnő görcs alatt, amely a foszfolipáz-A aktivitás növekedésével kapcsolatos.

A görcs biokémiájának vázlatos tárgyalása során főleg azokban a folyamatokban történő változást emeltük ki, amelyek általában a görcs minden típusában előfordulnak.

A görcs keletkezési mechanizmusának értelmezését rendkívül megnehezíti az a tény, hogy a különböző görcskiváltó ágensek a jelek szerint különböző mechanizmus alapján hatnak, épp ezért fontos azoknak a jegyeknek a kiemelése, amelyek minden görcstípusban hasonlóak.

#### A görcsgátlás mechanizmusa. Barbiturátok

A görcs gátlásának mechanizmusáról még nagyon keveset tudunk. Mint ahogyan a görcs kiváltása is sokféle módon lehetséges, ugyanugy a különböző görcsgátló szerek hatásmechanizmusa is különböző. Tulajdonképpen a legtöbb központi idegrendszeri gátlást okozó vegyület görcsgátló is /legalábbis a görcs valamelyik típusát gátolja/, legfeljebb a hatás kifejtéséhez szükséges anyagmennyiségben vannak eltérések.

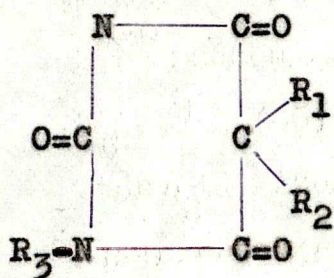
A klinikai görcs kialakítását gátló anyagok bizonyos

körében van kémiai rokonság. Így pl. szerkezetileg nagy hasonlóság van /96/ a barbiturátok, hidantoinok, pirimidionok, szukcinimidek, acilkarbamidok és az oxazolidin-2,4-dionok között /1. ábra/. Ugyanakkor más klinikailag hatásos görcsgátlók között nincs ilyen hasonlóság. Feltételezik, hogy a görcsgátló hatásban a használatos szerek térstrukturája játszik szerepet és a görcsgátló szerek ebben lennének hasonlóak. A fentiek értelmében azonban több szer hatását nem tudnánk megmagyarázni. A legegyszerűbb példa erre a Br, amelyet már régóta használnak az epilepszia kezelésére. A barbiturátok egy csoportja leghasználatosabb szedato-hipnotikumok. Bár vannak a barbiturátok között görcsokozóak /36/, mi a depresszív hatású barbiturátokkal foglalkozunk.

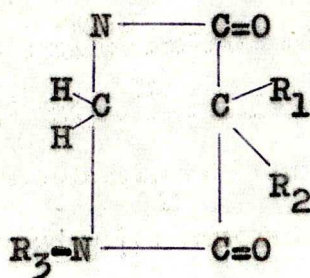
A barbiturátok már altató dózisban csökkentik a légzőközpont ingerlékenységét. Toxikus adagban légzébénulást okoznak. Csökkentik az alapanyagcserét, ezért hyperthyreosisban szenvedők számára jó hatású /76/. A barbiturátok mindenekelőtt a központi idegrendszerre ható vegyületek. A régebbi feltételezéssel ellentétben /76/ valószínűleg nem változtatják meg a motorikus neuronok kisülési küszöbértékét /150/. A barbiturátok kétségtelenül redukálják az EPSP amplitudójának nagyságát /150/, ez azonban nem jellemezhető a membrán ionos vezetésében történő megváltozással, mert sem a bemeneti rezisztencia sem az unit potenciál amplitudója nem változik meg a drog alkalmazásakor. Ugyanakkor egyes kutatók kimutatták, hogy a barbiturátok nagy-

1. ábra

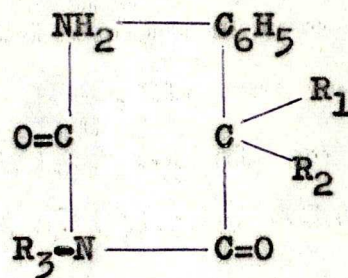
Néhány görcsgátló vegyület szerkezete



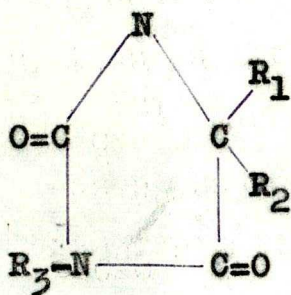
Barbiturátok



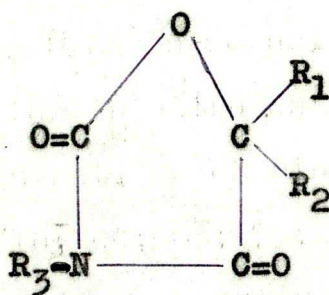
Pirimidindionok



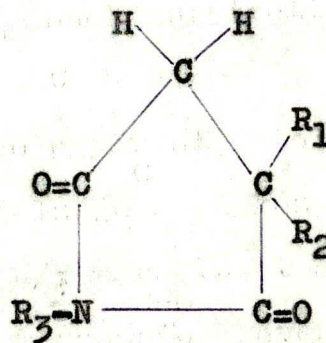
Acilkarbamidok



Hidantoinok



Oxazolidin-2,4-dionok



Szukcinimidek

mértékű változást okoznak az egyes idegsejtek szenzitivitásában. A hexo- és pentobarbital gátló hatása a macska nucleus caudatusában /127/. A pentobarbital csökkenti a Betz sejtek Ach érzékenységét /35; 79/.

Barbiturát narkózis alatt jellegzetes orsó aktivitás mutatkozik /131/, amely többé-kevésbé szabályozott sorozatu hullámokból áll, és ezekben az éles felszíni negatív fázis van túlsúlyban /2 a ábra/. A barbiturát orsók frekvenciája 9-11 c/sec. Sokan tanulmányozták a barbiturát orsók eredetét /3; 4; 5; 61; 62; 131/. A tények azt jelzik, hogy a corticalis barbiturát orsók képződése sok talamikus sejt egyidejű kisülésén alapszik. A corticalis orsó hullámok valószínűen a talamo-corticalis rostok aktivitása révén képződnek és ez a kéregalatti pace-maker mechanizmus a kéregtől függetlenül működik. A talamuszban sok fakultatív pace-maker van, amelyek mindegyike a kéreg egy jól körülhatárolt és viszonylag kicsiny területe felé sül ki, különböző frekvenciával. Az anesztezia mélyülésével párhuzamosan a talamikus magvak /pace-makerek/ közötti kapcsolatok gyengülnek. Ugyanakkor erősödik az orsó aktivitásnak a talamusz és kéreg közötti pont a ponthoz való lokalizációja.

A barbiturátok intracelluláris támadáspontjáról sok adat ismert. Az axonalis vezetést nem befolyásolják /44/ és a fentebb tárgyaltakat figyelembevéve a legvalószínűbb támadáspont a szinapszisokban van. Weakly /150/ a gerincvelői monoszínaptikus reflex válaszokat vizsgálta és eredményei szerint a pentobarbital már szubanesztetikus mennyi-

ségben /10 mg/kg macska/ gátolta azokat. Ennek oka véleménye szerint az ingerlő mediátor felszabadulásának gátlása. Ezt a tényt támasztja alá Mitchell /99/. Megállapította, hogy az anesztezia alatt növekvő Ach tartalom /63; 120/ nem jellemezhető az Ach szintézis serkentésével, vagy az AchE gátlásával, kizárólag a csökkent mértékű felszabadulással.

Eccles /42; 43/ vizsgálatai a preszinaptikus gátlásra vonatkozóan arra mutatnak, hogy anesztezis alatt a gátló mediátor akciója elhúzódik. Ennek elvileg két oka lehet. Az anesztetikumok gátolják a gátló mediátort bontó enzimet, vagy magát a mediátor eljutását a szinaptikus részbe. Az utóbbi lehetőség fiziko-kémiai kölcsönhatások kialakulását feltételezné az anesztetikum és a membrán valamely alkotórésze között. In vitró körülmények között /49/ bizonyították azt, hogy a lecitin és a kloroform között létrejöhet olyan képződmény /mikrokristályos rendszer/, amely bizonyos helyeken diffúziós barrierként szerepelhet.

Barbiturát anesztezia alatt a noradrenalin, szerotonin és a dopamin szint is emelkedik az agyban /124/.

A barbiturátok támadáspontjával kapcsolatos kérdés az, hogy az agy mely részleteiben kifejezettebb a hatásuk. A régebbi felfogás szerint minden alátó azonos mechanizmus alapján hat. Anokhin /55/ volt az első kutató aki feltételezte azt, hogy nincs általános anesztezia, hanem az anesztetikumok egyes agyrészletek vonatkozásában bizonyos szelektivitással bírnak. Golovchinsky /55/ szerint a barbiturátok elsődlegesen az agytörzsi formatio reticularisban

hatnak míg pl. az éter a kéregben. Ezt már French /55/ is megállapította, szerinte azonban egy adott terület érzékenysége valamilyen neurotróp anyagra a szinapszisok számától függ. Sokkal valószínűbb azonban, hogy egy agyrészlet érzékenysége a szinapszisok minőségétől és nem számától függ /66; 68/. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a gerincvelő bizonyos monoszínaptikus potenciáljai sokkal érzékenyebbek az aneszteziás szerekre, mint a poliszínaptikusak /55; 68/.

A Az elektrofiziológiai kutatásokkal párhuzamosan bebizonyosodott, hogy a barbiturátok bonyolult módon és több helyen is "beleszólnak" az idegsejtek anyagcseréjébe.

A neuronális aktivitás növekedése növekvő energiafogyasztással és termeléssel jár együtt. Ennek fordítottja igaz az aktivitás csökkenésekor.

A barbiturátok *in vitro* és *in vivo* egyaránt gátolják az agyszövet légzését. Ennek mintegy jelzője a glükóz lebontás gátlása /10; 44; 63; 73; 96; 158/. Barbiturát anesztezia alatt a glükóz fogyasztás csaknem százszor kevesebb /0,16 mikromol/g/perc/, mint görcs alatt és tízszer kevesebb mint nyugalomban /84/. Ez az érték más típusú anesztetikumok esetében is hasonló /54; 63/, amelyet jól illusztrálnak a citrát ciklus közti termékeinek mennyiségi alakulásában mutatkozó azonosságok /54/.

A glükóz lebontás gátlása azonban nem jár együtt az ATP és Kreatinfoszfát tartalmának csökkenésével /89; 98/, sőt egyesek szerint növekszik szintjük /54; 63/. Az ADP és AMP mennyisége ugyanakkor csökken. Ez csakis úgy lehetséges, ha az energiatermelő folyamatok gátlásával



egyidőben bizonyos energiafogyasztó folyamatok is gátlás alá kerülnek.

A barbiturátok tehát az energiaanyagcserét erősen módosítják, de ennek részletei nem ismertek. Amióta felfedezték, hogy az amytal /5-ethyl-5-isoamil barbiturát/ in vitro hatásosan gátolja a redukált difoszfopiridinnukleotidok oxidációját, sokan feltételezték, hogy a barbiturátok hatása abban lehet, hogy a mitochondriumban gátolják az elektron átvitelt és az oxidatív foszforilációt /22; 73; 84; 118/. Kiderült azonban, hogy a pentobarbital alig, az éter pedig egyáltalán nem befolyásolja az elektron átvitelt /54/. Feltételezik, hogy in vivo az amytal sem ezen az úton gátolja az anyagcserét /54/.

#### A barbiturátok hatása az aminosavanyagcserére. Munkahipotézis

Az eddig tárgyaltak alapján nyilvánvaló, hogy a neuronális aktivitás a legnagyobb mértékben összefügg az energiaanyagcserével. Az agyban a glükóz a fő oxidálható szubsztrát. A görcs alatti hiperaktivitás alatt azonban aminosavak is oxidálódnak. A kérdés az, hogy az aminosav oxidáció növekedése bír-e valamilyen jelentőséggel a görcs kifejlődése szempontjából, vagy ez csak következménye a neuronális aktivitás növekedésének.

Goldberg /54/ három anesztetikum hatását vizsgálta a glükóz lebontásra. A fenobarbital /görcsgátló/, az amytal /nem elsődlegesen görcsgátló/ és az éter /nem görcsgátló/ a citrát ciklus köztitermékeinek szintjét egymáshoz teljesen

hasonlóan változtatta meg. Ennek alapján feltételezhető a gátlás azonos jellege. Arra kellett gondolnunk, hogy a görcsgátló fenobarbital a glükóz lebontáson kívül más, az energiaszférával összefüggő olyan folyamatokat is gátol, amelyek fontosak lehetnek a görcs kialakulása szempontjából. Ilyen folyamat lehet az aminosavak oxidációja. Ebből a szempontból relative nagy mennyiségük és az anyagcserében betöltött szerepük miatt a következő aminosavak bírnak nagy fontossággal: glutaminsav, glutamin, aszparaginsav, l-alanin és a GABA. Ezek az aminosavak a citrát ciklushoz szorosan kapcsolódnak. Szintézisük gyorsasága függ a citrát ciklus lefolyásának sebességétől /22; 41; 84; 117; 122; 126; 129; 148/. C<sup>14</sup>-glükózzal végzett vizsgálatok kimutatták, hogy barbiturát anesztezia alatt a glutaminsav, glutamin és az aszparaginsav jelölése csökkent /10; 84; 93; 148/. Thiopentalos /etil-metil-butiril-szulfo barbital/ altatás alatt a glutaminsav és a GABA mennyisége csökken, a glutamin szint változatlan, az aszparaginsav mennyisége kis mértékben növekszik /84/. Meg kell jegyezni, hogy a thiopental egy ultrarövid hatású narkotikum/. Feltételeztük, hogy a barbiturát anesztezia alatti csökkent aminosav jelölés oka nemcsak a glükóz lebontás gátlása következtében csökkenő ketosav szintben van. Ez a gátló hatás közvetlenül megnyilvánulhat a GDH és egyes transzaminázok szintjén is.

Azt reméltük, hogy ha valamelyik enzim/ek/ esetében a pentobarbital gátló hatását sikerül kimutatni, úgy ennek szerepét az egyes kompartmentek vonatkozásában tudjuk tárgyalni.

Ismeretes, hogy az aminosavak anyagcseréje az agyban kompartmentalizálódik /84/. A kutatók abban nem biztosak, hogy mennyi a kompartmentek száma, de legalább kettővel számolni kell az eddigi adatok alapján /16; 17; 18; 51; 107; 123/.

Az aminosavakhoz hasonlóan a citromsav ciklus is kompartmentalizálódik /20; 21/. A két kompartmentet az irodalomban "nagy" /large/ és "kis" /small/ kompartmentnek nevezik.

A két kompartment anyagcsere típusa különböző, amely visszavezethető az eltérő típusu, illetve enzimrendszerű mitokondriumaikra.

Míg a nagy kompartmentben túlnyomórészt a glükóz oxidációja biztosítja az energiát, addig a kis kompartmentben a glükóz mellett nagy jelentőséget kap egyéb szubsztrátok /főleg aminosavak és zsírsavak/ oxidálása is /16, 17; 18; 20; 21; 51/.

A mi szempontunkból különösen a következő felismerések nagyon jelentősek:

- a./ A glutaminsav szintet nem ugyanazok az enzimek szabályozzák a két kompartmentben. A nagy kompartment glutaminsav szintjét a GOT és az AszKp, míg a kis kompartmentét a reverzibilisen működő GDH szabályozza /84/.
- b./ A glutamin a kis kompartment fiziológiásan aktiv glutaminsavából képződik, míg felhasználása a nagy kompartmentben történik.

Az aminosavak kompartmentalizálódása nehezíti a kísérletek értékelését több okból is.

Nem tudjuk azt, hogy az elkülönülésnek van-e morfológiai

alapja. Egyesek szerint a kis kompartment a gliában, a nagy pedig a neuronokban van /24; 25; 51; 60/. Ez az állítás azonban még korántsem bizonyított.

Az *in vivo* kapott eredményekből jelenleg még nem tudjuk megmondani, hogy az aminosavanyagcserében bekövetkezett változások melyik kompartmentben történtek. Ennélfogva fennáll az a lehetőség, hogy az egyes kompartmentekben bekövetkező változások elfedik egymást és az eredmények nem nyújtanak információt a változások lényegeiről.

Ismerve azonban az egyes kompartmentek anyagcseréjét és funkcióját, az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokat párhuzamosan végezve, a biokémiai változások lényegét jobban meg lehet közelíteni.

Kísérleteinkben lényegében annak megállapítására törekedtünk, hogy az aminosavak lebontásában és szintézisében okoz-e zavart a pentobarbital és ez kapcsolatba hozható-e a görcsgátlással.

Vizsgálatainkban görcsgátlószerként a pentobarbitalt használtuk. Klinikai célokra inkább a fenobarbitalt használják, mert az hatásosabb. A fentebb elmondottakból következik, hogy bizonyos követelményeket állítottunk a görcsgátló szer elé. Erre vonatkozóan az irodalom csak a pentobarbitalra közölt adatokat. Az említett követelmények a következők:

1. A görcsgátló a neuronokban halmozódik fel - így a bekövetkező változások a neuronokra írhatók le /142/.

2. A görcsgátló felhalmozódik a mitochondriumban /28; 32/.  
Munkánk során az alábbi feladatokat tűztük ki magunk  
elő.

1. A pentobarbital hatásának vizsgálata öt aminosav /glu-  
taminsav, glutamin, aszparaginsav, l-alanin és GABA/  
szintézisére és lebontására, in vivo.
2. Megvizsgálni a pentobarbital hatását a fenti aminosavak  
szintézisében és lebontásában szerepet játszó enzimek-  
re, in vitro.

### III.

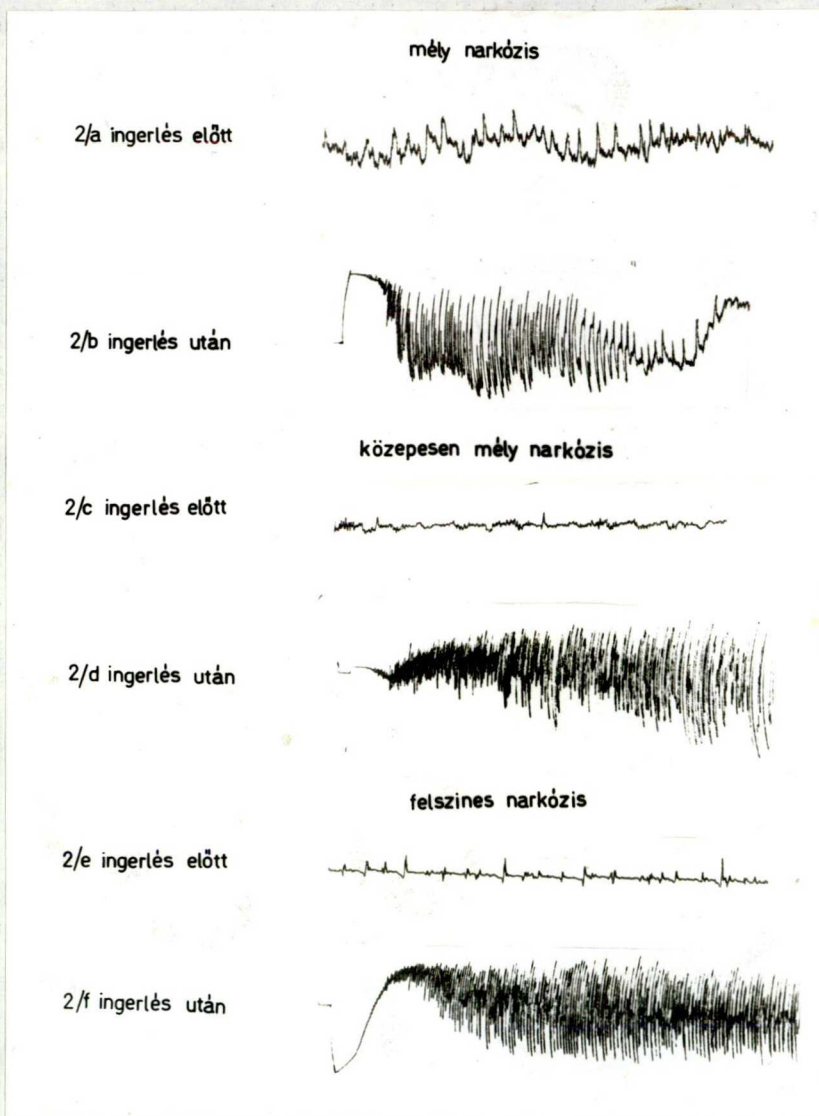
#### Módszer

##### A preparátum előkészítése. Ingerlés

Kísérleteinket 2,5-3 kg-os, ivarérett nőstény és him macskákon végeztük. Az altatás pentobarbitullal/fiziológiás konyhasóban oldva/ történt, 40 mg/kg dózissal, amelyet intraperitoncálisan adtunk be. Kellő alvásmélységnél megkezdjük a preparálást. A véna femoralisba műanyag kanült kötöttünk, amelyen keresztül a továbbiakban a még szükséges altatót, vagy más kívánt anyagot adhattunk az állatnak. A tracheába fém kanült helyeztünk, hogy megakadályozzuk a légutak elzáródása miatt beálló esetleges fulladást. Ezután az állat fejét stereotaxis készülékben rögzítettük, a fej bőrét középen felmetszettük, a fasciát és a koponyacsonton tapadó izmokat gondosan lefejtettük. A koponyacsonton először furóval kerek rést nyitottunk mindkét oldalon és a résekből kiindulva csonttörővel ovatosan feltártuk mindkét hemiszférát. A közben fellépő csontvérzést gyurmával elállítottuk. A dura materbe ovatosan hegyes tűt akasztottunk, majd csipesz és olló segítségével lefejtettük a felszínről. Az eddigi műveletek alatt gondosan ügyeltünk arra, hogy az agy állománya sérülést ne szenvedjen. A feltárt agyfelszint testhőmérsékletü parafinnal leöntöttük és üvegburával fedtük. A preparálás okozta sokk enyhítésére az állatot 2 óra hosszáig pihenni hagytuk, miközben elektromos párna segítségével az állat testhőmérsékletét állandó szinten tartot-

2. ábra

Macska agy elektrokortikogrammja pentobarbitalos narkózis alatt a gyrus ectosylviusról elvezetve



tuk. A várakozási idő eltelte után a mindkét oldali hemiszfére gyurus ectosylvius anterior és gyurus suprasylvius posterior tájékára egy-egy gömbvégű, ezüst elvezető elektródát helyeztünk. Az indifferens elektródát az állat izommentes fejbőréhez rögzítettük. Az elektrokortikogramot monopoláris elvezetésben nyolc csatornás tintairó EEG készülékkel vettük fel. Ezzel párhuzamosan a EKG-t is regisztráltuk. Az állat agykérgi alapaktivitásából következtetni tudtunk az alvás mélységére /2. ábra/. A kísérlet céljának megfelelően a várakozási idő meghosszabbításával, illetve további altató adagolásával befolyásolhattuk az alvás mélységét. Az ingerlés megkezdése előtt kivettük a kontrol agykéreg állományt a jobboldali félteke elvezető elektródái alatti területről, amelyet gondos szárazjeges fagyasztás előzött meg. Ezután a baloldali két elvezető elektróda között elhelyeztük az ingerlő elektródát. Az ingerlés DISA multistimmal történt, 30 perccel a kontrol kivétele után. Az ingerlést 100 Volt, 100 Hz, 1 msec-os 6 mp-ig tartó négyszögimpulzusokkal végeztük, amit 2 percnként 3 alkalommal megismételtünk. Az ingerlés ideje alatt az elvezetés szünetelt, de az inger megszakítása után azonnal regisztráltunk. Az utolsó ingerlés befejeztével 10 illetve 20 mp után mintát vettünk.

### Biokémiai vizsgálatok

#### Aminosav meghatározás

A vizsgálatok során a következő aminosavak mennyiségét



határoztuk meg: glutaminsav, glutamin, aszparaginsav, l-alanin, GABA. Felhasznált anyagok: 80 %-os etilalkohol, butanol, 96 %-os ecetsav, ninhidrines oldat /50 mg átkristályosított ninhidrin + 8,6 ml vízzel telített butanol + 41,4 ml jégecet/, metanolos  $\text{CuSO}_4$  /0,2 ml telített  $\text{CuSO}_4$  oldat + 0,02 ml 10 %-os  $\text{HNO}_3$  + 10 ml etilalkohol + 100 ml metilalkohol/, glutaminsav, glutamin, aszparaginsav, l-alanin, GABA. A ninhidrint a Merck cég, a többi anyagot a Reanal forgalmazta.

A meghatározás során több papirkromatográfiás eljárás módszereit kombináltuk.

Az agyszövetet tisztítás és mérés után Elvehjem-Potter üveghomogenizátorban, 20 mg agyszövethez 1 ml 80 %-os etanol adva homogenizáltuk. A homogenizátumot 12 órán át  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ -on állni hagytuk, majd 8 ezres fordulatszám mellett 30 percig centrifugáltuk. A felüluszót eltettük, a csapadékot 5 ml etanolban újból szuszpendáltuk és újból centrifugáltuk. A felüluszókat egyesítettük és vákum alatt  $40\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$ -on szárazra bepároltuk. A bepárolt anyagot 1 ml ioncserélt vízben feloldottuk és ebből általában 0,05 ml-t vittünk fel Whatman-1-es papírra. A futtatást egy dimenzióban végeztük, butanol : ecetsav : víz = 4 : 1 : 1 arányu keverékében. Az optimális elválást az öt aminosav esetében 72 órás futtatás után kaptuk. Mind a kontrol, mind az ingerelt szövet extraktumából 2 db papírra 2-2 próbát vittünk fel és az eredményt ezek átlagértéke adta. Minden papírra felvittük az 5 aminosav megfelelő mennyiségeit kalibrációs görbe ké-

szítése céljából. A futtatás befejezése után a papírt hajszáritóval száritottuk. Ezután ninhydrines oldattal ovatosan de egyenletesen lefujtuk. Száritás után a kromatogrammot  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 15 percig hivatuk elő. Az azonosítás a felvitt standardokkal történt. Ezután a megfelelő területeket kivágtuk és 4 ml metanolos  $\text{CuSO}_4$  oldatban a szineződést 1 óra alatt leoldottuk. A mérési hiba csökkentésére közelítőleg azonos területeket vágunk ki. Kontrollként a színreakció után fehéren maradt papír részleteket használtuk. A leoldás után a színintenzitást MOM 360-as spektrofotométeren 504 nm-en mértük. Az eredményeket a kalibrációs görbéről olvastuk le és 1 g szövetre vonatkoztattuk.

### Enzimológiai vizsgálatok

Az enzimológiai vizsgálatokat egyrészt fehérpatkány agy szürkeállományából készült homogenizátummal, másrészt marha májból kristályosított glutaminsavdehidrogenázzal /GDH/ végeztük.

Az ütéssel elkábitott patkányokat lefejeztük, majd az agyat gyorsan kiboncoltuk és felhasználásig  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Homogenizálás előtt az agykérget az agyhártyáktól, a vértől és a fehérállománytól a lehető legjobban megtisztítottuk és ioncserélt vízben 100 mg/ml-es homogenizátumot készítettünk.

Minden oldatot ioncserélt vízben készítettük és semlegesítettük. Az összes felhasznált anyagot a Reanal forgalmazta. Az egyes enzimek vizsgálatánál használt inkubá-

ciós elegy összetételét és pH-t az I-es táblázat mutatja. A közelítően optimális szubsztrát koncentrációt úgy állapítottuk meg minden esetben, hogy állandó mennyiségű homogenizátumot és foszfát puffert tartalmazó elegyben az adott enzim aktivitása szempontjából biztosan túl nagy aminosav, illetve túl kicsi ketosav koncentrációit közelítettük egymáshoz. Az optimális koncentráció megtalálása után a foszfát puffer koncentrációját változtattuk.

A GDH aktivitásmérését kristályosított enzim esetében Strecker /133/ módszere alapján végeztük annyi módosítással, hogy az elegy tartalmazta a pentobarbital megfelelő mennyiségét.

Agyi homogenizátum használatakor a GDH vizsgálatára összeállított inkubációs elegy a következő volt a vizsgált reakciótól függően.

a./ GDH aktivitás mérése glutaminsav szintéziskor =  
L-ketoglutársav 40 umol +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  90 umol + NADH 20 umol  
+ foszfát puffer 500 umol + 33,3 mg homogenizátum  
/agy, szürke állomány/

b./ GDH aktivitás mérése glutaminsav bontásakor =  
glutaminsav 50 umol + NAD 25 umol + foszfát puffer  
500 umol + 33,3 mg homogenizátum.

Az inkubációs elegy végtérfogata "a" és "b" esetben is 1,6 ml, pH-ja pedig 8,0 volt.

Az inkubálást GDH esetében 23 °C-on, az összes többi enzimnél 37 °C-on végeztük levegő atmoszférában.

Az enzimaktivitást kristályos GDH-nál a 30 mp-es, az agyszövet GDH aktivitás mérésénél az 1 perces, a többi enzimnél a 2 perces inkubálási időből számítottunk.

Az enzimreakciót 0,4 ml 10 %-os TCA oldat hozzáadásával állítottuk le.

Az általunk használt módszer az enzimreakció mérésére a klinikumban használt GOT és GPT teszt /vérplazma/ általunk módosított változata volt és a ketosavak mennyiségi változásának mérésén alapult.

A ketosavak 2,4 dinitrofenilhidrazinnal lúgos közegben színes komplexet képeznek. A színintenzitás arányos a ketosavak mennyiségével. A ketosav meghatározás menete a következő:

A TCA hozzáadása után az inkubátumot 8 ezres fordulatszámmal 20 percig centrifugáltuk. A felüluszó 1 ml-éhez 1 ml dinitrofenilhidrazin oldatot /100 ml 0,15 n HCl-ben 20 mg 2,4 dinitrofenilhidrazin oldva/ adtunk. Szobahőmérsékleten 15 percig vártunk, majd 10 ml NaOH-t /0,4N/adtunk az elegyhez. Ismét vártunk 15 percet, majd spektrofotométeren 546-nm-nél olvastuk le a színintenzitást. A 0 percben meglévő ketosav mennyiséget oly módon határoztuk meg, hogy a szuszpenzió előtt adtuk az inkubációs elegyhez a TCA-t. A mérés kontroljában a felüluszó 1 ml-ét desztillált víz helyettesítette. A ketosav koncentrációt egy kalibrációs görbéről olvastuk le és egyszerű számolási módszerrel határoztuk meg a ketosavak tényleges fogyását. Számolási módszerünk kifejlesztése lehetővé tette számunkra, hogy füg-

I. táblázat

Az inkubálás körülményei \*

Vizsgált enzim	Az inkubációs elegy alkotói			Inkubációs elegy pH-ja
	Ketosav umol	Aminosav umol	Foszfát- puffer umol	
GOT	9,5	60,0	200	7,4
GNOT	9,0	75,0	200	7,4
GPT	6,0	50,0	200	7,4
GNPT	8,0	75,0	200	7,4
AszKT	90,0	550,0	500	7,4
AIKT	4,0	60,0	200	8,2
AIOT	12,0	90,0	200	8,2
GABA-T	9,0	45,0	200	8,2

- \* a./ Az egyes reakciókban felhasznált aminosav és ketosav minősége értelemszerű.
- b./ Az inkubációs elegy végtérfogata minden esetben 1,6 ml volt.
- c./ Az alkalmazott pentobarbital koncentráció minden esetben 1; 5; és 10 umol volt.
- d./ Az inkubációs elegy minden esetben 33,3 mg agyszövetet /homogenizált formában/ tartalmazott.

getlenítsük magunkat a gyári pyruvát és oxalacetát standardoktól és hogy elvileg bármely transzaminálási reakciót vizsgálhatjuk ezzel a módszerrel.

Sok esetben kétirányu ketosav változással kellett számolnunk és mi a mérésnél az inkubálás befejezésével az összes ketosavat mértük meg. Aszerint, hogy az inkubálás végén a szinintenzitás hogyan változik, két eset lehetséges.

1. típuspélda a GOT. Itt a reakció lényege:



Ebben az esetben a reakció előrehaladtával az oxálecetsav mennyisége csökken, az L-ketoglutársav mennyisége pedig folyamatosan növekszik. E kétirányu változás következtében, mivel az oxálecetsav extinciója a nagyobb, az eredő szinintenzitás egyenletesen csökken mindaddig, míg az oxálecetsav el nem fogy. Könnyű azonban belátni éppen a fentiek alapján, hogy ténylegesen több oxálecetsav fogyott, mint amennyire az extinció csökkenés alapján következtetni tudnánk. Mivel a két ketosav változása egymással ekvimoláris, a szükséges korrekciót el tudjuk végezni a ketosavak szinintenzitás hányadosának /f/ ismeretében. Általános formában:

$A + X = Y + B$ , ahol X az átalakuló, Y a keletkező ketosav mennyisége. A és B az egyenletben szereplő aminosavak.

$$\text{Ekkor: } \underline{X_{\text{fogyás}} = \frac{\Delta I_{\text{leolv } x} + f \Delta I_{\text{leolv } x}}{h}}$$

ahol  $X_{\text{fogyás}}$  az egyenlet bal oldalán levő ketosav l g szövetre számolt korrigált fogyását jelenti.

$\Delta I$  egyenlő  $I_0 - I_m$ , ahol  $I_0$  a 0 perces inkubátum extinciója,  $I_m$  pedig az inkubálás végén mért szinintenzitás.

$\Delta I_{leolv x}$  azt jelöli, hogy a  $\Delta I$ -t az X ketosav kalibrációs görbájén olvassuk le.

$$f = \frac{Y \text{ ketosav extinciója}}{X \text{ ketosav extinciója}}$$

h az a szám, amivel az egyenletet be kell szoroznunk, hogy a korrigált fogyást 1 g agyszövetre kapjuk meg.

2. tipuspélda az AszKt. Itt a reakció lényege:

aszparaginsav + L-ketoglutársav=oxálecetsav + glutaminsav  
Ebben az esetben az inkubálás végén a színintenzitás növekedését tapasztaljuk. A valóságban több oxálecetsav keletkezik, mint amennyi a I-nek megfelel, mert a reakció közben az L-ketoglutársav mennyisége ekvimoláris mennyiségben csökken. Az általános képlet:

$$\underline{X_{fogyás} = / \Delta I_{leolv y} + f \Delta I_{leolv y} / fh}$$

ahol a  $\Delta I$ -t az Y ketosav kalibrációs görbájén olvassuk le.

Annak megállapítására, hogy az összeállított inkubációs rendszerekben az általunk vizsgált enzimreakciókat más reakciók hogyan befolyásolják, kezdetben a ketosav meghatározással párhuzamosan az aminosavak mennyiségi változását is vizsgáltuk. E kétoldalu vizsgálatok meggyőztek bennünket arról, hogy a ketosav meghatározás fentebb leírt módja széleskörűen és megbízhatóan alkalmazható a különböző transzamináz aktivitások mérésére.

#### IV.

### Eredmények

#### 1. In vivo vizsgálatok

##### Az aminosavszint alakulása a kontrol eltávolítása után

A harmadik ábra adatai szerint ha az egyikoldali hemiszfére gyrus ectosylviusának környékéről kb. 200 mg-os darabot óvatosan szárazjeges fagyasztás után kimetszünk, a másik oldal aminosav tartalma gyakorlatilag nem változik. Az első kimetszést közepesen mély narkózis mellett végeztük és 30 perc múlva vettünk próbát az ellenoldali kéreg megfelelő helyéről.

Az agy aminosavtartalma az életkor, testsúly és a táplálék összetétel változásával bizonyos variabilitást mutat. Egy állat két hemiszférájának egymásnak szimmetrikus területei között azonban elhanyagolható a különbség /63; 28; 84/.

A fentiek alapján a későbbiekben a kísérletre előkészített macskát kontrolként is felhasználhattuk. Ez a megtakarítás mellett a hibahatár csökkenését is jelentette.

##### Az aminosavszint változása pentobarbitalos narkózis alatt

Ismeretes, hogy pentobarbitalos narkózis alatt a Glükóz /U<sup>14</sup>C/ beépülése a glutaminsavba, glutaminba és aszparaginsavba csökken. A fenti aminosavak mennyiségét azonban a narkózis különböző mélységeinél még nem vizsgál-



ták. Abból indultunk ki, hogy a jelölődés mértéke és a valódi aminosavszint nem törvényszerű hogy fedje egymást. Az aminosavszintet a glükóz lebontáson kívül számtalan más tényező módosítja /membrán folyamatok, fehérjeszintézis és lebontás, koenzim szint, ATP szint, stb./. A kapott eredményeket a 4. ábra mutatja.

A viszonylag nagy hibahatár ellenére is látható, hogy a glutaminsav és a glutamin mennyisége mély narkózis során az irodalmi érték /84/ alatt van. Szintjük az alvásmélység csökkenésével növekszik. Az aszparaginsav mennyisége értékelhető módon változik. Lehetséges, hogy ez a tény a változatlan oxálecetsav szinttel függ össze /54/. Az l-alanin szint nem változik. A GABA mennyisége csökken, azonban az alvás valamennyi fázisában azonos szinten marad.

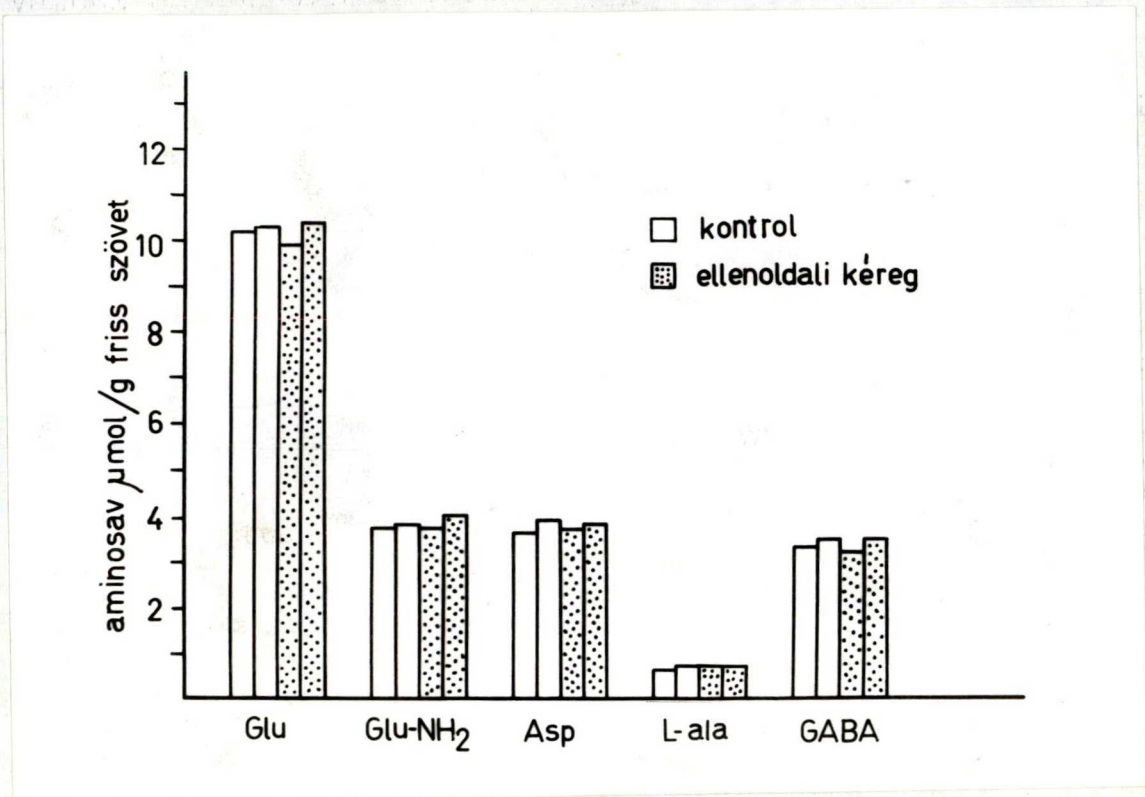
#### Az aminosavszint változása ingerlés után

Az elvégzett kísérletek két fő csoportba oszthatók. Az egyik esetben 10 mp-el, a másik esetben 20 mp-el az utolsó ingerlés után vizsgáltuk az aminosavszint változását. Görcs folyamán ugyanis az aminosavanyagcsere változása szempontjából durván kettő szakaszt lehet megkülönböztetni /ez nem pontosan a görcs szakaszait jelenti/. Az első szakaszban az aminosav felhasználása, a másodikban a szintézise a meghatározó. Kísérletek során lényegében ezt a két szakaszt igyekeztünk egymástól elkülöníteni.

A két szakasz időtartama minden alvásmélységnél más, ezért a különböző mélységű narkózisnál kapott adatok nehezen

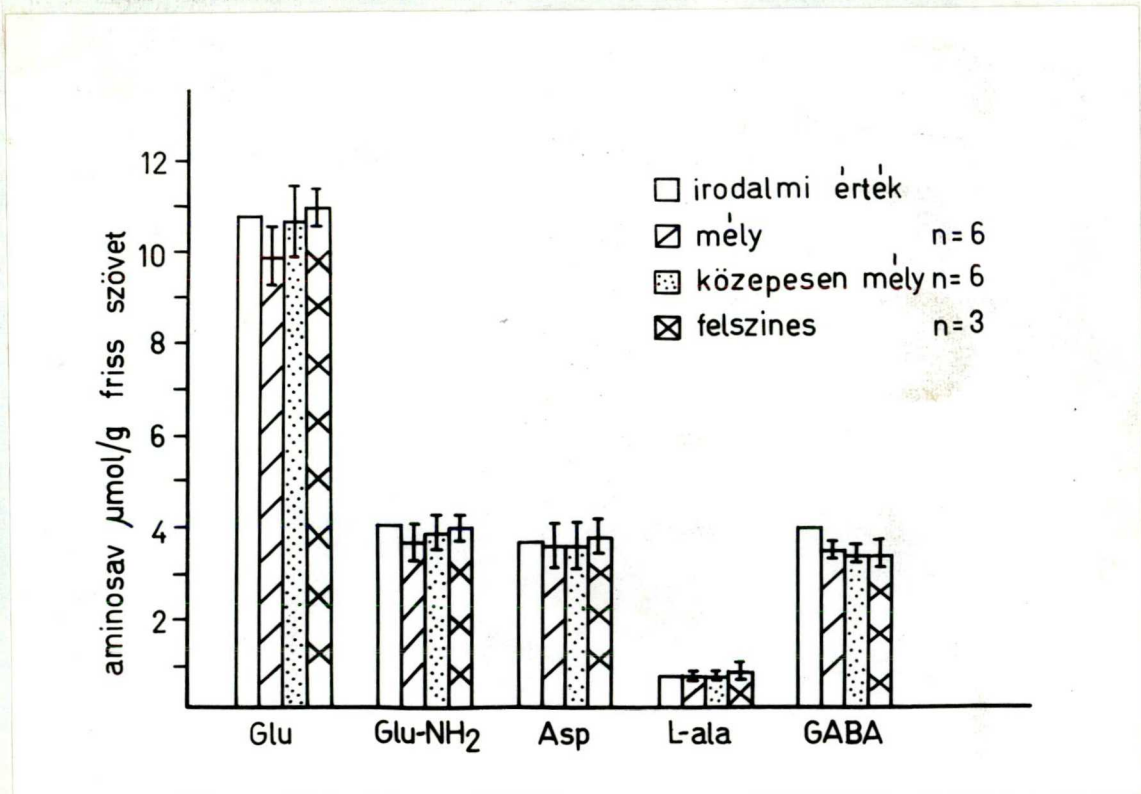
3. ábra

Az aminosavszint változása a kontrol kivétele után az ellenoldali kéregben



4. ábra

Az aminosavszint változása az alvásmélységgel



hasonlíthatók össze. Mi azonban elsősorban a mély alvás során lejátszódó változásokra voltunk kíváncsiak. Ugy gondoltuk hogy az "aminosavlebontás" szakasza /az egyensúly a lebontás irányába tolódott el/ időben azonos lehet azaz az ECOG szakasszal, ahol a görcs intenzitása még nem csökken. Ez a szakasz mély alvás esetében kb. 10 mp-et tett ki. Ismeretes, hogy a görcs utolsó fázisában felgyorsul a toxikus ammónia eltávolításának sebessége. Ezzel együtt gyorsul a glutaminsav és glutamin szintézis /38/. A szintézis sebességére a második 10 mp-ben mért aminosavszint változásból igyekeztünk következtetni. E célból az utolsó ingerlés után 20 mp-el is megvizsgáltuk az aminosavak mennyiségi változását.

Az 5. ábra mutatja azt, hogy miképpen változott meg az aminosavak mennyisége 10 mp-el az utolsó ingerlés után.

Mély alvás során ingerelve valamennyi vizsgált aminosav szintje csökken. Közepesen mély alvás esetében az aszparaginsav és az l-alanin mennyisége növekszik. Felszínes alváskor valamennyi aminosav szintje növekedett. Az eredmények egyrészt azt jelzik, hogy a 10 mp-es időpontot határozottuk meg /az egyensúly előbb eltolódik az szintézis irányába/. Másrészt mély alvás során ingerelve az egyensúly az aminosavak lebontása irányába tolódik el az első 10 mp-ben.

Az aminosavak felhasználása mély alváskor jelentős.

A következő sorozatban közepesen mélyen és mélyen alsó macskákat ingereltünk. Az utolsó ingerlés után 20 mp-el

vizsgáltuk az aminosavszint megváltozását. Az eredményeket a 6. illetve 7. ábrán láthatóan összevetettük a 10 mp-es értékekkel.

A glutaminsav mély alvás során ebben a szakaszban nem emelkedett, közepesen mély alvás során azonban gyakorlatilag elérte a kontrol szintet, 1,5 mikromol glutaminsav/g szövetetszintetizálva 10 mp alatt.

A glutamin szintézise mély alvás során alacsony értéket mutatott, amely közepesen mély alvás során fokozódik. Az aszparaginsav mély narkózisnál szintetizálódik, közepesen mély alváskor a szintézis egyensúlyba kerül a lebontással. Az  $\alpha$ -alanin szintézisben nem találtunk különbséget.

A GABA szintézisben nehéz különbséget találni összehasonlítva a két alvásmélységet. Mély alvás során azonban az egyensúly erősen eltolódik a GABA lebontás irányába az első 10 mp-ben. Ez összefügghet a GABA szintézis gátlásával. Az eddig mondottakat összegezve:

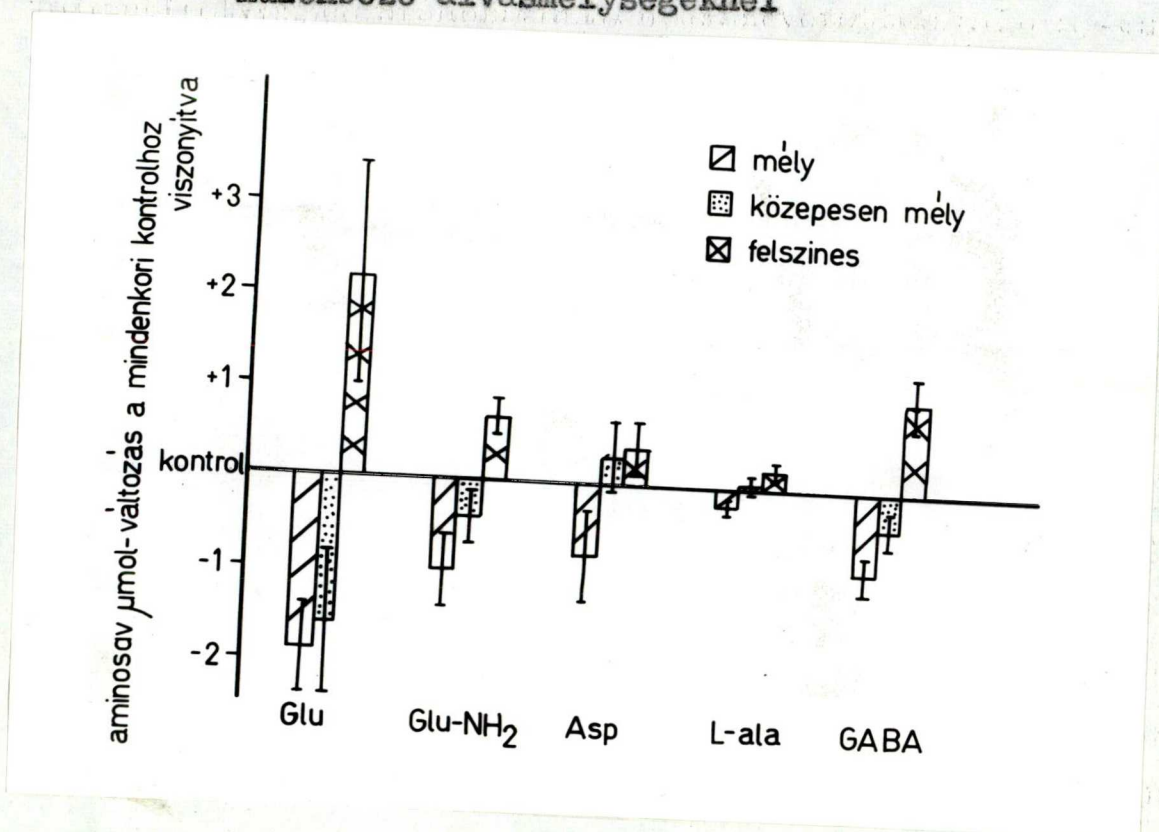
a./ Mély pentobarbital narkózis alatt görcsöt előidézve, a kivett próba aminosav analizise jelentős aminosav fogyásról tanuskodott.

b./ A glutaminsav és glutamin szintézise mély narkózis során gátlás alatt áll /6. 7. ábra/.

A továbbiakban vizsgálat alá vettünk néhány olyan enzimet, amelyek az egyes aminosavak közvetlen szintézisével és lebontásával kapcsolatosak. Egyik közös jellemzőjük továbbá, hogy részben vagy teljesen a mitokondriumokban lokalizálódnak.

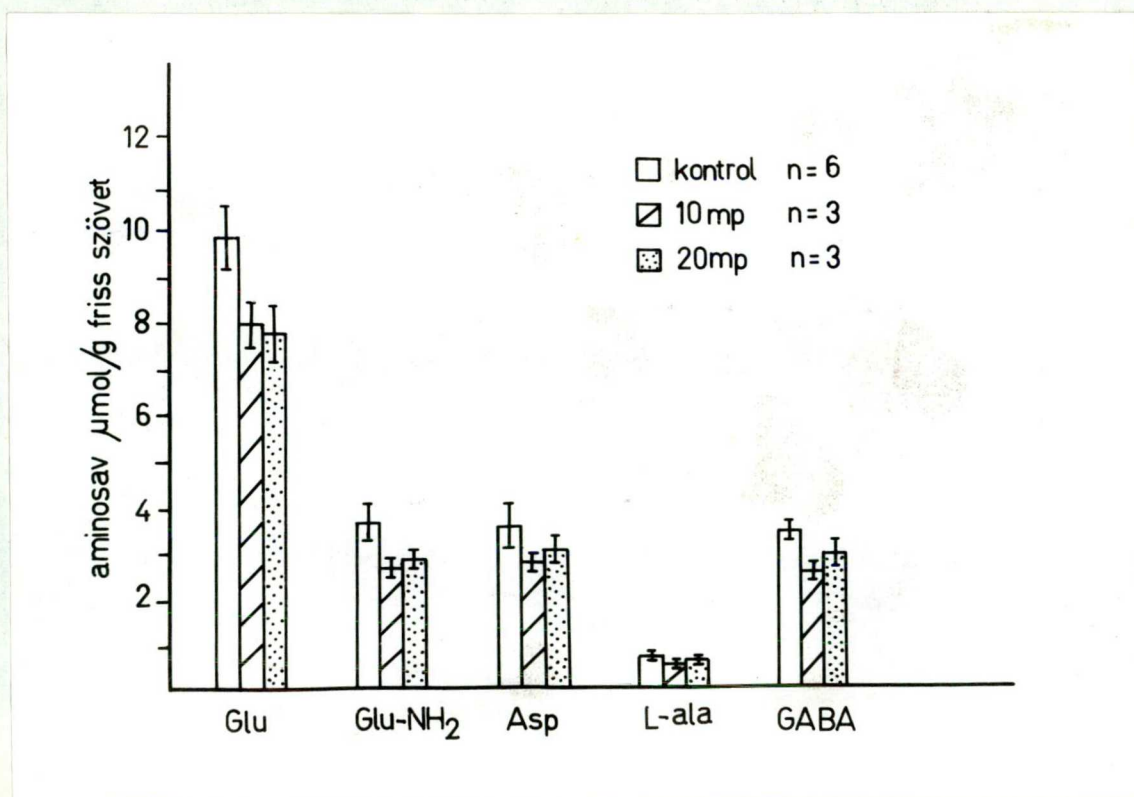
5. ábra

Az aminosavszint változása 10 mp-el az ingerlés után különböző alvászélységeknél



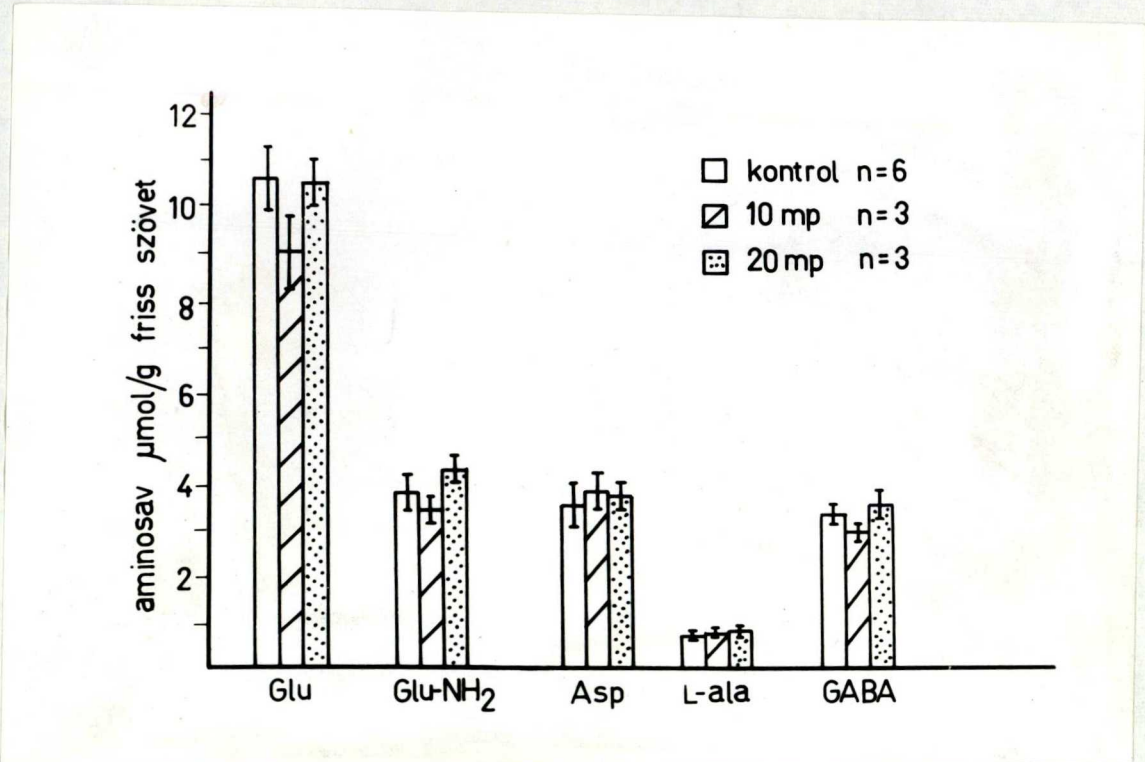
6. ábra

Az aminosavszint változása mély alvás idején ingerelve



7. ábra

Az aminosavszint változása közepesen mély alvás idején  
ingerelve



Megpróbálkozunk az *in vivo* és *in vitro* kapott eredmények folyamatos egybevetésével.

## 2. In vitro kísérletek

### A GOT vizsgálata

Glutaminsav + oxálecetsav  $\xrightarrow[\text{ASZKT}]{\text{GOT}}$  aszparaginsav + L-ketoglutársav

Az agyban glutaminsav 90 %-ban a GOT révén alakul át /11; 28; 84/. Részben mitokondriális enzim. A pentobarbital hatásának vizsgálata a GOT esetében azért volt fontos, mert ennek révén adatokat szerezhettünk a valódi glutaminsav felhasználás mértékének megállapításához. A pentobarbital nem hat az enzimre. Ennek alapján is valószínűsítjük, hogy pentobarbital narkózis alatt görcsöt kiváltva, a glutaminsav nagyobb "frakciójának" felhasználása nincs gátlás alatt.

### A GDH vizsgálata

Glutaminsav +  $\text{NAD}^+$  +  $\text{H}_2\text{O}$   $\xrightleftharpoons[\text{GDH}]{\text{GOH}}$  L-ketoglutársav +  $\text{NADH}$  +  $\text{NH}_4^+$

GDH csak mitokondriumban található. Reverzibilisen működő alloszterikus enzim /37; 46; 50; 70; 114; 126; 134; 136; 159/.

*In vivo* körülmények között sok tényező befolyásolja aktivitását. Az aminosavak anyagcseréjében központi szerepet tölt be, azonban kihatással van a szénhidrát és energiaszintre is. A többi dehidrogenázzal együtt résztvesz a  $\text{NAD}/\text{NADH}$  arány kialakításában /129/.

A GDH in vivo a glutaminsav szintézisét részesíti előnyben, mert ez termodinamikailag előnyösebb /28; 126/.

A pentobarbital a GDH aktivitását mindkét irányban erőteljesen gátolja /8. 9. ábra/.

A kapott eredmények alapján jobban tudjuk értelmezni az 5. 6. és 7. ábrák glutaminsavra vonatkozó részét. Nagyon valószínű, hogy a glutaminsav szintézis gátlása mély narkózis során egy GDH szinten történő gátlásnak felel meg.

A GDH gátlása a bontás irányába szintén jelentőséggel bír, ha ez a neuronális összanyagcsere szinten nem is jelentkezik kifejezetten. Itt kell megjegyeznünk azt, hogy a GDH gátlása szoros kapcsolatban van a glutamin szintézis csökkenésével. Ismeretes, hogy a glutaminsavból történő glutamin szintézis abban a glutaminsav poolban történik, ahol a glutaminsav szintézisét és lebontását a GDH szabályozza /17; 18; 20; 21; 23; 51; 84; 123/. Ennek lehetséges következményeire a megbeszélés folyamán térünk ki.

#### Az AszKT vizsgálata

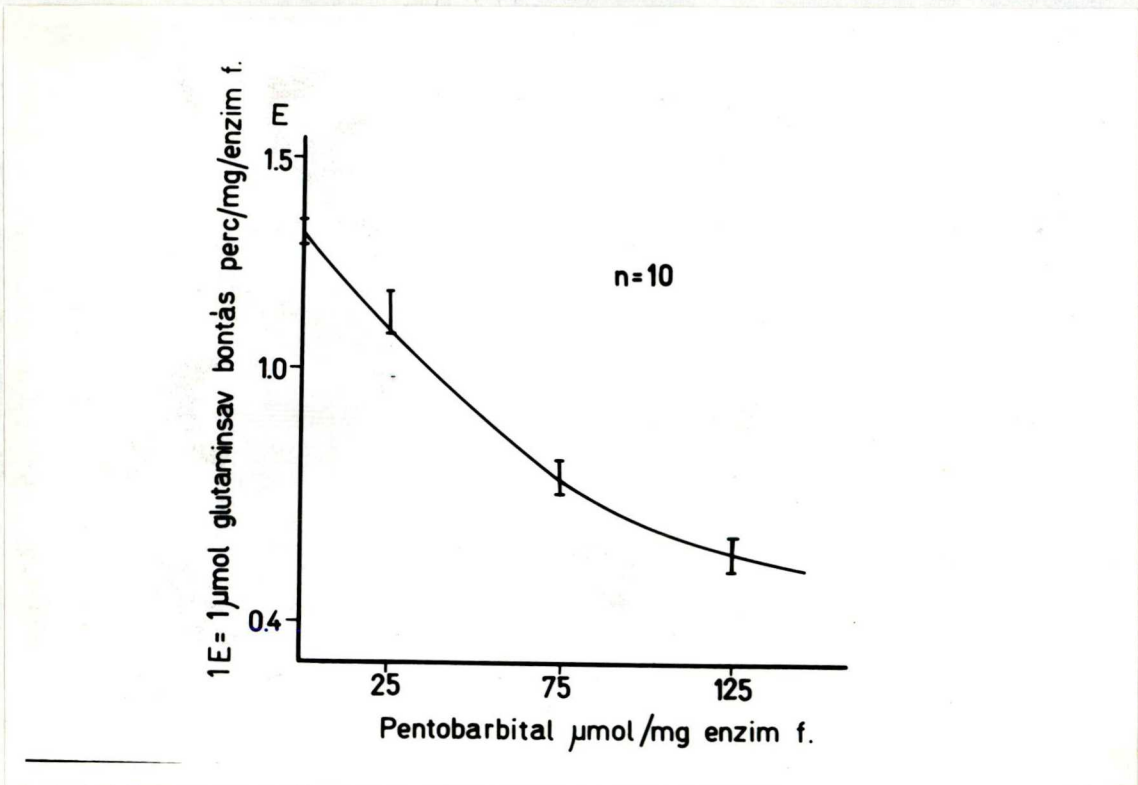
Az AszKT az agyban a legaktívabb transzamináz /84/. Részben mitokondriális enzim. Az agyban a GOT-al együtt az ún. "nagy" compartment glutaminsav szintjét szabályozzák /84/.

A pentobarbital nincs hatással az enzimre. Ez azt jelentheti az in vivo kapott adatok tükrében, hogy a pentobarbital a fenti két szabályozó enzim szintjén nem gátolja a glutaminsav anyagcseréjét.



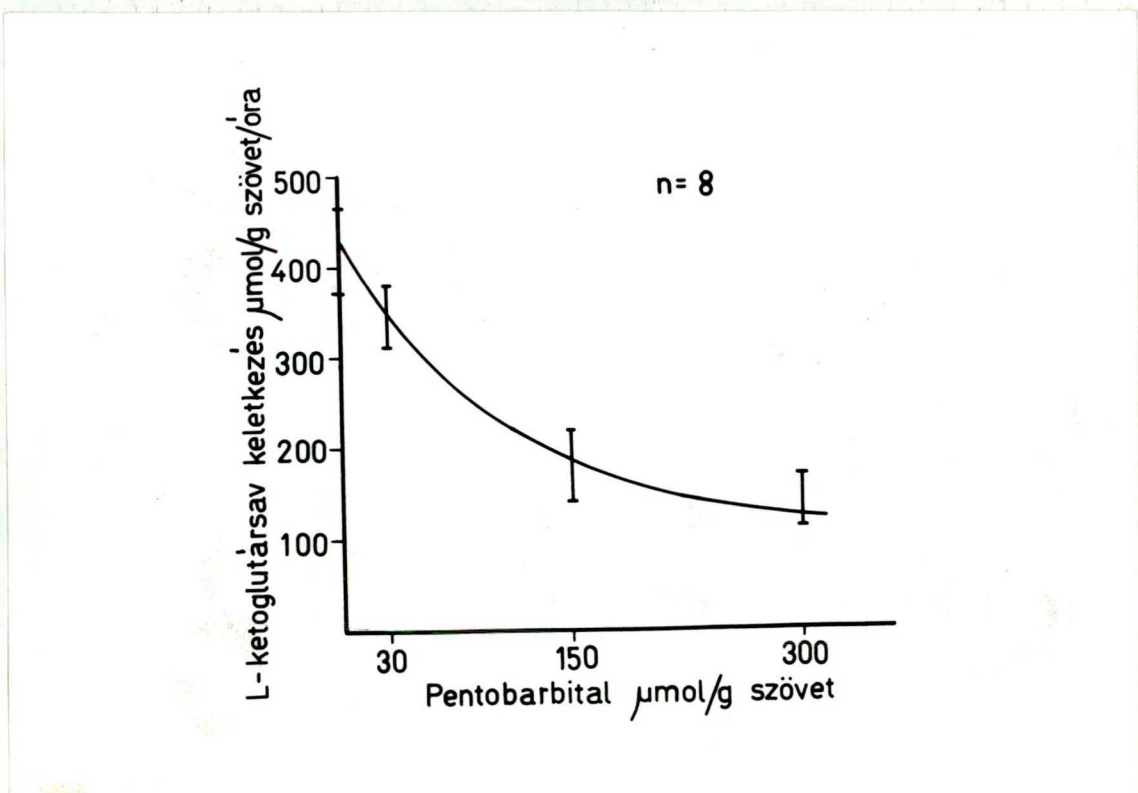
8 a. ábra

GOH aktivitása a glutaminsav bontás irányában  
/kristályosított enzim/



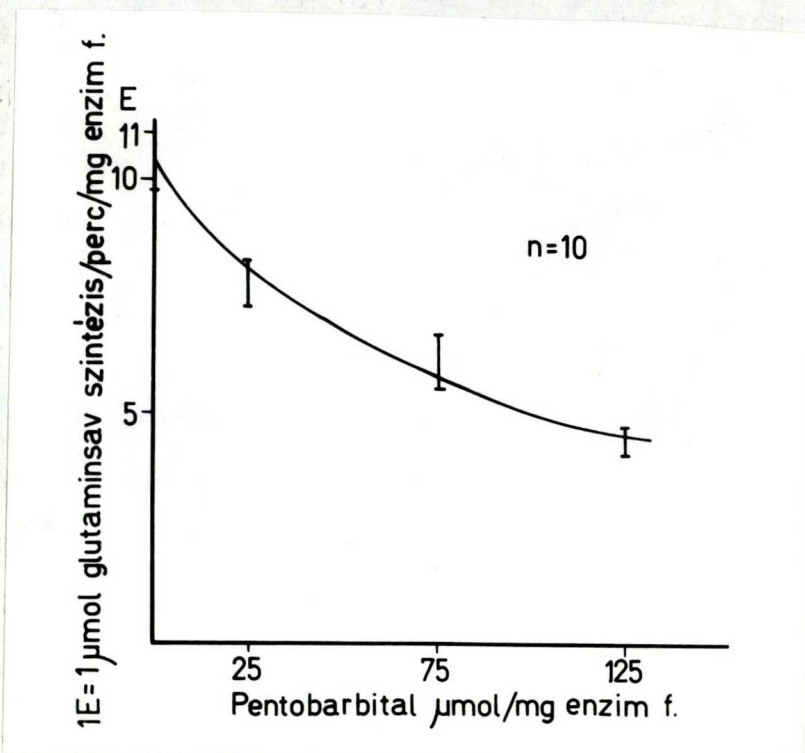
8 b. ábra

GOH aktivitása a glutaminsav bontás irányában  
/homogenizátum/



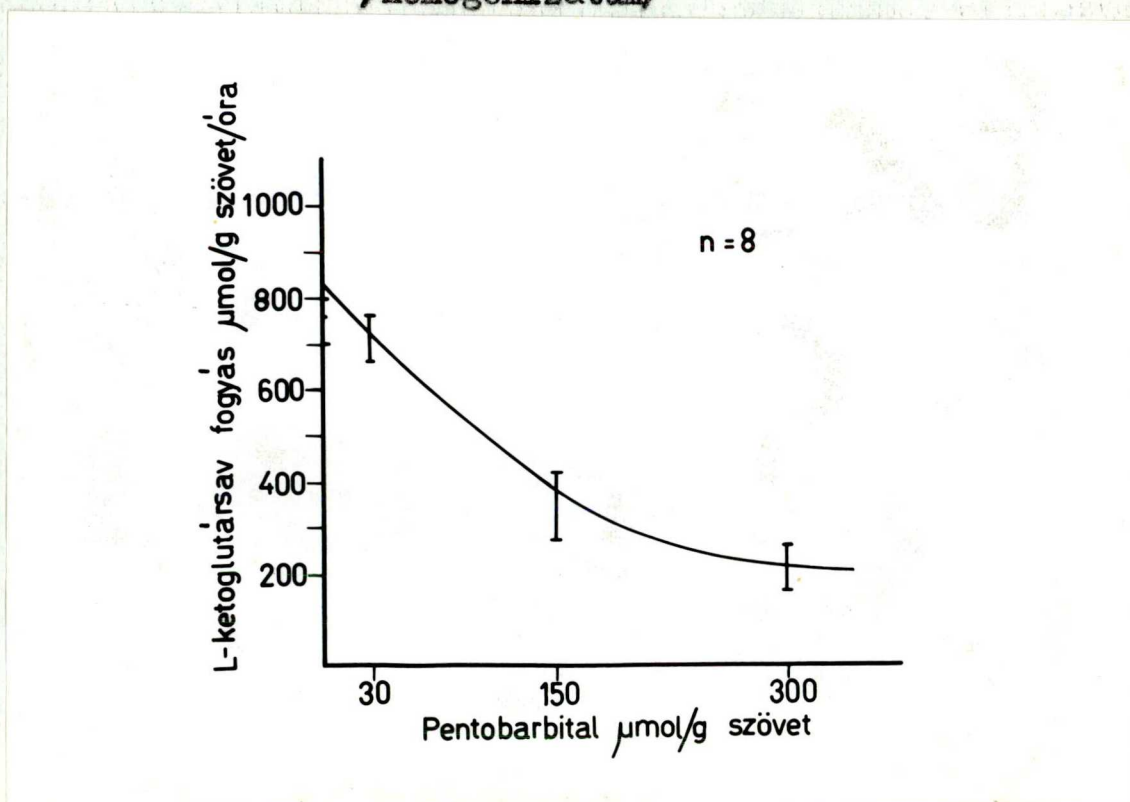
m 9 a. ábra

GDH aktivitása a glutaminsav szintézis irányában  
/kristályosított enzim/



9 b. ábra

GDH aktivitása a glutaminsav szintézis irányában  
/homogenizátum/



### A GPT és GNPT vizsgálata

Glutaminsav + piroszólósav  $\xrightarrow{\text{GPT}}$  L-ketoglutársav + l-alanin

Az agyban a glutaminsav transzaminálódása során az elsődleges szubsztrát az oxálecetsav. Az oxálecetsav és piroszólósav kompetitívek egymásra a transzaminálási folyamatokban.

Eddigi ismereteink szerint a l-alanin keletkezésének fő utja az agyban a glutaminsavról a piroszólósavra történő transzaminálás. A glutaminnak kisebb szerepe van az l-alanin képződésében. A pentobarbital a GPT-t és GNPT-t egyaránt gátolja /10. 11. ábra/. Mindkét enzim mitokondriális, a gátlás tehát in vivo is megvalósulhat. Már szó volt róla, hogy barbiturát anesztezia alatt a piroszólósav mennyisége mintegy egyötödére lecsökken /54/. Az l-alanin mennyisége azonban pentobarbitalos anesztezia alatt nem változott / 4. ábra/. Feltételezzük, hogy ebben szerepet játszik az l-alanin továbbalakításában résztvevő enzimek gátlása. Ezek közül a következő kettőt vizsgáltuk meg.

### Az ALKT és az ALOT vizsgálata

l-alanin + L-ketoglutársav  $\xleftarrow{\text{ALKT}}$  piroszólósav + glutaminsav

l-alanin + oxálecetsav  $\xleftarrow{\text{ALOT}}$  piroszólósav + aszparaginsav

Az ALKT részben mitokondriális enzim és méréseink szerint tisztesen aktívabb az agyban mint az ALOT. Mindkét enzimet gátolja a pentobarbital in vitro /12, 13. ábra/.

Az l-alanin állandó szintjének magyarázatához további vizsgálatok lennének szükségesek.

### A GABA-T vizsgálata

GABA + L-ketoglutársav GABA-T borostyánkősav semialdehid + glutaminsav

A GABA átalakulásának fő iránya az L-ketoglutársavra történő transzaminálás, amelyet a GABA-T végez /84/. Az enzim mitokondriális, és abban a mitokondrium típusban lokalizálódik, amelyben a GDH.

A pentobarbital gátolja az enzim aktivitását /14. ábra/. Ha feltételezzük, hogy a GABA egy gátló mediator az agyban, ez a GABA-T gátlásának jelentőséget ad. Ebben az esetben ugyanis a gátló szinapszisokban a felszabadult GABA élettartama megnövekedhet és ez a gátlási idő meghosszabbodását jelentheti.

A GABA szintézisét a GAD végzi, amely nem mitokondriális enzim /ezért nem vizsgáltuk/. Thiopentalos narkózis alatt csökkent a GABA mennyisége, nem csökkent viszont a GABA jelölése glükóz /U<sup>14</sup>C/-ből. Ez arra engedett következtetni, hogy a GAD aktivitását a használt drog nem befolyásolta.

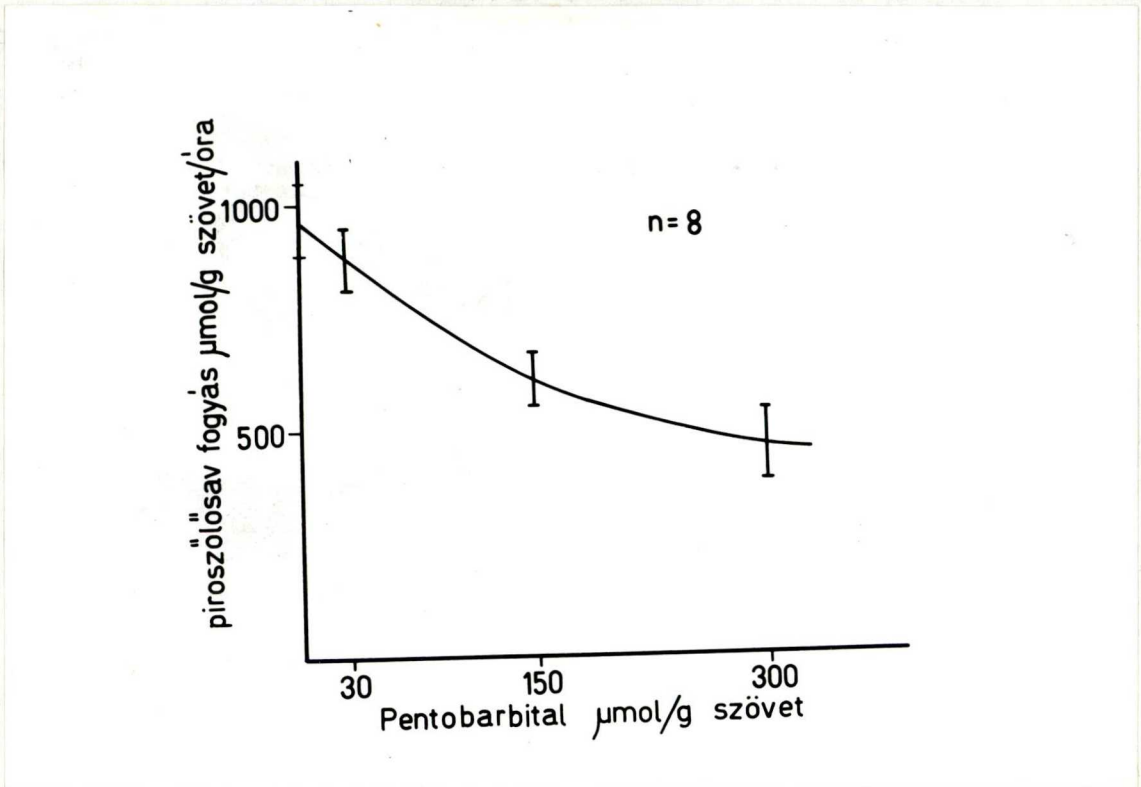
Ebben az esetben és a mi esetünkben is az a valószínűbb, hogy a GABA felszabadulás fokozódott narkózis alatt.

Jasper /65/ állapította meg, hogy az agy aktivációs állapotától függő mennyiségben aminosavak szabadulnak fel a kéreg pialis felszínén. Így pl. a glutaminsav háromszoros mennyisége szabadul fel éber állapotban mint alvóban. A GABA esetében a helyzet éppen fordított. A glutamin és az

aszparaginsav felszabaduló mennyisége mindkét esetben azonos volt. /Ez a tény egyuttal azt jelentheti, hogy a glutaminsav és a GABA szerepet játszik az agy aktivitásának szabályozásában - mint mediator anyagok./.

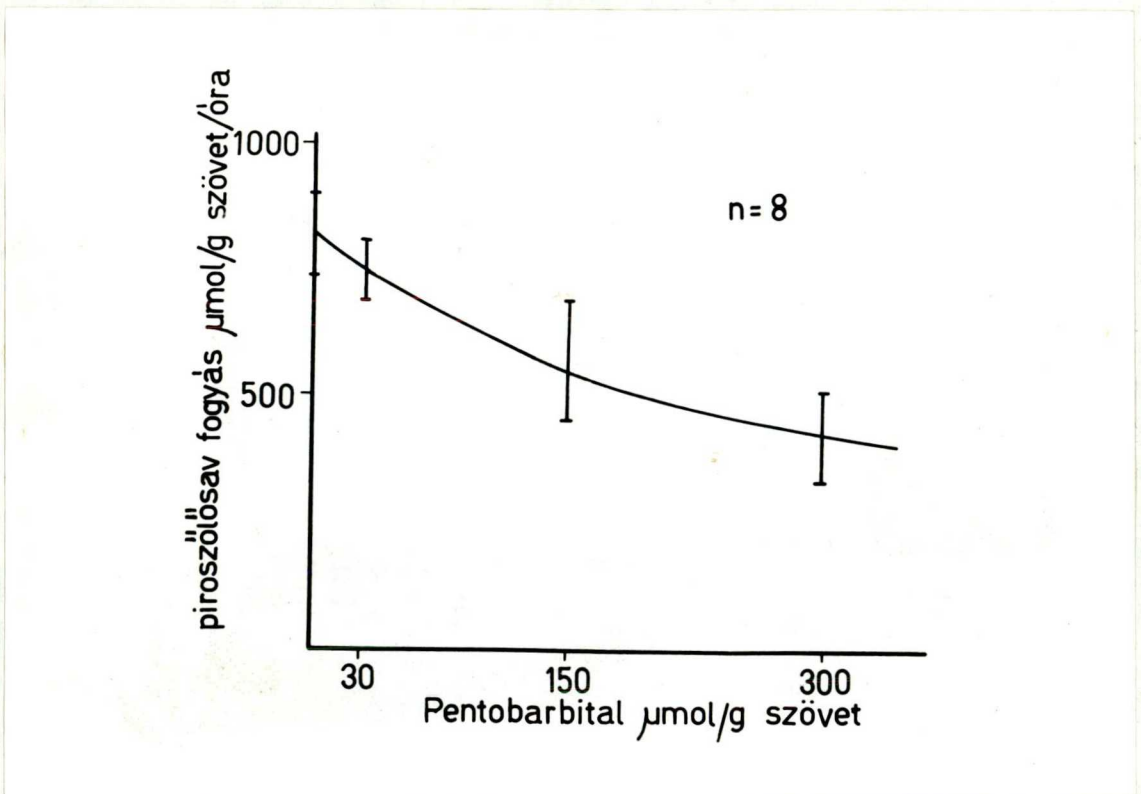
10. ábra

A GPT aktivitása

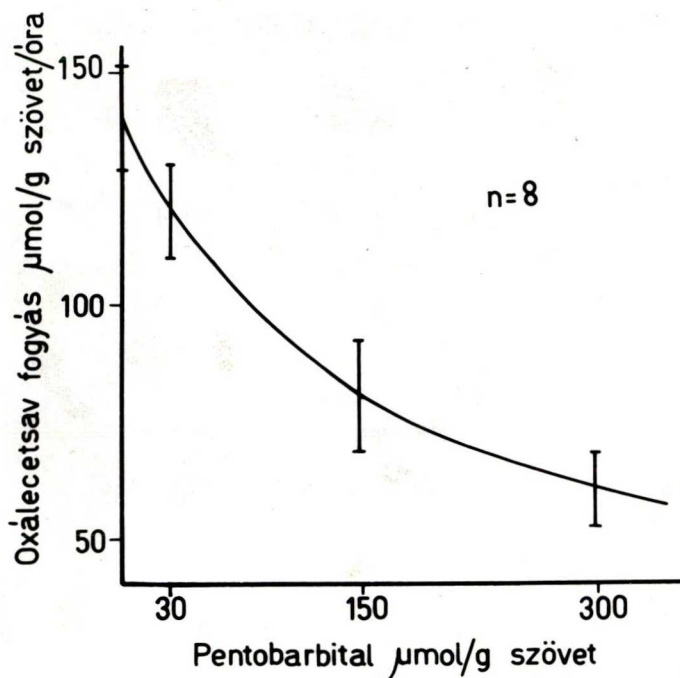


11. ábra

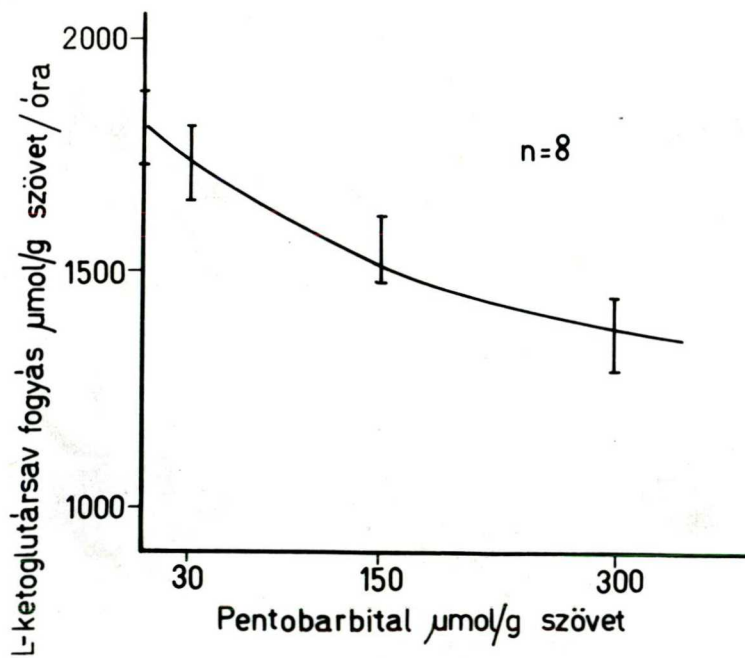
A GNPT aktivitása



12. ábra  
Az ALOT aktivitása

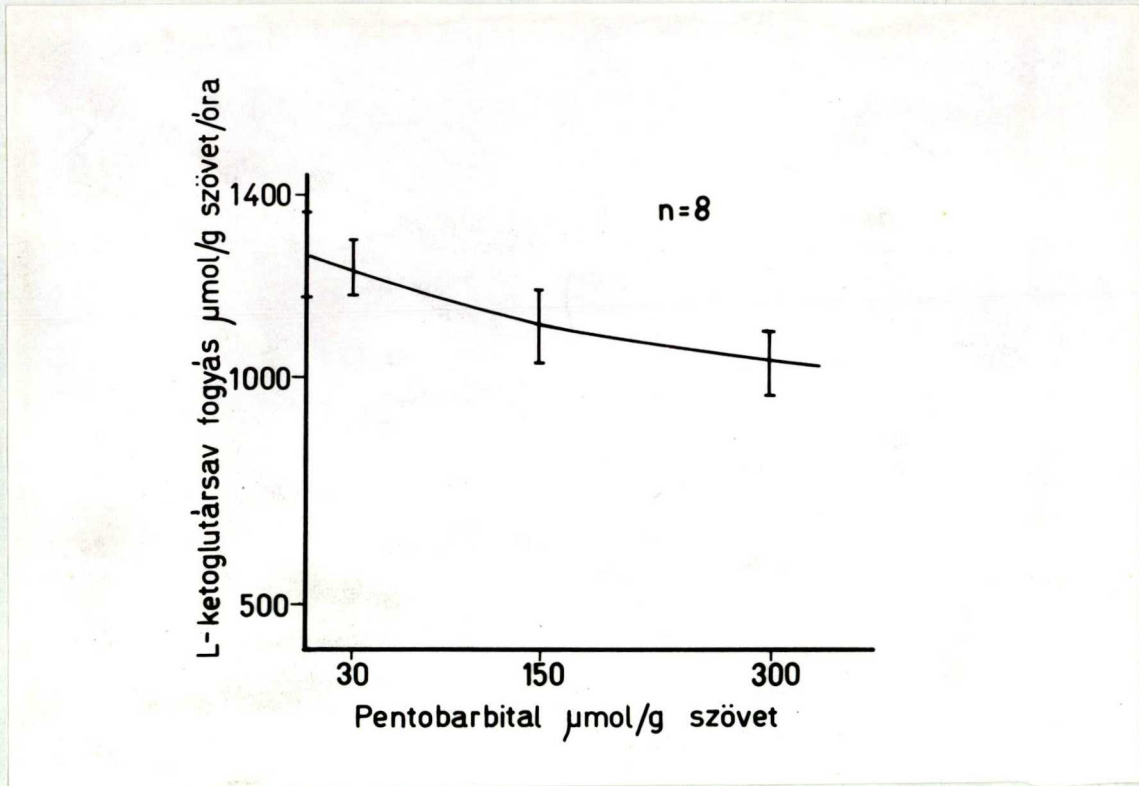


13. ábra  
Az ALKT aktivitása



14. ábra

A GABA-T aktivitása





V.

Megbeszélés

Az agyszövet anyagcseréjében a szabad aminosavak fontos szerepet töltenek be. A görcs állapotában az aminosavak funkciója kölcsönösen két vonatkozásban lehet jelentős.

Egyrészt sokan feltételezik, hogy a glutaminsav és a GABA a mediátor egyes szinapszisokban, másrészt az aminosavak energiaforrásként szolgálhatnak.

Kísérleteinkben főleg az utóbbi lehetőséget vizsgáltuk.

Elöljáróban meg kell jegyeznünk, hogy az *in vivo* kísérletekben kapott eredményekből nem tudjuk pontosan megmondani, hogy az aminosavak mennyiségi változásai milyen arányban állnak átalakulásukkal illetve szintézisükkel. Az aminosavszint átalakulásában ugyanis szerepet játszik a fehérjék szintézisének és lebontásának aránya, valamint a vérből történő aminosav utánpótlás mértéke is.

Az irodalmi adatokra /38; 63; 102; 106/ építve csak annyit tudunk mondani, hogy az aminosavak jelentős mennyiségben oxidálódnak a görcs folyamán, amelyet jelez a felszaporodó ammónia nagy mennyisége is /38; 84/.

A legfontosabb eredményünknek azt tartjuk, hogy sikerült kimutatni *in vivo* és *in vitro* a pentobarbital gátló hatását a glutaminsav szintézisre /6. 9 a. 9b. ábra/. Ugyanakkor a glutaminsav átalakulásának fő irányát /a GOT révén/ a pentobarbital nem gátolja /6. ábra/.

A glutaminsavhoz hasonlóan a többi aminosav mennyisége is csökken ingerlés során.

Az eredmények értékelését azonban megnehezíti az agy morfológiai és biokémiai heterogenitása. Az aminosavak anyagcseréje egyrészt regionális különbségeket mutat az agyban /28; 84/, másrészt a régiókon belül kompartmentalizálódik /16; 17; 18; 51; 84; 107; 123/.

A kísérleteink során alkalmazott pentobarbital a neuronokban halmozódik fel /142/, ezért az aminosavanyagcsere változásait a neuronokra tudjuk leírni. A GDH-ról ismeretes, hogy a kis kompartmentben lokalizálódik. Mindebből következik, hogy a kis kompartment, amely metabolikusan egységesnek látszik /azonos mitokondrium frakció jellemzi/ morfológiailag nem az és legalább részben a neuronokban is előfordul.

A kis kompartment megoszlása a neuronokban elvileg többféle lehet. A következő adatokból arra következtetünk, hogy a kis kompartment mitokondriuma az egyes szinapszisokban előfordulhatnak.

a./ A pentobarbital gátló hatása a szinapszisokban a legerősebb /3; 4; 5; 42; 43; 66; 68/.

b./ A pentobarbital primer hatóhelye az agytörzsi formatio reticularis /55/. Ennek a területnek egyik fő jellemzője, hogy a preszinaptikus régióban más agyrészletkehez viszonyítva jóval több a mitokondriumok száma /143/.

c./ A GOH a kis kompartment mitokondriumaiban lokalizálódik /51; 84/. A pentobarbital gátló hatása az enzim aktivitására igen jelentős /8. 9. ábra/.

d./ A szinaptikus régióban magas GDH aktivitást mutattak ki /84/.

Az a feltevésünk, hogy a kis kompartment részben a szinapszisokban lokalizálódhat megegyezik Garfinkel /51/ adataival. Szerinte a kis kompartment az oligodendroglia-ban és a szinapszisokban van, amely strukturák mitokondriumban viszonylag gazdagok. A nagy kompartmentet a mitokondriumban viszonylag szegény asztroglia és perykariumba helyezi. A GDH gátlása komoly változást jelenthet azon szinapszisok anyagcseréjében, ahol a kis kompartment lokalizálódik. A GDH gátlás lehetséges főbb következményei:

- a./ A glutamin szintézis sebességének lassulása, az ATP szint növekedése.
- b./ Az ATP/ATP-ase egyensúly megbomlása.
- c./ A sav-bázis egyensúly megbomlása.

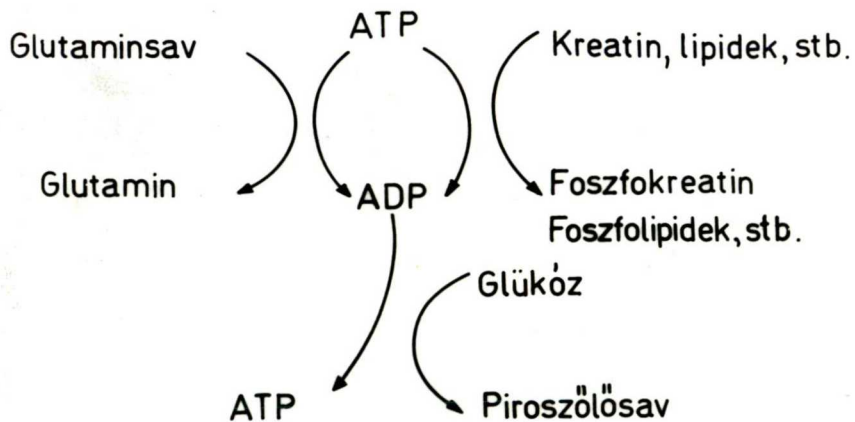
a./ Említettük, hogy a glutamin szintézise a kis kompartment aktiv glutaminsavából történik /51; 84/. A pentobarbital GDH-t gátló hatásának az a következménye, hogy csökken a glutaminsav, így a glutamin szintézise is /6. ábra/.

A pentobarbital átlagos koncentrációja az agy 1 g-ban 1 órával a 40 mg/kg dózis beadása után 0,5-1 umol között van /142/. In vitro kísérleteinkben ennek durván két nagyságrenddel nagyobb koncentrációját alkalmaztuk. Mégis jogos-e az eredmények in vivo adaptációja? Egyrészt élő macskán végzett kísérleteink bizonyítják, hogy az említett gátlás ténye fennáll. Másrészt ismeretes, hogy a pentobarbital a neuronokban /142/ és intracellulárisan a mitokondriumokban /28/ halmozódik fel. Joggal feltételezhetjük, hogy a mito-

kondriális enzimek környezetében a pentobarbital koncentrációja jóval nagyobb a mért átlag eloszlásnál. A glutamin szintézise ATP igényes folyamat. Az aktiv glutaminsav szint csökkenése következtében a glutamin szintézis sebessége a kontrolhoz képest mérséklődik. Ez az ATP szint növekedését vonhatja maga után. A 15. ábra mutatja a glutaminsav-glutamin rendszer, valamint a szénhidrát anyagcsere közötti kapcsolatot.

15. ábra

A glutamin szintézis és szénhidrát anyagcsere kapcsolata



Strecker /41/ nyomán módosítva

Strecker /41/ véleménye szerint a glutamin szintézis sebessége az ATP szint szabályozása révén kontrol alatt tartja a glikolizist és a légzést. A glutamin szintézis sebességének lassulása ily módon a kis kompartmentben a szénhidrát anyagcserére gátló hatásu. A felhalmozódó ATP ezenkívül a GDH további gátlását eredményezheti.

Mc Ilwain /63/ kimutatta, hogy pentobarbital narkózis alatt az ATP mennyisége valóban meghaladja a kontrol szintet az agyban és ez egybevág elképzelésünkkel.

b./ A szinapszisokban az ATP/ATP -ase egyensuly nagyon fontos a mediátor anyagok felszabadulása szempontjából. Az ATP <sup>hiány és többlet</sup> egyaránt gátolja az enzimet /41/. A mediátor anyagok felszabadulása energiaigényes folyamat. Így a felszabadulás mértéke nagyban függ az ATP-ase aktivitásától.

Egyes esetekben sikerült kimutatni, hogy a pentobarbital gátolja az ingerlő mediátor felszabadulását /99; 150/. Ennek egyik oka lehet véleményünk szerint az, hogy ezekben a szinapszisokban a glutaminszintézis lassulása következtében az ATP szint növekszik.

Más esetben azt is kimutatták, hogy az ATP a noradrenalin terjedése szempontjából diffúziós barriert képez az adrenerg szinapszisokban /91; 112/.

c./ Az aminosavak igen fontosak az intracelluláris sav-bázis egyensuly megtartásában. Az aminosavak és a kationok membránon keresztül történő transzportja egymáshoz szorosan kapcsolódik, és a membrán Na-K-ATP-ase aktivitásához kötött /41; 126/. Megállapították, hogy a növekvő intracelluláris glutaminsavtartalom serkenti a  $\text{Na}^+$  belépését a sejtbe, valamint a  $\text{K}^+$  kilépését a sejtből. Az intracelluláris  $\text{Na}^+$  növekedése a membrán növekvő depolarizációját okozza. A mondottakkal kapcsolatban három tényre kívánunk utalni.



1. Woodburg /78/ kimutatta, hogy az epilepsziás gócban közvetlenül a görcs előtti szakaszban az intracelluláris  $\text{Na}^+$  mennyisége növekszik.
2. Wiechert és Göllnitz /154; 155; 156/ a legkülönbözőbb módszerekkel kiváltott /Kardiazol, glutaminsav, penta-metiléntetrazol/ görcsök esetében azt tapasztalták, hogy már a görcs kezdete előtt növekszik a GDH aktivitása. Ez együttjárt a glutaminsav szint emelkedésével. Nagy a valószínűsége annak, hogy a görcs előtti fázisban tapasztalt glutaminsav és  $\text{Na}^+$  koncentráció növekedése összefügg egymással.
3. A görcs gátlásakor a kationok koncentrációja éppen fordítva változik. Trachtenberg /141/ utal arra, hogy különböző görcsgátló szerek /fenobarbital, difenilhidantion, stb./ az extracelluláris  $\text{Na}^+$  koncentrációt növelik, a  $\text{K}^+$ -ét pedig csökkentik. Feltehető, hogy ilyenkor intracellulárisan ehhez képest egy fordított irányú kation újramegosztás következik be.

Az eddig elmondottak alapján feltételezzük, hogy a GDH-nak szerepe van a görcsintenzitás fokának szabályozásában, esetleg a görcskiváltás mechanizmusában is. Mint láttuk a GDH aktivitása és gátlása sok egymással ellentétes következménnyel jár az agyszövet anyagcseréjében. A sokféle hatás abból következik, hogy az enzim fontos kapocs a szénhidrát és aminosavanyagcsere, valamint az energiaforgalom között.

A GDH alloszterikus enzim. Már ma is sok olyan tényező

ismert, amelyek szabályozzák az enzim aktivitását. Ezek között szerepel az ATP, az ammónia, számos hormon /thyroxin, szteroidok/, a különböző ionok, a NAD/NADH arány, stb. A GDH és a szabályozó faktorok között meglevő bonyolult kapcsolatok feltárása nagyban elősegítené a GDH görcs alatti szerepének jobb megértését.

Természetesen felmerül a kérdés, hogy a kísérletesen kiváltott epilepsziák vizsgálata során kapott eredmények mennyiben hasonlíthatók össze a humán epilepsziát vizsgáló kutatók eredményeivel.

Humán epilepsziák esetében eddig a vizsgálatok éppen a kísérletezés nehézségei miatt főleg az eltávolított epilepsziás góc biokémiai analizisére szorítkoztak. Az eredmények szerint az agyból kivett epilepsziás gócok glutaminsav, glutamin, aszparaginsav és l-alanin tartalma 20-40 %-al alacsonyabb volt a kontrolnál /39; 78/.

Egy másik kísérletben Tower /90/ kontrol és epilepsziás szövetet ingerelt. Megállapította, hogy az epilepsziás gócból vett minta nagyobb mértékben használja fel az aminosavakat mint a kontrol szövet. Ugy tűnik tehát, hogy humán epilepszia esetében is az aminosavak növekvő mértékben oxidálódnak. Ennek okáról, illetve a görcsképződéssel való esetleges kapcsolatáról azonban nem tudunk semmit.

Fenti elképzeléseink megerősítésére további vizsgálatok szükségesek. Nagyon fontos lenne vizsgálni a pentobarbital primer hatúhelyének anyagcseretipusát, különös tekintettel a GDH-t tartalmazó mitokondriumokra.

A pentobarbitalon kívül más görcsgátló szerek hatását is meg kell vizsgálni az aminosavanyagcserére.

VI.

Összegzés

1. Ha az egyik oldali hemiszfére gyrus ectosylviusának környékéről kb. 200 mg-os darabot óvatos szárazjeges fagyasztás után kimetszünk, a másik oldal aminosav tartalma gyakorlatilag nem változik.
2. Mély pentobarbital narkózis alatt a glutaminsav, glutamin és GABA mennyisége a kontrol szint alatt van. Az aszparaginsav és l-alanin mennyisége nem változik.
3. Mély pentobarbital narkózis alatt ingerelve az aminosavak szintjének csökkenése jelentős mértékű.
4. A GOT és az AszKT nem gátolható pentobarbitallal.
5. A pentobarbital mindkét irányban gátolja a GDH aktivitását. Ezenkívül gátolja a GPT, GNPT, ALOT, ALKT és GABA-T enzimek aktivitását is.
6. Mély pentobarbital narkózis alatt a vizsgált időintervallumban a glutaminsav és glutamin szintézise gátolt. Az alvás felszinesebbé válásával fokozódik szintézisük.



Disszertációm témája a biokémia és idegélettan területét egyaránt érinti. A végzett munka csak kezdeti lépés. Az eddigi eredmények elérésében azonban nagy segítségemre volt az Intézet valamennyi dolgozója. Külön megköszönöm Dr. Fehér Ottó és Dr. Matkovics Béla egyetemi docensek sokoldalú szakmai és nevelő segítségét. Köszönetet mondok az Intézet minden dolgozójának, akik szives segítségükkel megtiszteltek.

Irodalom jegyzék

1. M. Aberici, G.R.L. Arnaiz, E. De Robertis: Glutamic acid decarboxylase inhibition and ultrastructural changes by the convulsant drug allylglycine. *Bioch. Pharmacol.* 18 /1969/ 579-586.
2. D.E. Abrahms, J.D. Wood: Hydrazide induced seizures and cerebral of levels gamma aminobutyric acid: A re-evaluation. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 1197-1205.
3. P. Andersen, S.A. Anderson, T. Lomo: Thalamo-cortical relations during spontaneous barbiturate spindle potentials. *J. Physiol.* 186 /1966/ 37 P.
4. P. Andersen, S.A. Anderson, T. Lomo: Some factors involved in the thalamic control of spontaneous barbiturate spindles. *J. Physiol.* 192 /1967/ 257-281.
5. P. Andersen, S.A. Anderson, T. Lomo: Nature of thalamo-cortical relations during spontaneous barbiturate spindle activity. *J. Physiol.* 192 /1967/ 283-307.
6. E.G. Anderson, D.D. Bonnycastle: A study of the central depressant action of pentobarbital, phenobarbital and diethylether in relationship to increases in brain 5-hydroxytryptamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 130 /1960/ 138.
7. E.G. Anderson, S.D. Markowitz, D.D. Bonnycastle: Brain 5-hydroxytryptamine and anticonvulsant activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 136 /1962/ 179-182.

8. T. Arnfred, L. Hertz: Effects of potassium and glutamate on brain cortex slices: Uptake and release of glutamic and other aminoacids. *J. Neurochem.* 18 /1971/ 259-265.
9. H. Ashida, N. Takeuchi, A. Mori: Anti-convulsive action of gamma-aminobutyric choline. *Nature* 166 /1950/ 514-515.
10. H.S. Bachelard, J.R. Lindsay: Effects of neurotropic drugs on glucose metabolism in rat brain in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 15 /1966/ 1053-1058.
11. R. Balázs, R.J. Haslan: Exchange transamination and metabolism of glutamate in brain. *Bioch. J.* 94 /1965/ 131-141.
12. R. Balázs, Y. Machiyama, B.J. Hammond, T. Julian, D. Richter: The operation of the gamma aminobutyrate bypath of the Tricarboxilic Acid Cycle in brain tissue in vitro. *Bioch. J.* 116 /1970/ 445-467.
13. T.E. Barman: *Enzyme Handbook*. Springer Verlag, 1969.
14. N.G. Bazán: Changes in free fatty acids of brain by drug induced convulsions, electroshock and anaesthesia. *J. Neurochem.* 18 /1971/ 1379-1385.
15. C.F. Baxter, E. Roberts, F. Chang: *Inhibition in the Nervous System and gamma aminobutyric acid*. Pergamon Press, 1960.
16. C. Van Den Berg, L.J. Krzalia, P. Mela, H. Waelsch: Compartmentation of glutamate metabolism in brain. *Bioch. J.* 113 /1969/ 281-290.

17. C.J. Van Den Berg: Compartmentation of glutamate metabolism in the developing brain: experiments with labelled glucose acetate, phenylalanine, tyrosine and proline. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 973-983.
18. C.J. Van Den Berg, J. Van Den Velden: The effect of methionine sulphoximine on the incorporation of labelled glucose, acetate, phenylalanine, and proline into glutamate and related aminoacids in the brains of mice. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 985-991.
19. S. Berl, D.P. Purpura, M. Girado, H. Waelsch: Aminoacid metabolism in epileptogenic and non-epileptogenic lesions of the neocortex /Cat/. *J. Neurochem.* 4 /1959/ 311-317.
20. S. Berl, D.D. Clarke, W.J. Niclas: Compartmentation of Citric Acid Cycle metabolism in brain. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 999-1007.
21. S. Berl, W.J. Niclas, D.D. Clarke: Compartmentation of Citric Acid Cycle in brain. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 1009-1015.
22. T.J. Biscoe, O.V. Stranghan: Micro electrophoretic studies of neurones in the Cat Hypocampus. *J. Physiol.* 183 /1966/ 341-359.
23. G.G.D. Blokhnis, H. Veldestra: Heterogeneity of mitochondria in rat brain. *FEBS Letters* 11 /1970/ 179-199.
24. C. Blomstrand, A. Hamberger: Protein turnover in cell-enriched fractions from rabbit brain. *J. Neurochem.* 16 /1969/ 1401-1409.

25. C. Blomstrand, A. Hamberger: Aminoacid incorporatin in vitro into protein of neuronal and glial cell-enriched fractions. *J.Neurochem.* 17 /1970/ 1187-1195.
26. E.F. Blom, E. Costa, G.C. Salmoiraghi: Anesthesia and the responsiveness of individual neurons of the caudate nucleus of the Cat to acatilcholine, norepinephrine, and dopamine administred by microelectrophoresis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 150 /1967/ 244-252.
27. V. Bonavita, R. Guarneri, G. Amore: Nicotinamide adenine dinucleotides in the convulsant rat brain. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 1613-1614.
28. G.H. Borne: *The Structure and Function of Nervous tissue.* Academic Press, 1969.
29. H.E. Bradford, H. Mc Ilwain: Ionic basis for the depolarization of cerebral tissue by extitatory acidic amino acids. *J.Neurochem.* 13 /1966/ 1163-1177.
30. G. Carvajal, M. Russek, R. Tapia, G. Massieu: Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of gamma-aminobutyricacid-L-ketoglutaric acid transaminase. *Bioch.Pharmacol.* 13 /1964/ 1059-1069.
31. S.L. Chan, J.H. Quastel: Effects of neurotropic drugs on sodium influx into rat brain cortex in vitro. *Bioch. Pharmacol.* 19 /1971/ 1071-1085.
32. B. Chance, R.W. Estabrook, J.R. Williamson: *Control of energy metabolism.* Academic Press, 1965.
33. H.T. Cory, S.P.R. Rose: Alanine metabolism in rat cortex in vitro. *J.Neurochem.* 17 /1970/ 1477-1486.

34. C.W. Cotman, G. Banker, S.F. Zornetzer, J.L. Mc Gaugh: Electroshock effects on brain protein synthesis: relation to brain seizures and retrograde amnesia. *Science* 173 /1971/ 454-456.
35. J.M. Crawford, D.R. Curtis: Pharmacological studies on feline Betz cells. *J.Physiol.* 186. /1966/ 121-138.
36. J.M. Crawford: Effects of convulsant barbiturates on cortical neurones. *Brain Res.* 12 /1969/ 485-489.
37. D.G. Cross, H.F. Fischer: The mechanism of Glutamate Dehydrogenase reaction. *J.Biol.Chem.* 245 /1970/ 2612-2621.
38. J. Dobkon: Reversible changes in glutamine levels in the Cat cerebral cortex evoked by afferent electrical stimulation and by administration of Pentamethylentetrazole. *J.Neurochem.* 17 /1970/ 237-246.
39. J. Domonkos, A. Fonyó, I. Huszák, J. Szentágothai: Third International Meeting of the International Society for Neurochemistry. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1971.
40. R.S.Dow, A.F. Guardiola, E. Manni: The influence of the cerebellum on experimental epilepsy. *Electroenceph.Clin. Neurophysiol.* 14 /1962/ 383-398.
41. C.J. Duncan: The Molecular Properties and Evolution of Excitable Cells. Pergamon Press, 1967.
42. J.C. Eccles, R. Schmidt, W.D. Willin: Pharmacological studies on praesynaptic inhibition. *J.Physiol.* 168 /1963/ 500-530.
43. J.C. Eccles, R.M. Eccles, R. Fatt: Pharmacological investigations on a central synapse operated by Acetylcholine. *J.Physiol.* 131 /1956/ 154-169.

44. C. Edwards, M.G. Larrabee: Effects of anaesthetics on metabolism and transmission in sympathetic ganglia of rats: Measurement of glucose in microgram quantities using glucose oxidase. *J.Physiol.* 130 /1955/ 456-466.
45. L. Ernster, B. Kuylenstierna: Structure composition and function of mitochondrial membranes. *FEBS Symposium* 17 /1969/ 5-31, Academic Press.
46. L.A. Fahien, O. Shemisa: Effects of chlorpromazine on Glutamate Dehydrogenase. *Molecular Pharmacol.* 6 /1970/ 156-163.
47. J.A. Ferrendelli, D.B. Mc Dougal: The effect of electroshock on regional CNS energy reserves in Mice. *J. Neurochem.* 18 /1971/ 1197-1205.
48. J. Foldbergova, J. Passoneau, O.H. Lowry: Glycogen, ammonia and related metabolites in the brain during seizures evoked by methionin sulphoximine. *J.Neurochem.* 16 /1969/ 191-203.
49. L. Galzigua, J. Méry: Lecithin-chloroform interaction as a model for the action of general anaesthetics. *Experientia*, 27 /1971/ 626-628.
50. D. Gantheron, R. Durand, A. Yonnes, H.C. Ho: Contrôle de la Déshydrogénation du glutamate au niveau des Mitochondries de coeur de perc. spécifité et tentative de localization de l'activité Déshydrogénase. *Bull.Soc. Chim.Biol.* 50 /1968/ 2121-2139.
51. D. Garfinkel: A stimulation of the metabolism and compartmentation in brain of glutamate, aspartate, the Krebs Cycle and related metabolites. *J.Biol.Chem.* 241 /1966/ 3918-3929.

52. J.C. Van Gilder, J.L.Ó. Leary: Effect of Nembutal anaesthesia upon Purkinje cell activation in the Cat. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.* 30 /1971/ 173-189.
53. G. Gogolák, G. Liebswar, C. Strumph: Action of drugs on electrical activity of Red nucleus. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.* 27 /1967/ 296-303.
54. N.D. Goldberg, J.V. Passochean, O.H. Lowry: Effects of changes in brain metabolism on the levels of Citric Acid Cycle intermediates. *J.Biol.Chem.* 241 /1966/ 3997-4001.
55. V.B. Golovchinsky, S.J. Plehotkina: Difference in the sensitivity of the cerebral cortex and Midbrain Reticular Formation to the action of Diethyl ether and Thialbarbital. *Brain Res.* 30 /1971/ 37-47.
56. D. Gonda, J.H. Quastel: Transport and metabolism of acetate in Rat brain cortex in vitro. *Biochem.J.* 100 /1966/ 86.
57. E. Gründig, J. Haubauer: Veränderungen der Aminosäuren in Rattehirn bei Verringerung  $K^+$  Zufuhr in vivo. *J. Neurichem.* 16 /1969/ 1077-1089.
58. A.F. Guardiola, F. Ayala: Red nucleus fast activity and sings of paradoxical sleep appearing during extinction of eyperimental seizures. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.* 30 /1971/ 547-559.
59. S.R.D.Gupta, E.K. Killam, K.F. Killam: Drug action on rhinencephalic seizure activity in the Cat. *J. Pharmacol. Expether.* 122 /1958/ 16.



60. A. Hamberger: Amino acid uptake in neuronal and glial cell fraction from rabbit cerebral cortex. *Brain Res.* 31 /1971/ 169-178.
61. J.A. Hobson, R.W. Mc Carley: Cortical unit activity in asleep and waking. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.* 30 /1971/ 97-113.
62. D. Holmes, J. Houchin: Units in the cerebral cortex of the anaesthetised Rat and the correlation between their discharges. *J.Physiol.* 187 /1966/ 651-671.
63. F. Irreverre, R.L. Evans, A.R. Hayden: Occurrence of gamma-guanidinobutyric acid. *Nature*, 180 /1957/ 704-705.
64. H. Mc Ilwain: *Biochemistry and the Central Nervous System.* Little, Brown and Company, Boston, 1966.
65. H.H. Jasper, R.T. Khan, K.H.C. Elliott: Amino acids released from the cerebral cortex in relation to its state of activation. *Science*, 147 /1965/ 1448-1449.
66. E.S. Johnson, M.T.H. Roberts, D.W. Stranghan: The responses of cortical neurones to monoamines under differing anaesthetics conditions. *J. Physiol.* 203 /1969/ 216-280.
67. D.A. Jones, H. Mc Ilwain: Amino acid distribution and incorporation into proteins in isolated electrically stimulated cerebral tissues. *J. Neurochem.* 18 /1971/ 41-58.
68. R.H. De Jong, R. Robles, R.W. Corbin, R.A. Nace: Effect of inhalation anaesthetics on monosynaptic and polysynaptic transmission in the spinal cord. *J. Pharmacol. Exp.Ther.* 162 /1968/ 326-330.

69. J. Kandra, G. Levi, A. Lajtha: Control of cerebral metabolite levels. *Archiv. Biochem. and Biophys.* 126 /1968/ 249-260.
70. K.S. King, C. Frieden: The purification and physical properties of Glutamate Dehydrogenase from Rat liver. *J. Biol. Chem.* 245 /1970/ 4391-4396.
71. L.J. King, O.L. Web, J. Carl: Effects of duration of convulsion on energy reserves of the brain. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 13-19.
72. A.J. King, J. Carl: Effects of antiepileptic drugs on brain energy reserves during convulsions. *J. Neurochem.* 16 /1969/ 637-645.
73. M.M. Kivi, J.H. Quastel: Barbohydrate-aminoacid interrelations in brain cortex in vitro. *Nature*, 184 /1959/ 252-256.
74. M. Klingenberg: Morphological and functional aspects of pyridine nucleotide reactions in mitochondria. *Energy-Linked Function of Mitochondria*. Ed: B.Chance, Academic Press, 1963.
75. H.H. Knaape, P. Wiechert: Krampfaktivitet nach intracerebral injection von l-Glutamate. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 1171-1177.
76. Knoll József: *Gyógyszertan, Medicina*, 1968.
77. H.A. Krebs, R.L. Veech: Interrelations between Diphospho and Triphospho-pyridine Nucleotides. *PEBS Symposium* 17 /1969/ 101-109.
78. A. Kreindl: *Experimental Epylepsy*. Academic Press, 1960.

79. K. Krnjevic, J.W. Phillis: Pharmacological properties of Ach-sensitive cells in the cerebral cortex. *J. Physiol.* 166 /1969/ 328-350.
80. K. Krnjevic, V.P. Whittaker: Excitation and depression of cortical neurones by brain fractions released from micropipettes. *J. Physiol.* 179 / 1970/ 296-327.
81. K. Krnjevic, J.W. Phillis: Acetylcholine sensitive cells in the cerebral cortex. *Physiol.* 166 /1963/ 296-327.
82. K. Krnjevic, J.W. Phillis: Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. *J. Physiol.* 165 /1963/ 274-304.
83. K. Kuriaki: Gamma-amino butyrylcholine. *Nature* 181 /1956/ 1336-1337.
84. A. Lajtha: Handbook of Neurochemistry, III. Pergamon Press, 1970.
85. C. Lamar: Mercaptopropionic acid a convulsant that inhibits Glutamate Decarboxylase. *J. Neurochem.* 17 /1970/ 165-170.
86. M.D. Larson, M.A. Major: The effect of hexobarbital on the duration of the recurrent IPSP in Cat motoneurons. *Brain Res.* 21 /1970/ 309-311.
87. A. Lassansky: Nervous function at the cellular level glia. *Ann. Rev. Physiol.* 33 /1971/ 241-256.
88. H. Mc Lennan, K.A.C. Elliott: Effects of convulsant and narcotic drugs on Acetylcholine synthesis. *J. Pharmacol.* 103 /1951/ 23-24.

89. B.E. Leonard: The effect of the chronic administration of barbitone sodium on labile compound in the rat brain. *Biochem.Pharmacol.* 15 /1966/ 255-262.
90. Liszák Kálmán: Results in Neuroanatomy, Neurochemistry, Neuropharmacology and Neurophysiology. Akadémiai Kiadó, 1965.
91. J.W. Maas, R.W. Bolburn: Co-ordination chemistry and membrans function with particular reference to the synapse and catesholamine transport. *Nture*, 208 /1965/ 41-46.
92. Y. Machiyama, R. Balázs, B.J. Hammond, T. Julien, D. Richter: The metabolism of Gamma-aminobutyrate and glukose in potassium ions stimulated brain tissue in vitro. *Biochem.J.* 116 /1970/ 469-481.
93. R.K. Margolis: The effect of Gamma-hydroxybutyric acid on amino acid levels in brain. *Biochem.Pharmacol.* 18 /1969/ 1243-1246.
94. P. Masel, M.T. Bash: Brain barbital levels and anaesthesia as influenced by physostigmine and epinephrine. *Biochem.Pharmacol.* 18 /1969/ 579-586.
95. B.S. Meldrum, E. Balzano, M. Gadea, R. Maquet: Photic and drug induced epilepsy in the Babon. The effects of isoniazid, thiosemicarbazide, pyridoxine and amino-oxyacetic. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.* 29 /1970/ 337-347.
96. A.W. Merrich: Encephalic glycogen differences in yung and adult rats. 158 /1961/ 476-486.

97. L.I. Miloslavshaia: The effect of barbiturates on the activity of cerebral asparaginase and glutaminase. *Biokhimiya*, 23 /1958/ 347-350.
98. F.M. Minard, R.D. Davies: Effect of chlorpromazine, ether and phenobarbital on the active phosphate level of Rat brain. *Nature*, 193 /1962/ 277-278.
99. J.F. Mitchell: The spontaneous and evoked release of Acetylcholine from the cerebral cortex. *J.Physiol.* 165 /1963/ 98-116.
100. J. Mouret, M. Jouvet, J. Glowinski, J.P. Pujol: Increased turnover of cerebral Morepinephrine during rebound of paradoxical sleep, in the Rat. *Science*, 159 /1968/ 112-114.
101. S. Nahasawa, J.H. Quasteri: Acetylcholine reversal of potassium inhibition of amino acid transport in Rat brain cortex slices. *Canad.J.Biochem.* 46 /1963/ 363.
102. S.R. Nahorski, D.J. Roberts, G.G. Stewart: Some neurochemical aspects of Pentamethylenetetrazole convulsive activity in Rat brain. *J.Neurochem.* 17 /1970/ 621-631.
103. V. Nair, O. Ban: Studies on the functional significance of carbonic anhydrase in Central Nervous System. *Brain Res.* 31 /1971/ 185-193.
104. V.S. Omer: Investigations into mechanisms responsible for seizures induced by chlorinated hydrocarbon insecticides: The role of brain ammonia and glutamine in convulsions in the Rat and Cocherel. *J. Neurochem.* 18 /1971/ 365-374.

105. R. Paoletti, J.R. Fugamelli, C. Galli: Second International Meeting of the International Society for Neurochemistry. Tamburini Editore, Milan, 1969.
106. J.M. Pasquini, J.R. Salomone, C.J. Gomez: Aminoacid changes in the Mouse brain during audiogenic seizures and recovery. *Experimen.Neurobiol.* 21 /1968/ 245-256.
107. A.J.Patel, R. Balázs: Manifestation of metabolic compartmentation during the maturation of the Rat brain. *J.Neurochem.* 17 /1970/ 955-971.
108. G.Popen, A. Bartolini, R. Bartolini: Differences of GABA content in the cerebral cortex of Cata transected at various midbrain levels. *Biochem.Bharmacol.* 19 /1970/ 1007-1013.
109. Pfeifer A. Klára, Galambos Éva: Az agy monoaminszint változásának szerepe a görcskésztség alakulásában. *Magy.Tud.Akad.Biol.Orvostud.Oszt.Közl.* 17 /1966/ 291-301.
110. F.Piccoli, R. Cammarda, V. Bonavita: Purine and pyrimidine nucleotides in the brain of normal and convulsants Rats. *J. Neurochem.* 16 /1969/ 159-169.
111. D.A. Pollen, C.C. Trachtenberg: Neuroglia: gliosis and focal Epilepsys. *Science*, 167 /1970/ 1252-1253.
112. L.T. Potter: Storage of Norepinephrine in sympathetic nerves. *Pharmacol.Rev.* 18 /1966/ 439-451.
113. D.A. Prince: Electrophysiology of "epileptic" neurons: Spike generation. *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.* 29 /1969/ 476-488.

114. G. DiPrisco, H.J. Strecher: Effects of Phosphate and other ionic compounds on the activity of cristalline Beef liver Glutamate Dehydrogenase. *European J.Biochem.* 9 /1969/ 507-511.
115. G. DiPrisco, B.D. Udine, M. Pepo, F. Scalenghe: Amino and aromatic groups in enzymic catalyzis: Active and allosteric sites of Glutamate Dehydrogenase. *Biochem. J.* 117 /1970/ 51-52P.
116. J.J. Pysh: Mitochondrial changes in Rat inferior colliculus during postnatal development: An electron microscopic study. *Brain Res.* 18 /1970/ 325-342.
117. G. Quarton, T. Melnechuk, F.O. Smitt: *The Neurosciences.* The Rockefeller University Press, New York, 1967.
118. H.W. Readling, J. Wallwork: Oxidation of succinate and pyruvate in Rat brain and its effect on barbiturate anaesthesia. *BiochemPharmacol.* 18 /1969/ 2211-2214.
119. J.J. Richter, A. Wainer: Evidence for separate systems for the transport of neutral and basic aminoacids across the blood-brain barrier. *J.Neurochem.* 18 /1971/ 613-621.
120. O. Richter, J. Crossland: Variation in Acetylcholine content of the brain with physiological state. *Americ. J.Physiol.* 159 /1949/ 247-255.
121. E. Roberts, S. Matthyase: *Annul Rew. off Biochem.* 39 /1970/

122. E. Roberts, E. Eidelberg: Metabolic and neurophysiological roles of Gamm-aminobutyric acid. International Rev. of Neurobiol. Academic Press, 2 /1960/ 280-237.
123. S.P.R. Rose: The compartmentation of glutamate and its metabolites in fractions of neuron cell bodies and neuropil: studied by intraventricular injection of /U<sup>14</sup>C/ glutamate. J. Neurochem. 17 /1970/ 809-816.
124. R.H. Roth, Y. Suhr: Mechanism of the Gamma-amino-hydroxybutyric acid rate-induced increase in brain dopamine and relationship to "sleep". Biochem. Pharmacol. 19 /1970/ 3001-3012.
125. B. Sadasivudu, A. Lajtha: Metabolism of amino acids in incubated slices of Mouse brain. J. Neurochem. 17 /1970/ 1299-1308.
126. E. Schoffeniels: Cellular Aspects of Membrane Permeability. Pergamon Press, 1967.
127. E.M. Sedgwick, T.D. Williams: The response of single units in Caudate nucleus to peripheral stimulation. J. Physiol. 189 /1967/ 281-298.
128. I. Sharwin: Burst activity of single units in the penicillin epileptogenic focus. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 29 /1970/ 272-382.
129. E.C. Slater, J.M. Tager: Provision of reducing power for glutamate synthesis. Energy-Linked Functions of Mitochondria. Academic Press, 1963, 97-120.



130. E.L. Smith, M. Landon, D. Pistkiewitez, W.J. Brattin, T.J. Langley, M.D. Melamed: Bovine liver Glutamate Dehydrogenase: Tentative amino acid sequence: Identification of a reactive Lysine: Nitration of a specific Tyrosine and loss of allosteric inhibition by Guanosine Triphosphate. *Proceed.Nat.Acad.Scienc.* 67 /1970/ 723-730.
131. A. Szobieszek: Spontaneous sleep and barbiturate spindles in dog. *E.E.G.J.Physiol.* 197 /1968/ 29P-30P.
132. V. Srinivasen, M.J. Neal, J.P. Mitchell: The effect of electrical stimulation and high potassium concentrations on the efflux of  $^3\text{H}$  Gamma-aminobutyric acid from brain slices. *J.Neurochem.* 16 /1969/ 1235-1245.
133. H.J. Strecker: *Methods in Enzymology*, II. Ed: by Colowick and Kaplan, Academic Press, 1955.
134. M.R. Summers, K.J. Yielding: Energy transfer in the Glutamate Dehydrogenase-NADH binary complex and its relation to the binding of cofactor. *Biochem.Biophys. Acta*, 223 /1970/ 374-382.
135. H. Takahashi, A. Nagashima: Effect of Gamma-aminobutyric-choline upon the electrical activity of the cerebral cortex. *Nature*, 182 /1957/ 1443-1444.
136. N. Tahl, G.M. Tomkins, J.E. Mushinski, J.E. Yielding: Immunochemical evidence for multiple molecular forms of crystalline Glutamic Dehydrogenase. *J.Mol.Biol.* 8 /1964/ 56-53.

137. A. Takeuchi, Noriko Takauchi: On the permeability of the presynaptic terminal of the crayfish neuromuscular junction during synaptic inhibition and the action of Gamma-amino-butyric acid. *J.Physiol.* 183 /1966/ 433-449.
138. A. Takeuchi, Noriko Takeuchi: A study of the inhibitory action of Gamma-aminobutyric acid on neuromuscular transmission in the crayfish. *J.Physiol.* 183 /1966/ 418-432.
139. R. Tapia, H. Pasantes, M.R. de La Mora, B.G. Ortega, G.H. Massien: Free amino acids and Glutamate Decarboxylase in brain of Mice during drug-induced convulsions. *BiochemPharmacol.* 16 /1967/ 483-496.
140. J.K. Tawe, W.E. Stone: Effects of methionine sulfonium on levels of free amino acids and related substances in brain. *Biochem.Pharmacol.* 13 /1964/ 543-544.
141. M.C. Trachtenberg, D.A. Pollen: Neuroglia: Biophysical properties and physiologic function. *Science*, 167 /1970/ 1248-1252.
142. I.P. Utley: Changes in Pentobarbital distribution with time in neuronal and non-neuronal tissue of the Cat brain. *BiochemPharmacol.* 14 /1965/ 353-355.
143. Szarkiszov Sz.A.: Agysztruktúra és agyfunkció. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1968.
144. P.Y. Sze, K. Kuriyama, E. Roberts: Thiosemicarbazide and Gamma-aminobutyric acid metabolism. *Brain Res.* 25 /1971/ 387-396.

145. P.Y. Sze, K. Kuriyama, B. Haber, E. Roberts: Effects of Gamma-aminobutyric acid on l-Glutamic acid Decarboxylase activities in chick embryo brain. Brain Res. 26 /1971/ 111-130.
146. G.C. Villela, O.R. Alfonso, E. Mitidieri: Inhibitory effect of barbiturate on brain and serum xanthine oxidase. Biochem.Pharmacol. 15 /1966/ 1894-1896.
147. H. Waelsch: Biochemical interpretations of neurophysiological vectors. Perspectives in Biology and Medicine. IX. 1965.
148. J.C. Watkins: The effects of excitatory and inhibitory aminoacids on metabolism of endogenous brain aminoacids in the nembutalized Mouse. Brain Res. 29 /1971/ 293-313.
149. J.C. Watkins: The influence of intraventricularly injected aminoacid antagonists on the labelling of endogenous brain aminoacids from  $/U^{14}C/$  acetate in nembutalized mice. J.Neurochem. 18 /1971/ 1733-1739.
150. J.N. Weakly: Effect of barbiturates on quantal synaptic transmission in spinal motoneurons. J.Physiol. 204 /1969/ 63-77.
151. J.L. Webb, R.A.C. Elliott: Effects of narcotics and convulsant on tissue glycolysis and respiration. J. Pharmacol. 103 /1951/ 24-34.
152. H. Weil-Malherbe, J. Gordon: Amino acid metabolism and ammonia formation in brain slices. J. Neurochem. 18 /1971/ 1659-1672.

153. R. Whittam: The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem.J.* 82 /1962/ 205-212.
154. P. Wiechert, G. Göllnitz: Die Konzentrationen der freien Aminosäuren im Hirngewebe vor und während experimentall ausgelöster cerebral Anfälle. *J.Neurochem.* 16 /1969/ 1007-1118.
155. P. Wieschert, G. Göllnitz: Die Beteiligung der Transaminasen und der GDH am Krampfgeschehen. *J. Neurochem.* 16 /1969/ 689-703.
156. P. Wiechert, G. Göllnitz: Stoffwechseluntersuchungen des cerebralen Anfallgeschehens. Untersuchungen der Glutamatstoffwechsels in verschiedenen Hirnrealen des Hundes im Bräkonvulsiven Zustand. *J.Neurochem.* 17 /1970/ 137-149.
157. I. Wórum, J.Porszász: Relationship between age, electrochock seizure susceptibility and cerebral Gamma-aminobutyric acid level. *Acta Physiol.Ac.Scient. Hung.* 4 /1968/ 383-393.
158. Y. Yoshino, K.A.C. Elliott: Incorporation of Carbon atoms from glucose into free amino acids in brain under normal and altered conditions. *Canad.J.Biochem.* 48 /1970/ 228-235.
159. T. Yamaguchi: Inhibition of Glutamate Dehydrogenase by Bilirubin. *J.Biochem.* 68 /1970/ 441-447.

