

SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

A KOLINERG ÉS GABAERG NEURONÁLIS STRUKTURÁK LOKALIZÁLÁSA PATKÁNY
BULBUS OLFACTORIUSÁBAN

Doktori értekezés

Készítette: Gulya Károly



Készült: SZOTE KÖZPONTI KUTATÓLABORATÓRIUM

1980

B 5072



E 1.949

T a r t a l o m

Oldal

1.	Bevezetés, irodalmi előzmények és célkitűzés	1
1.1.	A bulbus olfactorius /szaglógumó/ szerkezete és működése	1
1.2.	A GABA lokalizációja és szerepe a transzmissziós folyamatokban	11
1.3.	Az acetilkolin rendszer lokalizálása és szerepe a transzmissziós folyamatokban	14
1.4.	A GABA és az ACh közötti interakció morfológiai alapja	21
1.5.	Intraneuronális anyagtranszport	23
1.6.	Célkitűzések	26
2.	Anyag és módszer	27
2.1.	A GABA megoszlásának és transzportjának vizsgálatánál alkalmazott módszerek	27
2.2.	A kolinerg rendszer vizsgálatánál alkalmazott módszerek	30
3.	E r e d m é n y e k	38
3.1.	A GABA neuronális lokalizációja a bulbus olfactoriusban	38
3.2.	A GABA intraneuronális transzportja	40
3.3.	Az acetilkolinészteráz hisztokémiai lokalizációja a bulbus olfactoriusban	45
3.4.	Az acetilkolinészteráz és a kolinacetiltranszferáz kvantitatív meghatározása normál és bulbectomizált állatok bulbusában	49
3.5.	Degenerációs vizsgálatok	51
3.6.	Magas affinitású kolin felvétel demonstrálása bulbus homogenátumban	52
3.7.	Kolin uptake autoradiográfiás vizsgálata	55
3.8.	³ H-QNB kötés a muszkarinos acetilkolin receptorokhoz	57
3.9.	Muszkarinos acetilkolin receptorok fénymikroszkópos autoradiográfiás lokalizálása	57
4.	M e g b e s z é l é s	60
5.	Ö s s z e f o g l a l á s	65
6.	Köszönetnyilvánítás	67
7.	Irodalomjegyzék	68

1. Bevezetés, irodalmi előzmények és célkitűzés

1.1. A bulbus olfactorius /szaglógumó/ szerkezete és működése

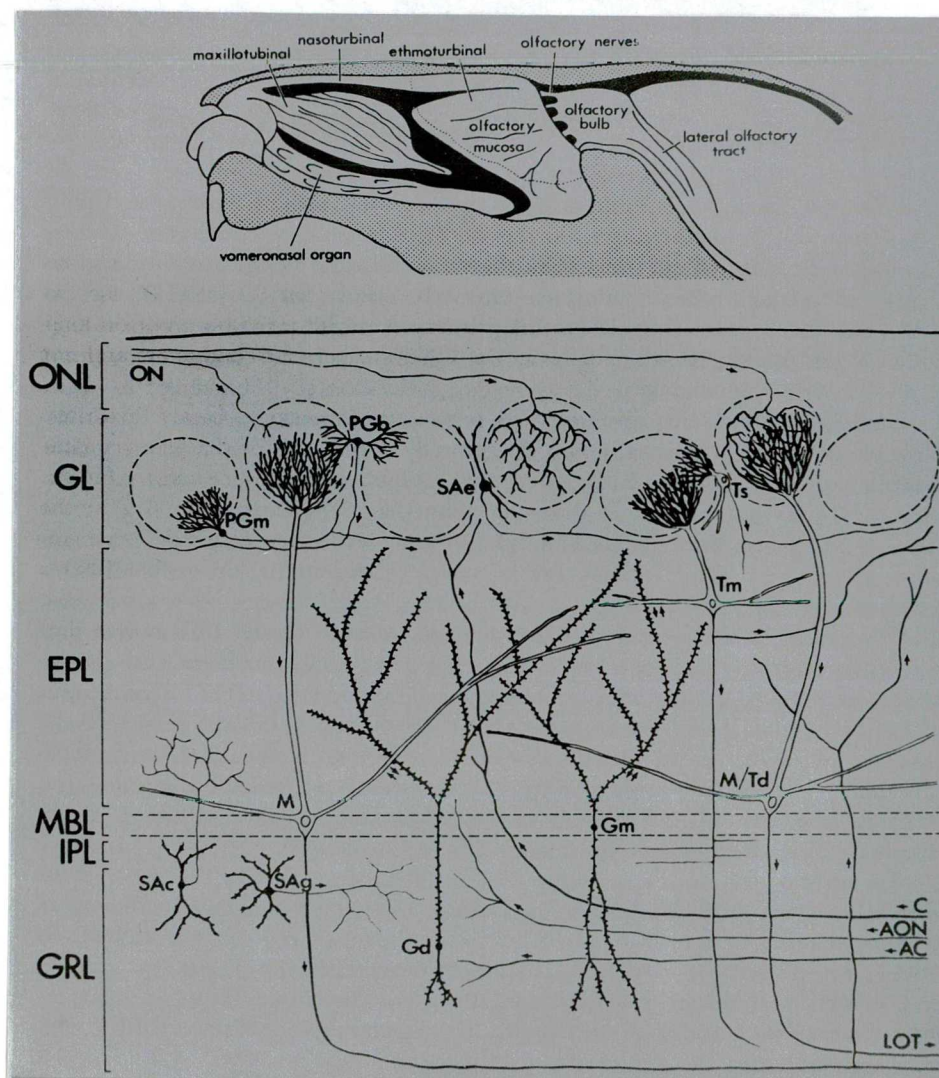
A bulbus olfactorius finomszerkezetileg, elektrofiziológiailag egyre jobban ismert diszkrét agyszakasz, amelyről a vizsgáló módszerek tökéletesedése során mind részletesebb információt kapunk. A terület első mikroszkópos leírását Cajal /1911/ adta. E század negyvenes éveiben indult meg a bulbus elektrofiziológiai vizsgálata, ami ma már a legmodernebb intracelluláris regisztrálással folyik. A hatvanas években finomszerkezetének jelentős részét is feltárták.

A gerinces szaglórendszer három fő egységre osztható fel:

- a./ a perifériás rész, amelyet a neuroepithelium és a szaglógumó;
- b./ a közbülső rész, amelyet a nucleus olfactorius anterior alkot, valamint a paleocorticalis areákból összetevődő
- c./ centrális rész.

Ad. a. A bulbus olfactorius emlősökben hat rétegű ovoid képlet, rétegei a következők: 1. stratum filorum olfactorium; 2. stratum glomerulosum; 3. stratum plexiforme externum; 4. stratum mitrale; 5. stratum plexiforme internum; 6. stratum granulosum. A sejtek alakjuk és elhelyezkedésük szerint lehetnek mitrális, ecset- /külső, ill. közbülső vagy kihelyezett mitrális/, periglomeruláris, szemcse- és külső, rövid axonú sejtek /l. kép/.

A szaglóhám receptorsejtjeinek axonjaiból összeszedő fila olfactoria myelinizálatlan nyálábjai /Robinson és Quinn, 1978/ a lamina cribrosa lyukacsain átjutva közvetlenül belépnek a bulbusba, ahol nagy, gömbszerű szinapszis rendszerekben, a glo-

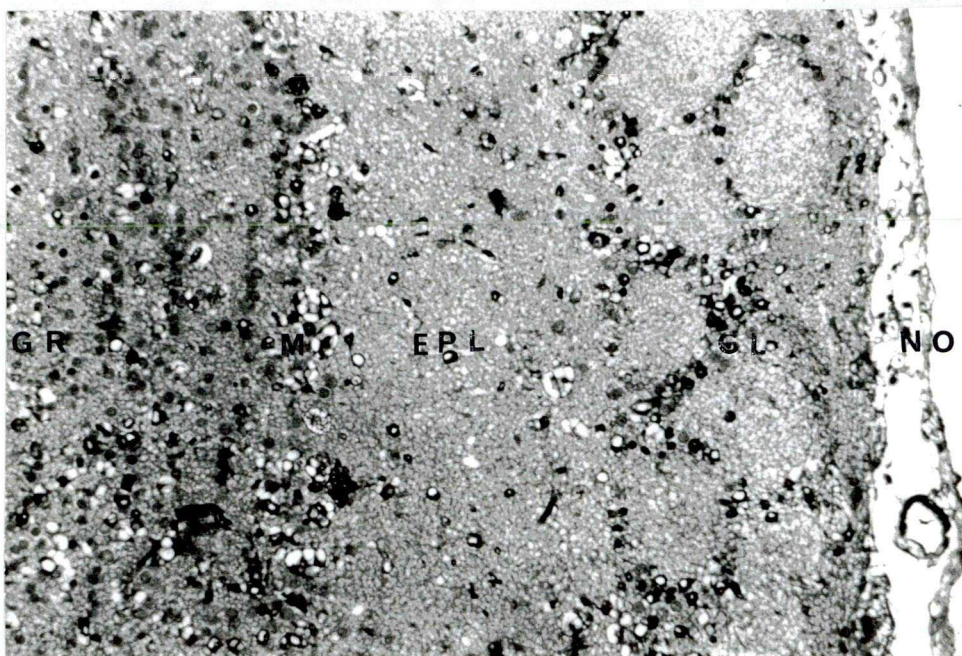


1. kép: Összefoglaló sémás rajz a bulbus olfactorius szerkezetéről és idegelemeinek fontosabb összeköttetéseiről /Shepherd, 1972 után/. Jelölések: ONL: str. filorum olfactorium; GL: str. glomerulare; EPL: str. plexiforme externum; MBL: str. mitrate; IPL: str. plexiforme internum; GRL: str. granulosum; ON: nervus olfactorius; PGm: periglomeruláris sejt monoglomeruláris dendrittel; PGb: periglomeruláris sejt biglomeruláris dendritekkel; SA_e: külső rövid axonú sejt; Ts: külső ecsetsejt; Tm: közbulós ecsetsejt; M és M/Td: mitrális sejt ill. kihelyezett mitrális sejt; SA_c és SA_g: belső rövid axonú sejtek; Gm és Gd: granuláris sejt a felső ill. alsó granuláris rétegben; C: centrális rost; AON: a n. olfactorius anteriorból jövő rost; AC: rost a comissura anteriorból; LoT: tractus olfactorius lateralisban futó axon.

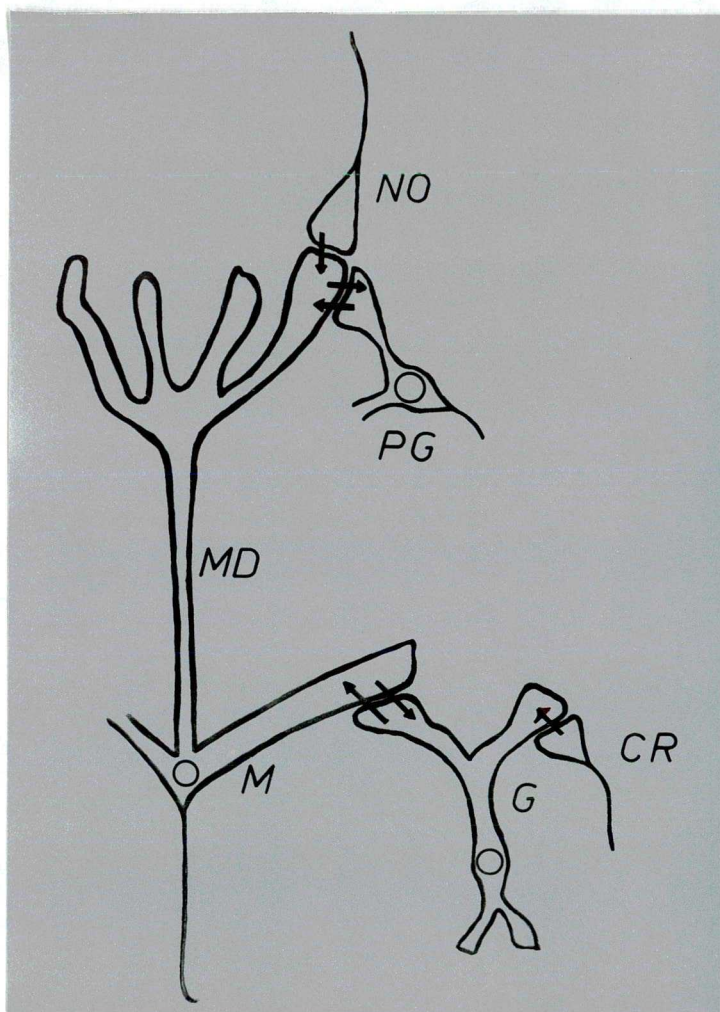
meruli olfactoriiben szövődnek össze a bulbus idegsejtjeinek dendritjeivel. Ilymódon a szaglórendszer első szinapszisa a központ felé a bulbus olfactoriusban van. A glomerulusok neuropiljében a szaglóideg axonjaival három neurontípus, a mitrális az ecset és a periglomeruláris sejt alkot szinapszist /2.kép/.

A periglomeruláris sejtek a bulbus interneuronjai, nyúlvaik nem hagyják el a szaglógumót. A biglomeruláris dendritekkel rendelkező periglomeruláris sejtek két glomerulussal kapcsolódnak, interglomeruláris összeköttetést biztosítva. A periglomeruláris sejtek másik típusa monoglomeruláris dendritarborizációval rendelkezik, moduláló hatása tehát csak egy glomeruluson belül érvényesül. Ezekre a sejtformákra rövid axon jellemző, amely a közeli glomerulusok környékén végződik. A periglomeruláris sejtek vastag dendritfáján a mitrális és ecsetsejtek dendritjei dendro-dendritikus, a szaglóideg végződése axondendritikus szinaptikus kapcsolatot létesítenek. Elektrofiziológiai vizsgálatok ezekről az idegsejtekről kimutatták, hogy gátló interneuronok és szerepük az intraglomeruláris reciprok gátlásban fontos /Yamamoto és mtsai, 1963/.

A mitrális sejtek primer dendritjei dúsan elágazódnak és axodendritikus szinapsziszokon át veszik fel a szaglóidegek által a glomerulusokba hozott információt. A szekunder dendriteken keresztül pedig számos szemcsesejt fejti ki moduláló hatását a reciprok dendro-dendritikus szinapszison át/3.kép/. A mitrális sejt a bulbus fő projekciós neuronja, axonjai -- az ecsetsejtekével együtt -- a tractus olfactorius laterálisban futnak, a nucleus olfactorius anterior, a prepyriform és a preamygdaloid kéreg felé.



2. kép: Normál bulbus 4 μ -os toluidinkékkel festett fénymikroszkópos metszete. Jelölések: GR: str. granulosum; M: str. mitrate; EPL: str. plexiforme ext.; GL: str. glomerulosum; No: str. filorum olfactorium



3. kép: Sémás rajz a mitrális, szemcse-, és periglomeruláris sejtek kapcsolatairól /Shepherd, 1972 után/.

Jelölések: No: nervous olfactorius; Pb: periglomeruláris sejt; MD: mitrális dendrit; M: mitrális sejt; G: szemcsesejt; CR: centrális rost. A nyilak a transzmisszió irányát jelölik.



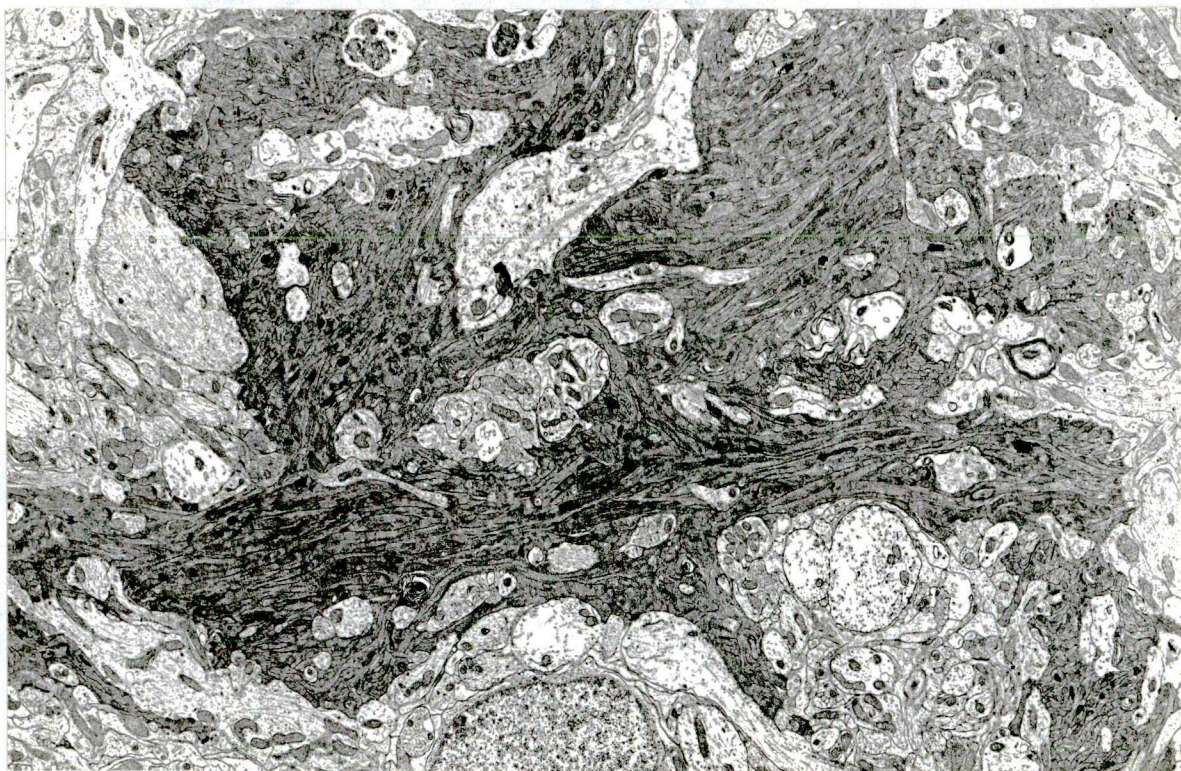
Alakjuk, méretük, elhelyezkedésük, centripetális irányuk és nagyszámú kapcsolataik alapján a mitrális sejtek homológok a kérgi nagy piramissejtekkel.

A bulbus olfactorius másik fő projekciós neuronja az ecsetsejt, morfológiailag nagyon hasonló a mitrális sejttípushoz. A külső rostos rétegben szétszórtan, aránylag kis számban találhatók, s közöttük bizonyos szintbeli szerveződés figyelhető meg. A külső ecsetsejtek a glomerulusok közti térben helyezkednek el, szómájuk alig emlékeztet a piramis sejttípusra, kollaterálisai a glomerulusok környékén végződnek. A közbülső ecsetsejtek a külső plexiform réteg felső harmadában találhatók, szekunder dendritjeik révén a szemcsesejtekkel állnak reciprok szinaptikus kapcsolatban. E réteg alján, közel a mitrális sejtréteghez, helyezkednek el a morfológiailag a mitrális sejtekkel azonos mély ecset, vagy kihelyezett mitrális sejtek. Az ecsetsejtek axonjai a mitrális axonokkal keveredve a tractus olfactorius laterálisban futnak.

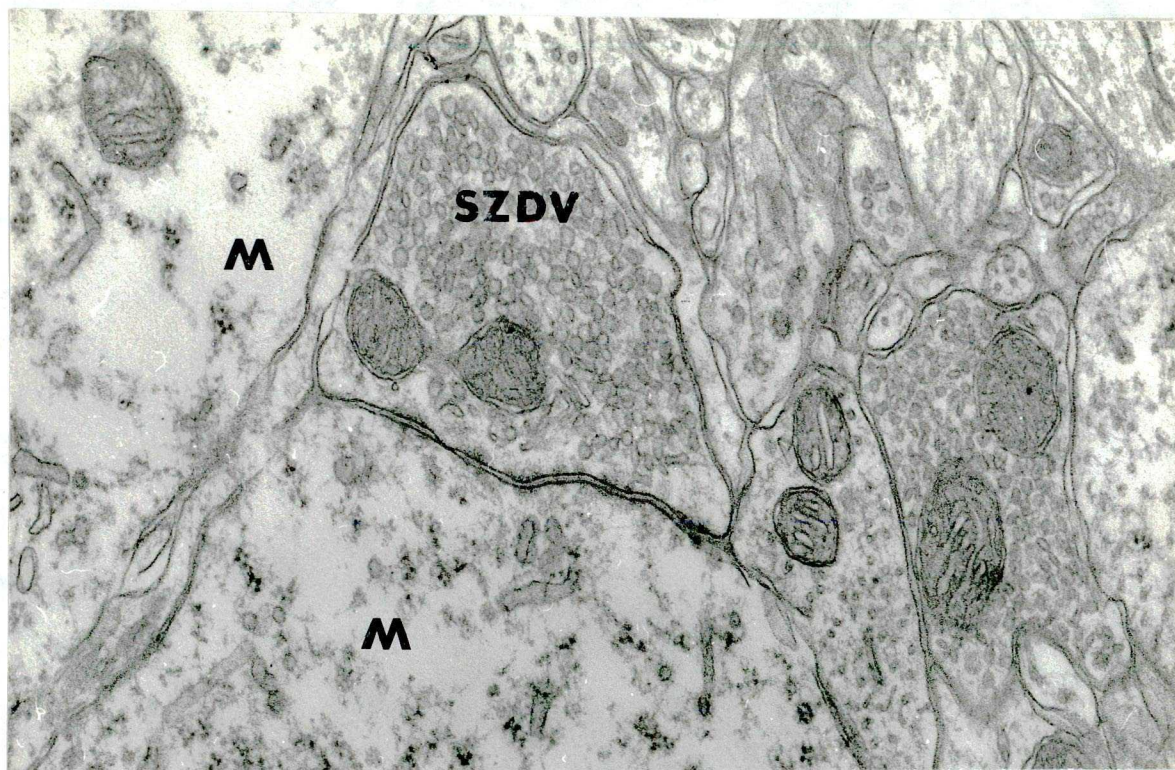
A granuláris réteg a bulbus olfactorius közel felét alkotja. Idegsejttípusa a kis szómájú szemcsesejt, a szaglógumó legnagyobb számban előforduló neuronja. Ezeknek az interneuronoknak valódi axonjuk nincs, összes periferikus nyúlványuk dendrit. A szómák egymás mellett lamelláris elhelyezkedésben a bulbus tengelyével párhuzamosan rendeződnek. A szemcsesejtek ezen sorai közt futnak a mitrális és ecsetsejtek axonjai, s ugyanitt haladnak az agyközpontok felől jövő centrifugális rostok, valamint a nucleus olfactorius anteriorból és a commissura anteriorból érkező nyúlványok.

A bulbus olfactorius interneuronjai révén kialakuló lokális ingerületi körök befolyásolják a szaglógumó egészének tevékenységét. Ennek a moduláló működésnek a külső rostos réteg jellegzetes szinapszis mintázata teremti meg a feltételeket. Ebben a rétegben alkotják a mitrális és ecsetsejtek szekunder dendritjeikkel reciprok szinapszisaikat a szemcsesejtek periférikus nyúlványival, ugyanakkor valószínű, hogy maguk pedig központi rostoktól szabályozottak /4-9.képek/.

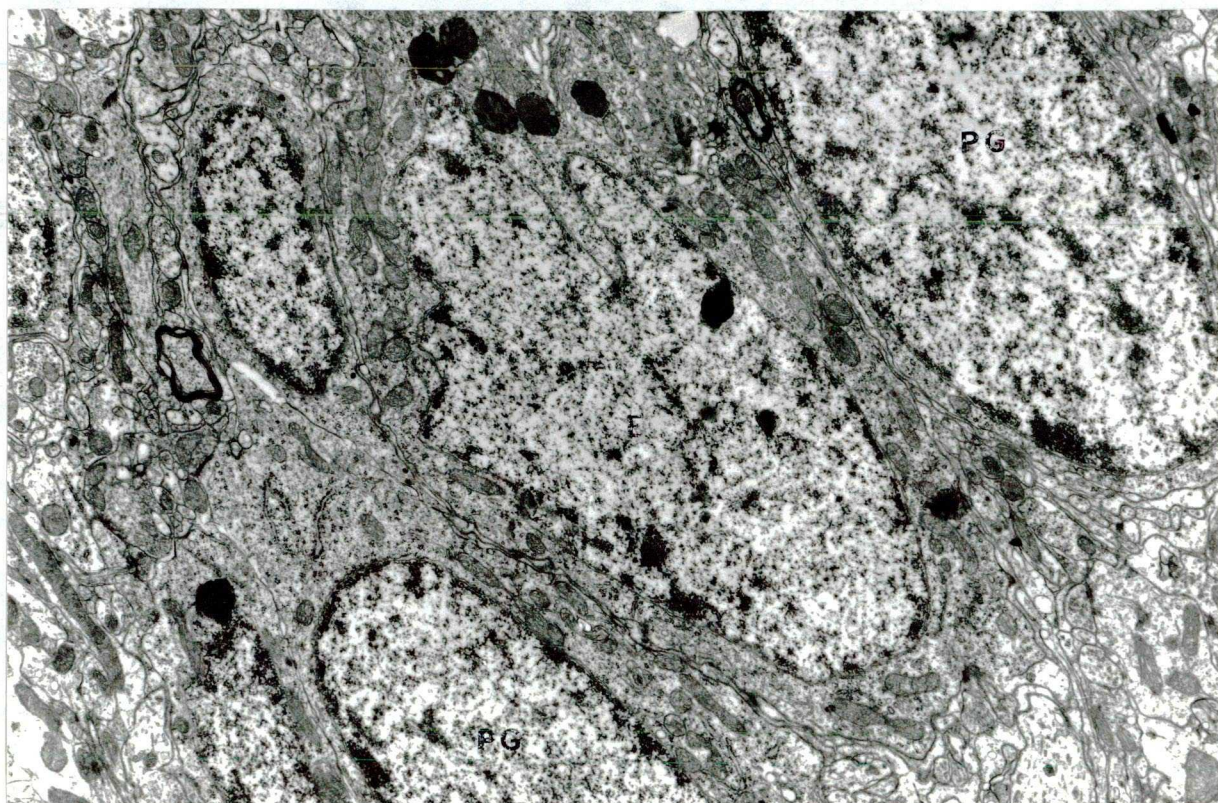
Ad. b. A szaglórendszer közbülső részét a nucleus olfactorius anterior alkotja. Nem igazi szubkortikális mag, hiszen nincs jól körülhatárolható fehér állománya, inkább csak számos, minden irányban átszelő kötegei vannak. Ez a szaglóterület négy fő részre osztható fel. A rostralis rész a bulbus legbelső területe, a ventrikuláris fala mentén elszórtan számos, nagy sejtekből álló csoportosulás figyelhető meg. Axonjaik a commissura anteriorba futva a kontralateralis oldalon elhelyezkedő n. olfact. anterior externális részében axodendritikus szinapszissal végződnek. Az externális rész a fő bulbus granuláris rétegének folytatása, abba elhatárolhatatlanul olvad bele. A laterális rész a prepyriform kéreg felé terjed ki; legfontosabb sejttípusa a piramis, de a dendritarborizációja nagyon heterogén. A n. olf. anterior mediális része relative kis sejtekből álló csoportokból épül fel. Rostjai a kontralateralis bulbus olfactoriusba futnak a commissura anterioron át. A nucleus olfactorius anterior a bulbáris efferens impulzusok közvetítője az ellenkező oldali bulbusba és az azonos oldali előagyi struktúrák felé.



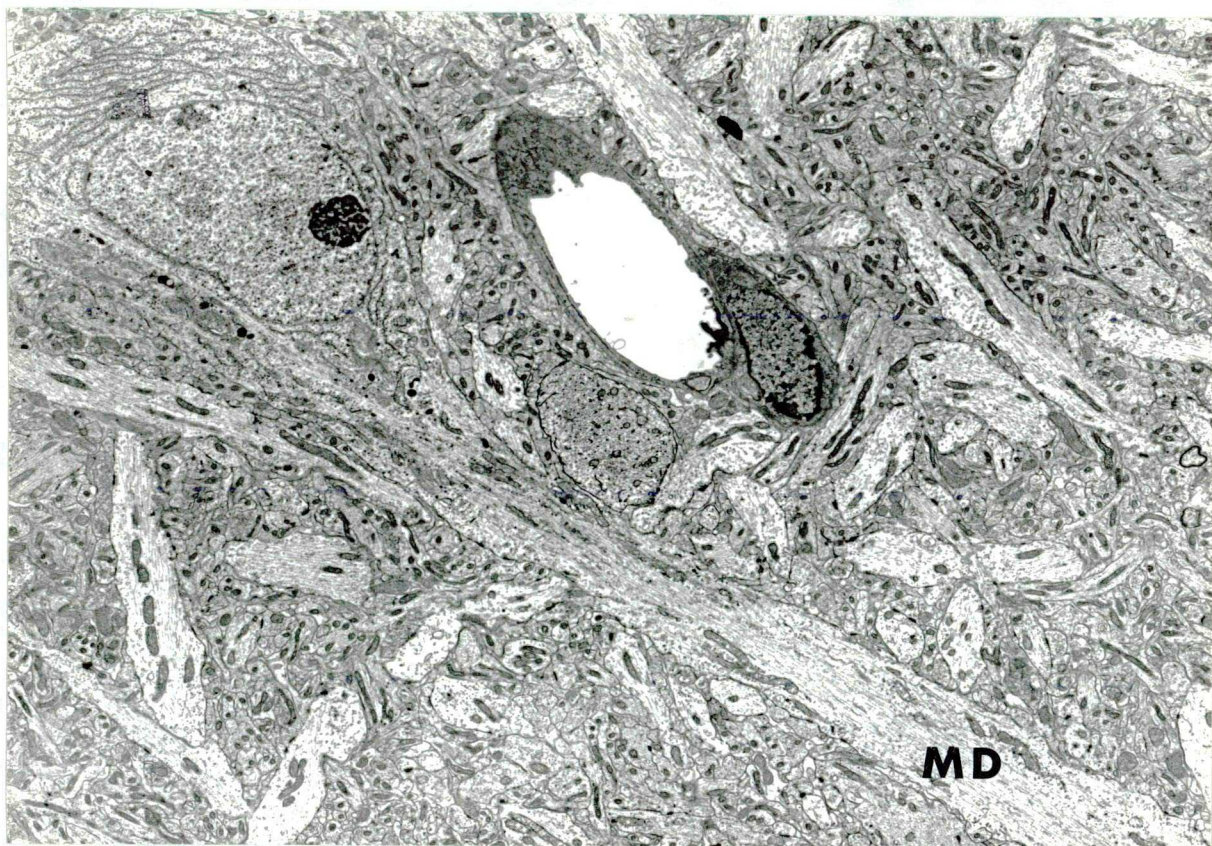
4. kép: Elektronmikroszkópos felvétel normál bulbus glomeruláris területéről. A sötét rostok a nervus olfactorius axonjai. x 2300



5. kép: Elektronmikroszkópos kép normál bulbus mitrális sejtjeinek rétegéből. Jelölések: SZDV: szemcsesejt dendritvégződés; M: mitrális sejt. x 16000



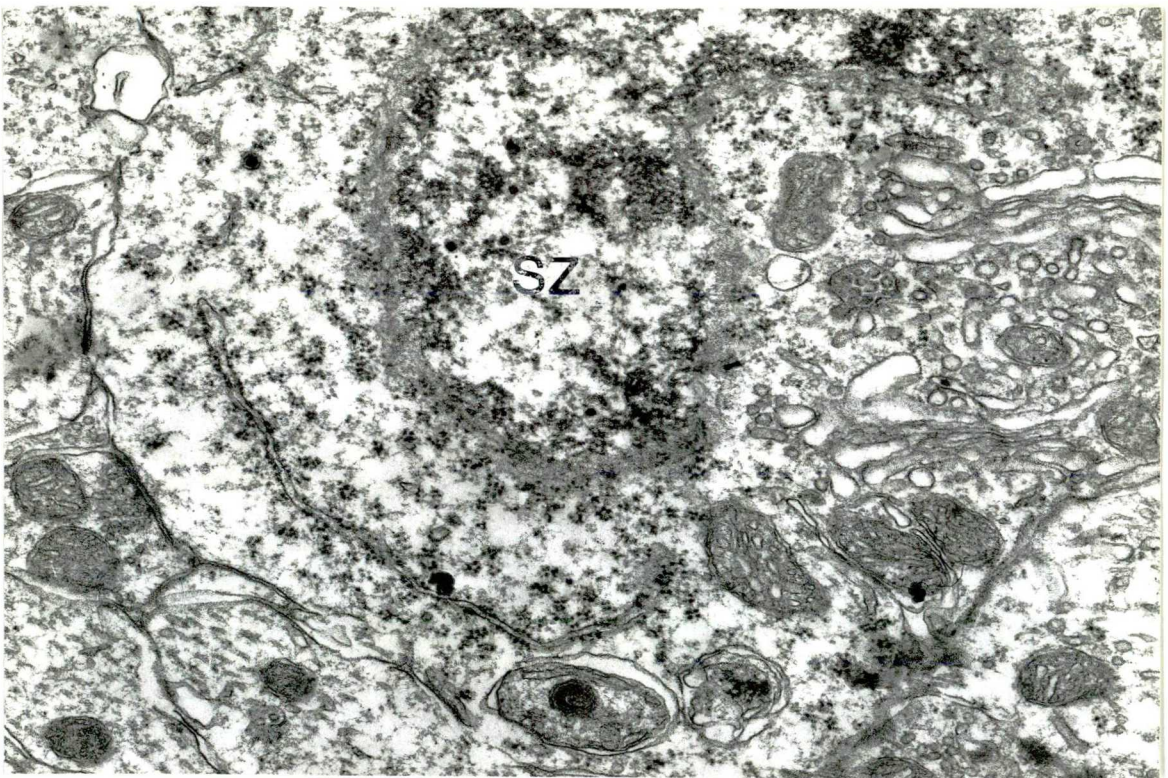
6. kép: EM felvétel két glomerulus közti területről. Jelölések: PG: periglomeruláris sejt; E: külső ecsetsejt. x 3900



7. kép: EM kép a mitrális sejtről és egyik dendritjéről. M: mitrális sejt; MD: mitrális dendrit. x 1820



8. kép: Részlet a külső rostos rétegből. A képen egy centrális eredetű rost végződik a mitrális és szemcsesejt dendritek közt.
Jelölések: MD: mitrális dendrit; SzD: szemcsesejt dendrit; CR: centrális eredetű rost. x 13500



9. kép: Elektronmikroszkópos felvétel egy szemcsesejtről /Sz/.
x 11250

Ad. c. A szaglórendszer centrális területét az elsődleges szaglókéreg és a másodlagos szagló projekciók alkotják. Az elsődleges szaglókéreg a tractus olfactorius laterális projekciós területe, a telencephalon rostralis oldalára lokalizálható, közvetlenül a bulbus olfactorius beékelődésénél. Erre a kortikális areára a felszínesen elhelyezkedő és a tractus olfactorius laterális axonjaival excitatorikus axo-dendritikus szinaptikus kapcsolatban álló idegsejtek rétege, valamint a mélyebben fekvő, nagyobb axonjaival a felszíni idegsejtek dendritjeire kapcsolódó gátló idegsejtek rétege jellemző. Az elsődleges szaglókéregből másodlagos projekciók haladnak a thalamus mediális magvai, a laterális hipothalamikus area, a piriform lebeny entorhinalis areája, az amygdaloid részek s a neocortex felé.

A feltételezett transzmitteranyagok megoszlását a bulbusban régóta vizsgálják. Bizonyítékokat szolgáltatottak elsősorban a GABA és a katekolaminok jelenlétére vonatkozóan a szaglógumó egyes rétegeiben, de vannak adatok a glutaminsav, az aszparaginsav, homocisztein, carnosin mediátor szerepére is /3. kép/.

A nervus olfactorius terminálisainak feltételezett transzmittere a carnosin /Ferriero és Margolis, 1975/. A periglomeruláris sejtek noradrenalin, DOPÁ-t, serotonint vesznek fel /Dahlström és mtsai, 1965; Lichtensteiger, 1966/, az immunítokémiai vizsgálatok pedig a monoaminok szintetizáló enzimeit mutatták ki eme sejttípusban /Halász és mtsai, 1977/. A szemcsesejteknek a mitrális sejteken végződő dendritjei gátló transzmittert -- GABÁ-t -- szabadítanak fel /Felix és McLennan, 1971; Halász és mtsai, 1979/. A mitrális dendritek ingerlik a szemcsesejt dendritjeit,

és ezt a hatást -- a különböző vizsgálatok itt egymásnak némi-
képp ellentmondanak -- acetilkolin /Bloom és mtsai, 1964; Ochi,
1963/ homocistein, asparaginsav és glutaminsav /Felix és McLennan,
1971; Nicoll, 1971/ egyaránt kifejtheti. A mitrális sejtek dend-
ritjeiben acetilkolinészterázt és monoaminoxidázt is kimutattak
/Shanthaveerappa, 1965/. A szemcsesejteken végződő centrális
terminálok lehetnek kolinergek /Bloom és mtsai, 1964/, adrener-
gek /Dahlström és mtsai, 1965/ és serotoninergek /Bloom és mtsai,
1964/. Ujabban a tractus olfactorius laterálisban aszparaginsav-
val mediáló rostokat mutattak ki, amelyek a szemcsesejteken vég-
ződnek /Collins, 1979/.

1.2. A GABA lokalizációja és szerepe a transzmissziós folyamatok- ban

Az emlősök központi idegrendszerében számos olyan anyagot
mutattak ki, amely az idegsejtek közötti ingerület tovaterjedé-
sét közvetítik, vagy azt befolyásolják. Agranoff /1974/ 16 medi-
átor vagy modulátorszerű anyagról ír, amelyek száma azóta is nőtt,
elsősorban a morfin szerű hatással bíró endogén peptidek megisme-
résével. A feltételezett transzmitterek némelyike kis molekula-
súlyú aminosav /glutaminsav, aszparaginsav, γ -aminovajsav /GABA/,
glicin, prolin, stb/, amelyek általánosan előfordulnak a közpon-
ti idegrendszerben, de egyes területeken specifikus szerepük van.
Különösen sok adat szól a GABA és a glicin transzmitter szerepe
mellett. Mindkét aminosav kimutatható szinaptoszómákban.

A GABA szerepéről alkotott elképzelések az elmúlt 25 év so-
rán gyökeresen megváltoztak; az akkori biokémiai kuriózum és
fiziológiai rejtély ma már a gerincesek központi idegrendszeré-

nek és néhány gerinctelen állat központi és környéki idegrendszerének legjobban ismert gátló transzmittere /Roberts és mtsai, 1976/.

Kimutatták a kisagyi csillagsejtek, kosársejtek, Golgi-sejtek szómáiban és terminálisaiban, a retina amakrin és Müller-féle /glia/ sejtjeiben, de jelenlétét leírták a központi idegrendszer más részeiben, így például a hippocampus, a hipothalamusz periventricularis areája, a locus coeruleus, a nucleus caudatus területén /Curtis és Johnston, 1974/, valamint újabban az emlős gerincvelőben /Barber, 1978/, embrionális gerincvelő szövettanában /Farb és mtsai, 1979/ és hipothalamusz szövettanában /Makara és mtsai, 1976/ lokalizálták. A GABA valószínűleg szerepet játszik a bulbus olfactorius transzmissziós folyamataiban is és jelenlétét biokémiai módszerekkel is meghatározták.

A teljes bulbus biokémiai elemzésével /Popov és mtsai, 1967/ majd a rétegek szerinti vizsgálatával /Graham, 1973/ magas GABA tartalmat mutattak ki a bulbus egészében és külső rétegeiben egyaránt. A bulbus rétegeinek frontális metszete a 2. ábrán látható. A legkülső rétegben $2,32 \mu\text{M}$ endogén GABÁ-t mutattak ki /1 g száraz anyagra vonatkoztatva/. A glomeruláris réteg átlagos GABA tartalma $23,8 \mu\text{M/g}$ száraz anyag. A külső rostos rétegben található a legmagasabb endogén GABA koncentráció $43,1 \mu\text{M/g}$ száraz anyag/. A legmélyebb rétegben, a szemcsesejtek rétegében /str. granulosum/ is kimutatták a GABÁ-t. A rétegek GABA-tartalmával párhuzamosan GABÁ-t szintetizáló enzim, a glutaminsav decarboxiláz is azonos aktivitás eloszlást mutat az egyes rétegek

közt, s legnagyobb aktivitást a külső plexiform rétegben találtak /Jaffé és Cuello, 1980/. Közöltek olyan farmakológiai adatokat is, amelyek alapján alapos gyanú merült fel a GABA szerepére a külső rostos réteg reciprok dendro-dendritikus szinapszisaiban /Nicoll, 1970 a,b; Felix és McLennan, 1971/. E vizsgálatok szerint a szemcses sejtek periferikus dendritjei gátolják a mitrális szekunder dendriteket és ezt a gátlást a GABA közvetíti.

Mikroiontoforetikusan erre a területre alkalmazott GABA ugyanúgy hat a mitrális dendritekre, mint az ingerületbe hozott szemcses sejtek, azaz gátlóan. Ez a hatás specifikusan felfüggeszthető bicucullin és picrotoxin adagolásával /McLennan, 1971; Nicoll, 1971/. A GABA inhibitoros hatását és ennek felfüggesztését picrotoxin ill. bicucullin adásával más központi idegrendszeri struktúráknál is észlelték /Curtis és mtsai, 1970; Bisti és mtsai, 1971; Duggan és McLennan, 1971/. Mivel ezek az adatok nagyban valószínűsítették a GABA szerepét a bulbus olfactorius külső rostos rétegének jellegzetes reciprok szinapszisában, célszerűnek látszott kísérletet tenni eloszlása pontosabb meghatározására.

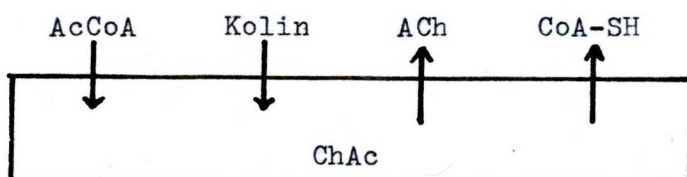
Az exogén, triciált transzmitterek -- kellő koncentrációban alkalmazva -- ugyanoda vevődnek fel és kötődnek meg, ahol az illető endogén anyag helyezkedik el /Iversen és Neal, 1968/, tehát kézenfekvő, hogy az endogén anyag feltérképezése megkísérélhető kívülről bevitt, izotóppal jelzett transzmitter eloszlásának autoradiográfias tanulmányozásával /Hökfelt és Ljungdahl, 1972, 1975/.

1.3. Az acetilkolin rendszer lokalizálása és szerepe a transzmissziós folyamatokban

Emlősökben a szinaptikus transzmisszió legjobban ismert kémiai mediátora az acetilkolin /ACh/, amely a neuromuszkuláris junctionban, az összes autonóm ganglionban, a posztganglionáris paraszimpatikus és néhány szimpatikus neuroeffektor helyen közvetíti az ingerületet a pre- és posztszinaptikus elemek között. Az ACh-nak a perifériás idegrendszer szinaptikus transzmissziójában betöltött mediátor szerepét támasztja alá, hogy idegstimulusra felszabadítható a terminálból, exogén ACh hatására idegimpulzus váltható ki és kolinészteráz bénítókkal, ACh agonistákkal ill. antagonistákkal befolyásolható az ingerület tovaterjedése. Az ACh-nak a központi idegrendszer szinaptikus transzmissziójában betöltött szerepére további bizonyíték, hogy az ACh felszabadulása nagyjából arányos az agy elektromos aktivitásával /Mitchell, 1963/ és, hogy kolinoczeptív sejtek találhatók az agy számos területén.

Az acetilkolin rendszer elemei: a kolin-acetiltranszferáz /ChAc: EC 2.3.1.6/, az acetilkolinészteráz /AChE: EC 3.1.1.7/, az acetilkolin receptor /ACh-R/, a nagy affinitású kolin felvétel, s a nem kolinerg mechanizmusú idegelemeknél magasabb acetilkolin, ill. kolin tartalom.

A ChAc az acetilkolin szintetizáló enzime, a prekursorokból a következő reakción át katalizálja az ACh kialakulását:



A ChAc az idegszövet jól ismert enzime, bár paradox módon nem neuronális szövettípusokból -- humán placenta, cornea epithelium, vörösvérsejt -- sőt baktériumból is kimutatható, ahol szerepét ma még nem tudjuk kielégítően megmagyarázni /Rossier, 1977/. A gerincesek központi idegrendszerének egyes régiói eltérő mennyiségben ill. más aktivitással tartalmazzak ChAc-t. A ChAc heterogén agyi megoszlását először Hebb és Silver /1956/ tapasztalta, amelyet azóta sokan megerősítettek. A nucleus caudatus magas ChAc aktivitást mutat, jelentős a nucleus interpeduncularis és a szaglópálya egyes tagjai, valamint bizonyos amygdala-magvak ChAc tartalma, míg a cerebellum kisebb ChAc aktivitással rendelkezik /Tucek, 1967; Palkovits, 1974/.

Kolinerg idegsejtekben -- amint azt Kása/1970, 1975/ vizsgálatai tanúsítják -- a ChAc az egész neuronban kimutatható: a szómában és a dendritben a riboszómákhoz kapcsoltnak, a vezikulák, tubulusok külső és a sejtmembrán belső felszínéhez kötötten, valamint a citoplazmában szabadon található. A motoneuron axonjában és a terminálisban a filamentáris rendszer, a szinaptikus vezikula külső fala mutat kapcsolatot a ChAc-val, s az axoplazmában itt is megtalálható a szabad enzim /Kása és mtsai, 1970; Kása, 1971/.

A preszinaptikusan felszabadult ACh lebontását az AChE végzi: $ACh + H_2O \rightleftharpoons kolin + ecetsav$. Az enzim specifikus az ACh-ra, más kolinésztereket nem hidrolizálhat. Az AChE csupán egyike a számos kolinészteráznak, amelyek jelen vannak a szövetben. A pszeudokolinészterázok az ACh-t is bontják, biológiai szerepük nem egészen tisztázott. Az acetilkolinészterázok vizsgálatánál ezeket a nem specifikus észterázokat szelektív bénítókkal hatástalanítani kell.

Az AChE aktivitás a kolinerg neuron endoplazmatikus retikulumában a Golgi lamellákban, tubulusokban és néhány vezikulában lokalizálható /Kása és Csillik, 1968; Kása, 1971/, valamint azoknak a kolinoceptív sejteknek a felületén található, amelyeket kolinerg neuronok innerválnak. A ChAc és az AChE enzimek elektronmikroszkópos hisztokémiai lokalizálásának eredményei alapján joggal feltételezhető, hogy az acetilkolin rendszer eme két enzime a kolinerg neuron különböző ultrastrukturális elemeihez rendelhető, transzportjuk a szómából a terminálisok felé is más módon történik /Kása, 1973/. Az AChE-t mind pre- mind poszt-szinaptikusan kimutatták.

A tiokolin-technika segítségével mód nyílt az acetilkolinészteráz hisztokémiai kimutatására /Koelle 1954; Kása és Csillik, 1966/. Az AChE tartalom az agy különböző ariáiban más és más /Shute és Levis, 1963; Levis és Shute, 1967/. Található területek az agyban, ahol az enzim intracitoplazmatikus és a festődés a neuronok testét emeli ki a szürkeállományból /subthalamus, globus pallidum, laterális preoptikus area, diagonális köteg, mediális szeptális mag/; ahol az enzim intraaxonális és a fehérjeállományban a kötegek jól megkülönböztethetők /fimbria, fasciculus retroflexus/; ahol a festődés diszkrét, lemezszerű elhelyezkedésű /gyrus cinguli, hippocampus piramidális rétegének két oldala, stratum lacunosum, gyrus dentatum granuláris rétegének két oldala, a bulbus olfactorius/; ahol az AChE diffúzon festődik / a neocortex legtöbb területe/; ahol a festődés olyan erős, hogy az enzim precíz lokalizálása nehéz /nucleus accumbens, a tractus olfactorius laterális magja; a laterális amygdaloid mag ventrális része/. Szelektív areák lézója,

ill. rostok átvágása után kimutatható, hogy az enzim a sejttest vágás felőli oldalán halmozódik fel, s a levágott rost másik felén teljes hosszában eltűnik. A polaritás így meghatározható. Amikor az ACh molekulák felszabadulnak a kolinerg terminálból és átdiffundálnak a posztoszínaptikus elemre, kölcsönhatásba kerülnek az acetilkolin receptorokkal /AChR/. Az interakció a receptor molekula és a transzmitter közt kooperatív folyamat, ami a receptor alloszterikus karakterének tudható be. Az AChR a kapocs az ACh kötődése és a posztoszínaptikus membrán permeabilitásváltozása között. Ma általánosan elfogadott, hogy az AChR alapműködése egy olyan ligandindukált konformációváltozás, amely hatalmas mértékben megnöveli a komplex ionofor nyitó állapotának a valószínűségét /Anderson és Stevens, 1973; Katz és Miledi, 1975/. Még nem teljesen ismert, hogyan épül fel a receptor, és az sem, hogyan eredményezi a transzmitter kötődése a permeabilitás megnövekedését a posztoszínaptikus membránon.

A vegetatív efferens rendszerben kétféle kolinerg végződést különböztetünk meg. A paraszimpátikus és a kolinerg szimpatikus posztganglionáris rostokat atropin bénítja. Tekintettel arra, hogy a muszkarin ACh-hoz hasonló hatását az atropin szintén gátolja, ebben az esetben az ACh muszkarinszerű hatásáról beszélünk. Nikotin kis adagban ingerli a vegetatív ganglionokat. Ugyanilyen hatást fejt ki az acetilkolin is, amely a preganglionáris végkészülékek természetes mediátora. Ilyen esetben az ACh nikotinszerű hatásáról beszélünk. A központi idegrendszer mindkét kolinerg szinapszistípust tartalmazza /10.kép/. Az acetilkolinnal mediáló szinapszisokra az agonisták mellett az antagonisták a jellemzőek.

A nikotinos AChR esetében az ACh, vagy a nikotin hatását tartósan bénítja az α - bungarotoxin, a hexametonium vagy a dekametonium. A muszkarinos AChR-nál a muszakrin vagy az ACh hatása függeszthető fel atropin, quinuclidinylbenzilát /QNB/, propilbenzilylcholine mustard /PBM/ segítségével. A kétféle receptortípus közti alapvető különbség megmutatkozik abban is, hogy a nikotinosnál cAMP, a muszkarinosnál cGMP a posztzinaptikusan szükséges "második hírvivő" anyag, az elsőre a gyors, rövidebb ideig tartó, a második típusra a lassú, hosszabb ideig elhúzódó hatás a jellemző /Greengard, 1976/.

Az AChR különböző típusaira szelektíven kifejlesztett, izotóppal jelölt antagonisták alkalmazásával meghatározható a muszkarinos receptormolekulákat tartalmazó idegelem biokémiaailag homogenátumból /Yamamura, Kuhar és Snyder, 1974; Pelham és Munsat, 1979; Birdsall, Hulme és Burgen, 1980/ és lokalizálható a receptor a membránfelszínen fénymikroszkópos autoradiográfia segítségével /Kuhar és Yamamura, 1976; Rotter és mtsai, 1979/.

A kolinerg rendszert jellemző markerek egyike a nagy affinitású kolin felvétel jelenléte. Az agyszövet nem tud kolint de novo prekursoraiból szintetizálni /Ansell és Spanner, 1967; Browning és Schulman, 1968/ azért azt az extracelluláris térből veszi fel. Marchbanks /1968/, Diamond és Kennedy /1969/ demonstrálták a kis affinitású kolin felvételt kolinerg neuronokban. Ezen vizsgálatok alapján ez a típusú felvétel nem, vagy csak alig kapcsolt az ACh szintézishez, Na-függése kicsi vagy nincs, fiziológiai szerepe a membrán kolin-tartalmú anyagainak pótlása. A nagy affinitású kolin felvétel Na-függő, szerepe az ACh szintézisben és esetleg

regulálásában van /Yamamura és Snyder, 1973; Guyenet és mtsai, 1973/. A hemicholinium a kis affinitású rendszert $122 \mu\text{M}$, a nagyot $1,1 \mu\text{M}$ K_i értékeknél gátolja /Mulder, Yamamura, Kuhar és Snyder, 1974/. A magas affinitású kolin felvétel növelhető in vitro depolarizáló ágensek alkalmazásával /Murrin és Kuhar, 1976/, s gátolható alkil-biszkvaterner-ammónium vegyületekkel /Holden és mtsai, 1975/. A magas affinitású kolin transzportrendszer specifikusan kapcsolódik a kolinerg idegvégződéshez /Kuhar és mtsai, 1973/, a nagy affinitású rendszer a kolinerg innerváció korai indexének tekinthető a patkányagyban, az alacsony affinitású kolin felvétel nem mutat ilyen specifitást. Vizsgálták a nagy affinitású kolin felvétel ontogenetikus kifejlődését és kapcsolatát az ACh szintézissel /Shelton, Nadler és Cotman, 1979/, valamint az ACh citoplazmatikus szintjének az ilyen típusú kolin felvételre gyakorolt reguláló hatását /Jenden, Jope és Weiler, 1976/. Massarelli és mtsai /1976/ vizsgálatai azt mutatják, hogy termodinamikai szempontokat figyelembe véve a magas affinitású kolin felvétel inkább facilitált, mint aktiv transzport. Szövettenyészetet számos AChE gátlóval inkubálva nem kaptak párhuzamot a kolin felvétel gátlása és az ekto-AChE gátlása közt.

Az AChE és a ChAc együttes lokalizálása jó jellemzője a kolinerg neuronoknak, azonban csak az AChE vizsgálata egymagában nem elegendő ahhoz, hogy eldönthessük: kolinoceptív vagy kolinerg a vizsgált neuron. Az ACh tartalom vizsgálata egymagában elegendő volna az idegszövet kolinerg neuronjainak kiválogatására, ha nem nehezitené a meghatározást az ACh interneuronális kompartmentációja, gyors metabolizálódása, kiürülése a terminálból, s a

kompartmentek eltérő érzékenysége a vizsgálat során alkalmazott anyagokkal szemben. A mérési nehézségek ellenére úgy tűnik, a kolinerg neuronok ACh tartalma összevethető a ChAc tartalmukkal, legalábbis bizonyos agyterületekben, ahol mind az ACh, mind a ChAc tartalom magas, tehát a pre- és posztoszínaptikus elem egyaránt kolinerg /tuberculum olfactorium, habenula, nucleus interpeduncularis/.

A kolinerg idegsejt ACh tartalma szubcelluláris kompartmentekben helyezkedik el. Az agyszövet homogenátum sűrűség gradiens és differenciál centrifugálásával három ACh tárolási formát lehet kimutatni:

- 1./ szabad, a sejtestest citoplazmájában lokalizálható forma,
- 2./ ozmotikusan rezisztens, az AChE által nem hozzáférhető, szinaptikus vezikulákban jelenlévő forma,
- 3./ ozmotikusan labilis, az idegvégződések citoplazmájában megtalálható forma /Whittaker, Michelson és Kirkland, 1964; Whittaker, 1965/.

Az ACh turnoverének radioenzimatikus meghatározásához felhasználták az izotóppal jelzett kolin, AcCoA-t, nézték a keletkező ACh radioaktivitását, tanulmányozták a különböző farmakonok szelektív hatását az agy acetilkolin tartalmára /Hanin és Costa, 1976/. Az ACh metabolizmusát kérgi szövettenyészeteken vizsgálva, a szinaptoszómákon történt vizsgálatok eredményeihez hasonlóan sikerült kimutatni az ACh turnoverét, a kolin felvétellel való kapcsolatát, a hemicholinium gátló hatását és ionfüggéseit /Polak, Molenaar és van Gelder, 1977/.

Az acetilkolinnal mediáló idegrendszeri egységek markerei -- AChE, ChAc, AChR, magas affinitású kolin felvétel, ACh transzmitter anyag -- együttesen jól jellemzik a kolinerg idegsejteket. Azonban ezek közül csak egy marker vizsgálata még nem ad megbízható eredményt a kolinerg idegsejtre vonatkozóan -- talán azt az egy esetet kivéve, amikor az ACh immuncitokémiai lokalizációját lehetne megvalósítani.

1.4. A GABA és az ACh közötti interakció morfológiai alapja

A neurokémiai kutatások egyik legfontosabb elméleti és klinikai feladata, hogy vázolja a különböző transzmitterekkel működő idegsejtek közötti összefüggéseket, kapcsolatokat, így pl. azt, mely kérgi neuronokon szinaptizálnak a substantia nigra dopaminerg neuronjai? Melyek ezek közül a GABAerg, kolinerg vagy peptiderg idegsejtek? Hogyan függenek ezek össze egymással és milyen reguláló hatással rendelkeznek más idegsejtek működésére?

A különböző típusú neuronok egymásközi kölcsönhatásai közül jól ismertek a kolinerg - monoaminerg interakciók a központi idegrendszer számos területén /Butcher, 1978/. Kevésbé ismert azonban a kolinerg-GABAerg kölcsönhatás természete és lokalizációja.

A központi idegrendszer néhány régiójában találunk példát a két transzmitter közti interakcióra. A striatum egyes kolinerg neuronjai regulálhatnak GABAerg neuronokat a striato-nigralis úton /Cheney és Costa, 1978; Ladinsky és mtsai, 1973/, bizonyítékot szolgáltatottak a GABAerg - kolinerg interakció léteire a központi idegrendszerben: diazepam hatására ACh szint növekedés következett be. Ez a jelenség a kolinerg neuronon preszinaptikusan elhelyezkedő GABAerg terminál diazepam hatására bekövetkező gátlásával

magyarázható, vagyis az ACh szint megnövekedését a GABAerg neuron gátló hatásának megszűnése okozza. A neostriatum dopaminnal gátlott ACh transzmitterű interneuronjai a Substantia nigrában végződő GABAerg terminálokra szinaptizálnak, így módon azok inhibitoros jellegét erősíteni tudják /Grooves, Young és Wilson, 1978/.

McGeer és McGeer /1976/ egy dopaminerg-kolinerg-GABAerg feedback regulációjú kört mutatott ki az extrapiramidális rendszerben, ahol az acetilkolinnal működő idegsejtek preszinaptikus elhelyezkedésű a GABAerg neuronhoz viszonyítva.

A GABAerg és kolinerg neuronok közötti interakciónak a bulbus olfactoriusában mind biokémiai, mind morfológiai alapjai megvannak. Vizsgálták a GABA eloszlását a bulbusban /Popov és mtsai, 1967; Graham, 1973 ; Roskosky, Ryan és Diecke, 1974/, autoradiográfiáson lokalizálták /Halász, Ljungdahl és Hökfelt, 1978/, tanulmányozták a bulbus AChE aktivitását /Koelle, 1954; Nandy, 1965; Shanthaveerappa és Bourne, 1965; Sharma, 1968/, ChAc aktivitását /Godfrey és mtsai, 1980; Jaffé és Cuello, 1980/, s mérték az ACh tartalmat a bulbusban és egyes rétegeiben is /Vizi és Palkovits, 1978/. Ezen adatok alapján feltételezhető emekét transzmitterrel mediáló idegrendszeri elemek együttes jelenléte a bulbusban.

A kolinészteráz pozitív centrifugális rostok /Shute és Lewis, 1967/ a tractus olfactorius laterálisban futnak a bulbusba, s a granuláris rétegben, a mitrális sejtek között és a külső plexiform rétegben végződnek. Ezek a rostok preszinaptikusan elhelyezkedve elérhetik a szemcses sejtek majdnem a teljes bulbuson átérő dendritjeit, s szinaptizálhatnak azokon. A bulbus más interneuronjai közül a rövid axonú sejtek jöhetnek számításba a kolinerg-GABAerg

interakció szempontjából, amelyek egyrészt szinapszist alkotnak a szemcses sejtek periferikus dendritjeivel, másrészt a tractus olfactorius laterálisban haladó centrális rostoktól maguk is szabályozottak.

1.5. Intraneuronális anyagtranszport

Ismeretes, hogy a sejttestből, ahol élénk szintetikus tevékenység folyik, anyagok áramlanak folyamatosan a nyúlványok felé: fehérjék, aminosavak, egyéb kismolekulájú anyagok, foszfolipidek, glikolipidek. Az axonális transzport ma már jól ismert /Weiss és Hiscoe, 1948/. Kerkut és mtsai /1965, 1967/ glutamin axoplazmatikus transzportját írták le ideg-izom komplexben, Di Giamberardino /1971/ az aranyhal látóidegében figyelte meg szabad leucin áramlását. Margolis és Lajtha /1968/ a glutaminsav, aszpartát, leucin transzportját és Na^+ függését vizsgálták agyszeletekben. Ochs és mtsai /1967/ arra mutattak rá, hogy csak azok az aminosavak transzportálódnak az axonban, amelyek az idegsejtnak egyébként is saját anyagai. A macska mozgatóneuronjaiban történt vizsgálataik során megállapították, hogy azok az anyagok, amelyek normálisan nem találhatók a sejtben, nem szállítódnak /pl. α -amino isobutyrate vagy a cikloleucin/. Gross és Beidler /1975/ ^3H -Leu szállítását vizsgálták *Lepisosteus osseus* szaglóidegében. A felvett Leu a membránba épülhet, lebomolhat, de újból transzportálódhat anterograd és retrograd irányban egyaránt. Minden egyes túlélési időnél megvizsgálva a ^3H -Leu mennyiségét a szaglóideg mentén, azt kapták, hogy a felvétel helyétől -- a szaglóhámától -- távolodva egyre kevesebb a radioaktív jel. A ^3H -Leu felvételi maximuma után rendre megjelenik még egy csúcs. Ez idővel, a transzport



során távolodik a szaglóhámtól, miközben magassága csökken.

A különböző kezelési időt túlélő állatok esetében kapott görbék egymásra vetítve olyan görbesorozatot kaptak, amelyet az jellemzett, hogy a felvételi maximumok utáni csúcsok exponenciálisan csökkennek, önmaguk ellaposodnak, szétnyúlnak. Droz /1974/ axonáramlást tanulmányozott ^3H -Leu és ^3H -fucose esetében. A vizsgálat során kétféle sebességet kapott: egy gyorsat /280 mm/nap/, ami az axonmembránhoz, szinaptikus membránhoz és a vezikulákhoz szállítja az anyagokat és egy lassút /1,5-10 mm/nap/, ami pedig az axoplazma anyagellátását biztosítja.

A patkányagy egyik noradrenerg rendszerében az axonális transzport öt sebességét sikerült megkülönböztetni /Levin, 1978/. Streit, Knecht és Cuenod, 1979/ a transzmitter specifikus retrográd transzportot bizonyították. Ez az axonális transzport a mediátor anyag -- jelen esetben a jelzett GABA és szerotonin -- aktiv felvételén alapul. Vizsgálatukban a patkány striato-nigralis és raphe-nigralis projekcióit használták modellnek. A ^3H -GABA injekcióra a szubstantia nigra-bana caudato-putamen területén található perikarionok jelölődését eredményezte, míg a jelzett szerotonin alkalmazása a raphe nucleus idegsejtjeinek szómáját tette jelzetté. Mindkét esetben retrográd axonáramlással állunk szemben. A transzportfolyamatokban nagy fontosságot tulajdonítanak a sima endoplazmatikus retikulumnak /Droz és mtsai, 1975/ és a mikrotubularis rendszernek /Kása, 1968; Kiss, 1976/. A fehérjék transzportjában is nagy fontosságúak a különböző sejtkomponensek: az ACh anterograd axoplazmatikus áramlásában elsősorban a vezikulák és neurotubulusok, a ChAc transzportjában az axonfilamentumok és

az axoplazma jelentős /Kása, 1968; Kása, 1971; Kása és mtsai, 1973/.

Az axontranszporthoz hasonlóan dendritekben is kimutatták aminosavak és fehérjék szállítását. Kiss /1976/ jelzett fehérjék és ^3H -Leu orthograd dendritikus transzportjáról számol be, míg Hunt és Künzle /1976, a,b/ aminosavak retrograd dendritikus transzportját írta le galamb tectum opticumában. Az itt vizsgált rétegben a preszinaptikusan elhelyezkedő dendritek közvetlenül és specifikusan akkumulálják a ^3H -GABÁ-t is. A jelölődés megfigyelhető volt az injektált területen kívüleső szövetekben is, ahol azok a sejtek helyezkednek el, amelyek dendritjeinek közelében volt a jelzett anyag. E sejtek csak a retrograd dendritikus transzport útján válhatnak jelzetté. Lynch és mtsai /1975/ tormagyökér peroxidázt injiciálva a hippocampus CA1 régiójában lévő piramis sejtek szómájába, azt tapasztalták, hogy a fehérje a neuron apikális és bazális dendritjeiben egyaránt gyorsan megjelenik, még a szekunder és terciér ágakban is. Ha az enzimet a dendritarborizáció zónájába injektálták, hasonló gyors enzimeeloszlást figyeltek meg, jelezve, hogy a transzport kétirányú a dendritekben is.

Ujabban elterjedt a különböző mitózisgátló növényi alkaloidok alkalmazása a transzportfolyamatok kutatásában. A colchicin és a vinblasztin egyaránt hatásosnak bizonyult az intraneuronális axontranszport gátlására /Hökfelt és Dahlström, 1971/. A colchicin szolgáltatja az axonális fehérjetranszportnak /AChE, ChAc/ a mikrotubuláris rendszerrel való összefüggésére utaló /Kása, 1968; 1973/ további bizonyítékát /Heiwall, Larsson és Dahlström, 1977/. Vannak kísérletek a colchicinnek, mint alkalmas dendrit-

transzport gátlónak a hatásáról is /Schubert és mtsai, 1972/.

Mások ugyanakkor felvetik, hogy a colchicin elsősorban a gyors típusú anterográd transzportot gátolja, míg a lassú típusú és a retrográd transzport kevésbé érzékeny /Hanson és Edström, 1978/.

Ezen irodalmi adatok birtokában további kísérleteket kívántunk végezni, hogy felderítsük a GABAerg-kolinerg interakció elemét a bulbus olfactoriusban.

1.6. Célkitűzések

Ebben a munkában a következő hármas célt kívántuk elérni:

- 1./ a fény- és elektronmikroszkópos autoradiográfia segítségével lokalizálni a GABÁ-t a bulbus olfactorius külső rostos rétegében, megállapítani, hogy van-e intra-neuronális transzportja, s ha igen, milyen sebességgel történik a szállítás,
- 2./ hisztológiai, biokémiai és autoradiográfiás módszerrel feltérképezni a bulbus kolinoceptív és kolinerg elemeit,
- 3./ bizonyítani, hogy a bulbus olfactoriusban lehetséges a kolinerg-GABAerg interakció.

2. Anyag és módszer

2.1. A GABA megoszlásának és transzportjának vizsgálatánál alkalmazott módszerek

2.1.1. Az állatok kezelése, anyagkivétel

A kísérleteket in vivo -- a ventriculus olfactoriusba lassan befecskendezett jelzett anyaggal -- és in vitro -- szövetszeleteket inkubálva végeztük.

Az in vivo vizsgálatoknál sztereotaxiás készülékben rögzített, Nembutallal altatott 180-250 g-os patkányok ventriculus olfactoriusába 3-5 μ l 8-40 μ Ci teljes aktivitású és 10,3 Ci/mM spec. aktivitású ^3H -GABÁ-t /New England Nuclear/ fecskendeztünk be 5, vagy 10 μ l-es Hamilton fecskendővel tíz perc alatt. Az állatok egy részét a GABA adása előtt egy órával i.p. aminooxiacetsavval /AOAA/ kezeltük, hogy a GABA gyors lebomlását megakadályozzuk /Wallach, 1961/. Fél órával a GABA beadása után az állatokat Karnovsky-oldattal /glutáraldehides és paraformaldehides fixáló: 2,5% és 4%/ perfundáltuk /Karnovsky, 1965/, majd a bulbusból pengével vékony szeleteket vágunk, amelyeket OsO_4 -ban rögzítettünk és aralditba /Fluka/ ágyasztuk /Luft, 1961/.

Az in vitro kísérleteknél friss, rögzítetlen bulbusokból + 4-8°C körüli Tyrode-oldatban szövetszeletelővel /McIlvain Tissue Chopper/ 0,3-0,5 mm vastag szeleteket készítettünk és 35 percig 25 μ Ci/ml végaktivitású ^3H -GABÁ-ban inkubáltuk. Az esetek egy részében előzőleg 15 percig AOAA-val is inkubáltuk a szeleteket. A rögzítés és beágyazás az előbbiekhöz hasonló módon történt.

2.1.2. Fény- és elektronmikroszkópiás technika

Piramitokkal 2, 4 és 6 μ -os metszeteket készítettünk, amelyeket Ilford K2 vagy L4 /Ilford, Essex/ emulzióval fedtük le a "dipping" technikának megfelelő folyékony emulziós módszerrel /Rogers, 1973/. Az eredeti géles emulzióból kiemelt mennyiségeket sötétszobában + 45°C-os vízfürdőben felolvasztottuk és hozzá azonos térfogatú desztilláltvizet, valamint 2%-nyi glicerint adva, összekevertük. A hígított emulzióban megmártott tárgylemezeket szobahőmérsékleten megszárítottuk és szilikagéllal ellátott, jól záródó fémdobozba helyeztük, amelyeket + 4°C-on tároltunk. Az exponált készítményeket 2-90 nap után Kodak D-19 B jelű hívóval hívtuk elő /Rogers, 1973/.

Azokból a blokkokból, amelyekben a fénymikroszkópos autoradiográfia tanulsága szerint a jelzett anyagot egyes idegelemek szelektíven vették fel, Reichert ultramikrotommal kb. 600-800 Å vastag szeleteket készítettünk, amit dróthurok segítségével celloidines tárgylemezre tettünk, majd uranilacetátos és ólomcitrátos kontrasztosítás után szénhártyával fedtünk le, hogy a kemográfiát megakadályozzuk /Rogers, 1973/. Ezután Ilford L4 emulzióval monolayer-t vittünk fel a preparatumra. 7-60 napos expozíciók után amidollal /Lettre és Paweletz, 1966/ phenidonnal vagy Agfa Gevaert /Kopriwa, 1975/ hívóval előhívtuk az autoradiogramokat. Esetenként - a magasabb specifikus szemcseszám elérése érdekében -- előhívás előtti AuCl₃-os kezelést alkalmaztunk /"golden latensification", Kopriwa, 1975/. A metszeteket leúszattuk és rézrostélyra felvéve elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

2.1.3. A GABA intraneuronális transzportjának vizsgálata, colchicin hatása a transzport sebességére

A GABA feltételezett dendritikus transzportjára vonatkozó vizsgálataink során 56 db azonos nagytású /X18760/ elektronmikroszkópos képen kijelöltük a szemcses sejteket, azok periférikus nyúlványait és végződéseit. Megmértük a területüket, megszámoltuk a felettük található ezüstszemcséket, majd kiszámoltuk az azonos típusú idegelemek területére eső szemcseszámot, táblázatosan és grafikusan ábrázoltuk. Akkor, ha az ezüstszemcse sejtmembrán felett helyezkedett el, tehát hovatartozását biztonsággal eldönteni nem tudtuk, felerészben az egyik, felerészben a másik idegelemhez számoltuk.

A szemcsék lokalizálásának biztonságosabb eldöntése céljából a statisztikai elemzés alá vontradiogramoknál minden esetben phenidon hívóval dolgoztunk. A transzportfolyamat sebességének kiszámításánál azt a távolságot amelyen át a GABA szállítódik, a külső rostos réteg közepétől a szemcses sejtek rétegének közepéig vettük. Ez 300-320 μ volt.

A vizsgálatok későbbi stádiumában megpróbálkoztunk különböző kezelési időt túlélő állatok transzportjának colchicines gátlásával. A patkányok egyik csoportjának /5 db 180-250 g-os him/ ventriculus olfactoriusába a GABA adása előtt 44 órával 10 μ l 10%-os etanolban oldott colchicint fecskendeztünk be /Hökfelt és mtsai, 1978/. Kontrollként öt másik hasonló súlyú him patkány csak GABÁ-t kapott, illetve egynek a GABA adása előtt, az előző csoportokéval azonos körülmények közt 10%-os etanolt adtunk, hogy az alkoholnak a transzportfolyamatokra gyakorolt esetleges hatását megfigyelhessük, s ezzel pontosíthassuk a colchicin alkalmazása során kapott adatainkat.

2.2. A kolinerg rendszer vizsgálatánál alkalmazott módszerek

2.2.1. Bulbectomy

A bulbectomiát az elsődleges vagy főbulbus /"main bulb"/ és a tractus olfactorius határán végeztük Nembutallal altatott 180-250 g-os állatok. jobb oldali bulbus olfactoriusán vizuális kontroll mellett. A bulbectómia segítségével próbáltuk tisztázni a bulbusba menő ill. onnan esetlegesen eredő kolinészteráz tartalmú rostok, a bulbusban levő kolinészteráz-pozitív neuronok elhelyezkedését és nyúlványaik lefutását, hisztokémiai és biokémiai vizsgálatokkal meghatároztuk az AChE és ChAc aktivitásának változását normál patkányokhoz viszonyítva.

A tractus olfactorius laterális léziójával, másrészt lokalizálni tudtuk szelektív degenerációs festést alkalmazva azokat a területeket, amelyekben a tractus rostjai végződnek, illetve meghatározhattuk az átmetszés előtt, a prepyriform kéreg felé eső területen a rostok lefutását. A bulbectómiát szenvedett állatok bulbusát a műtét utáni hetedik napon távolítottuk el.

2.2.2. Degenerációs vizsgálatok

A degenerációs vizsgálatokat bulbectomizált patkányokon végeztük, szelektív ezüstimpregnációt alkalmazva /Nauta és Gyax, 1954/, esetenként Yamadori /1977/ egyszerűsített módszere szerint. /A leggyakrabban alkalmazott Nauta-Gyax módszer a degenerált axonok és végződéseik szelektív ezüst impregnációján alapszik/. A bulbectómiát hét nappal túlélő patkányok agyát 10%-os neutrális formalinban tartottuk legalább egy hónapig, mielőtt felhasználtuk

volna. A bulbusokból 15-25 μ -os fagyasztott metszeteket készítettünk, amelyeket 15%-os etanolban fél óráig áztattunk. Rövid desztillált vizes mosás után 30 perc 0,5%-os foszfomolibdénsavas mosás következett, majd közvetlenül 0,05% KMnO_4 -os oldatba tettük a metszeteket, ahol 6 percig tartottuk azokat. Mosás után 1%-os hidrokinon és 1%-os oxálsav 1:1 oldatában elszíntelenedésig mostuk /1-2 perc/, majd 3x váltott deszt. vizes mosás után 25 percre 1,5%-os AgNO_3 -os oldatba tettük a metszeteket / AgNO_3 : 0,9 g; deszt. viz : 20,0 ml; etanol: 10,0 ml; erős NH_3 : 1,8 ml; 2,5% NaOH : 1,5 ml/. Ezután átvittük a szeleteket a redukáló folyadékba, s ott a barnás szín eléréséig áztattuk az agyszeleteket /deszt. viz : 400 ml; etanol: 45 ml; 10%-os formalin: 13,5 ml; 1% citromsav : 13,5 ml/. Ha a festődés túl világos volt, kevés NaOH -ot adtunk az AgNO_3 -os oldathoz; ha sötétnek találtuk, ammóniát. Rövid mosás után 1%-os $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -os oldattal fixáltuk, majd ismét mostuk a szövetszeleteket és Albrecht /1954/ zselatinos beágyazási módszerével tárgylemezre vittük az anyagot.

2.2.3. Az AChE hisztokémiai lokalizálása

A hisztokémiai vizsgálatok alkalmával az AChE-t Koelle és Friedenwald /1949/ eredeti acetilkolininos /AThJ/ módszerének Gerebtzoff /1959/ és Kása, Csillik /1966/ által eszközölt módosításai alapján mutattuk ki /ólom-réz-thiocholin technika/. A frissen kiszedett bulbusokat egy éjszakán át fixáltuk 8-10%-os formaldehidben. Ezután a szövetből 25-30 μm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk, amelyeket desztillált vízben mostunk, majd 20 percig preinkubáltunk 2×10^{-4} M-os etopropazinban, hogy a

nem specifikus kolinészterázokat gátoljuk /Lewis, 1961/. Az innen kivett metszeteket 60-90 percig inkubáltuk a következő összetételű oldatban: AThJ /Fluka/: 21 mg; 0,1 M Na-acetát : 6,6 ml; 3,8% Gly : 0,3 ml; 0,1 M CuSO_4 : 0,3 ml; 0,1 M Pb/NO_3 / : 0,3 ml. Ezt követte egy pár perces mosás, majd a metszeteket Na_2S -ban előhívtuk. Desztillált vizes mosás, tárgyelmezre vétel, szárítás és dehidráálás következett, majd a metszeteket kanadabalzsammal lefedtük.

2.2.4. Az AChE spektrofotometriás meghatározása

Az AChE-nak bulbectomizált és normál bulbus homogenátumból történő biokémiai meghatározását Ellman és mtsai /1961/ által kidolgozott spektrofotometriás eljárással végeztük. Az enzim az AThJ-t hidrolizálva tiokolint szabadít fel, ami dithiobisnitrobenzolsavval /DTNB, Sigma/ reagálva sárga terméket eredményez. A mérés 412 nm-nél 1 cm-es küvettában Pye Unicam spektrofotométeren történt. A megméréendő homogenátum változó mennyiségét /rendszerint 20 vagy 50 μl -t/ 2,8 ml 0,1 M-os foszfátpufferba /pH: 8/ tettük, amelyhez 0,1 ml DTNB-oldatot mértünk /10 ml 0,1 N-foszfátpufferbe /pH: 7/ 39,6 mg DTNB és 15 mg NaHCO_3 kell/.

Az AChE spektrofotometriás, a ChAc radioenzimatikus meghatározásánál és a kolin felvételnél az adatokat mg fehérjére átszámítva adtuk meg. A fehérjemeghatározást Lowry /1951/ szerint végeztük.

2.2.5. A ChAc radioenzimatikus meghatározása

A ChAc aktivitásának meghatározásához rendelkezésre álló több módszer közül Fonnum /1969/ módszerét használtuk, ami azon alapul, hogy az enzim a jelzett AcCoA-ból és hideg kolinból acetilcsoportján jelzett ACh-t szintetizál.

A ChAc-t mind normál, mind bulbectomizált szövetekből meghatároztuk. A mérést mikrokémcsövekben, párhuzamos mintákkal dolgozva és blankot alkalmazva végeztük. Az inkubáló elegy /3 μ l 500 mM Na-foszfátpuffer /pH: 7,4/ 3 μ l 2 M EDTA /pH: 7,4/, 3 μ l 3 M NaCl, 3 μ l 80 mM kolin Cl /Reanal/ 2 μ l H₂O, 3 μ l ¹⁴C-AcCoA /106 mCi/mM spec. aktivitású/ 20 μ l-éhez 10-20 μ l homogenátumot tettünk, 37°C-on 15 percig inkubáltuk, majd a reakciót jégfürdőbe téve leállítottuk. A mikrokémcsövek tartalmát 5 ml 10 mM Na-foszfátpuffer 2 ml acetonitrilben oldott Na-tetrafenil-borát /Merck/ és 5 ml toluol összetételű oldatba vittük át, majd alapos rázás után folyadékszintillátorban megmértük az aktivitását.

2.2.6. Az ACh és a kolin radioenzimatikus meghatározása

A bulbus ACh és kolin tartalmának meghatározását 80-100 g-os mindkét nemű patkányokon végeztük. A mérés során mikrohullámú agy-roncsolással /Metabostat, Gerling Moore/ előztük meg az agyszövet ACh és kolin tartalmának metabolizálódását /Stavinoha és mtsai, 1970/. A bulbus várhatóan nem magas ACh és kolin tartalma miatt a meghatározáshoz 3-5, Metabostattal leölt patkány bulbusait használtuk fel egy mérés során. A radioenzimatikus vizsgálat laboratóriumunkban Eckernas és Aquilonius /1977/ módszerének kis változtatásával történt /Szepesy és mtsai, 1979/.

1 M hangyasav és aceton 15:85 arányú keverékében homogenizáltunk. Egy óra állás után 3000 g-vel tíz percig centrifugáltuk az anyagot, a szupernatanst félretettük, a pelletet 2 ml homogenáló oldattal szuszpendáltuk, s ismét centrifugáltuk. Az egyesített szupernatanst 2x5 ml heptanon-kloroformban kiráztuk, s a felső

acetonos fázist leszedtük, az alsó vizes fázist szén-savhóval fagyasztottuk és liofilizáltuk. Ezután 200 μ l 300 mM-os Na-foszfát-pufferban feloldottuk az anyagot, s ebből a meghatározáshoz 10-10 μ l-t vettünk ki.

A kolin meghatározásnál a 10 μ l-hez 10 μ l inkubáló oldatot adtunk, aminek az összetétele a következő: 250 mM Na-foszfát-puffer, 0,25 mM EDTA 0,8 M eserín, 10 μ l ChAc /0,03 μ M/mg fehérje/ és 5 μ l 14 C-AcCoA /54 mCi/mM/.

Az összkolin meghatározásánál 10 μ l mintához 5 μ l észterázt adtunk /Sigma, VI. type/, majd ugyanazt a reakcióelegyet mértük hozzá, mint fent. 60 perc inkubálás után /37°C-on/ a reakciót leállítottuk 1 M hangyasav 30 μ l-ével, s a mikrokémcső tartalmát szcintillációs küvetába tettük, ami 5 ml 10 mM-os Na-foszfát-puffert /pH: 4/, 12 ml Fonnum-koktél /10 ml toluol, 2 ml acetonitril, 0,015 g dimetil-POPOP /Calbiochem/ 0,06 g PPO /Reanal/ 0,01 g Na-tetrafenil-borát /Merck// tartalmazott. Alapos rázás és 12 órai állás után Packard Tri Carb folyadék szcintillátorban mértük.

2.2.7. A magas affinitású kolin felvételének kimutatása biokémiai és autoradiográfiás módszerrel

A magas affinitású kolin felvétel biokémiai kimutatásához a bulbus homogenátum 20x hígítású durva szinaptoszóma /P₂ frakció/ preparátumát használtuk fel. A 0,33 M-os szukrózban vagy magas /60 mM/ K⁺ tartalmú Krebs-Henseleit pufferben homogenizált bulbusokat 1000 g-vel 10 percig, majd a szupernatanst 17000 g-vel 15 percig centrifugáltuk, s a pelletet 0,33 M-os szukrózzal szuszpendáltuk. 1-1 ml 0,5 μ M 3 H-kolint tartalmazó normál és Na⁺ mentes Krebs-Henseleit oldathoz szukrózos vagy a magas K⁺ tartalmú pufferrel preinkubált ho-

mogenátumból 100 μ l-t tettünk, s négy percig 37°C -on incubatorban /Polaron, Watford/ inkubáltuk.

Ezután a szuszpenziót membráuszűrőn /Gelman GA-6 0,45 μ m vagy Synpor 0,40 μ m pórusméretű/ átszűrtük és 3 ml, az inkubáló oldattal megegyező, izotópot nem tartalmazó Krebs-Henseleit pufferrel mostuk. A filter 10 ml Unisolve /Koch Light/ vagy 10 ml-nyi /1000 ml-ben 0,3 g POPOP, 7 g PPO és 100 g naftalint tartalmazó/ dioxános szcintillációs koktélba tettük, alaposan felráztuk, s 12 óra után cpm-et mérünk.

A kolin felvétel autoradiográfiás vizsgálata során 4-14 napos patkány embriók bulbusának 4-7 napos szövettenyészetét használtuk fel. A bulbusokat a steril körülmények betartása mellett Laminar Flow /Liberty Industries/ alatt vettük ki, 48 μ -os filteren át mechanikusan dezintegráltuk, s kollagénezett falkonplasztikra tettük, amiben 5 ml MEM Eagle's salts volt /GIBCO/. A tenyészetek sejtszáma Laborscale-on /Medicor/ mérve 5×10^6 volt. A szövettenyészetet Heraeus CO_2 termosztátban 5% CO_2 és 95% O_2 tartalom mellett 37°C -on 4-7 napig tenyésztettük.

A tenyészeteket a magas affinitású kolin felvétel vizsgálatához előkészítettük: a kolint is tartalmazó tápoldatot 2x váltott pufferrel kimostuk, majd magas K^+ tartalmú /60 mM/ Krebs-Henseleit oldattal preinkubáltuk a tenyészetet öt percen át. Ezután 0,5 - 1 μM ^3H -kolint tartalmazó /6,3 Ci/mM spec. akt./ normál pufferrel négy percen át inkubáltunk. A tenyészetet mostuk és 5 ml-nyi 2% Reinecke sós fiziológias sóoldattal 20 percig kezeltük, hogy a felvett vízoldékony kolinnak megakadályozzuk a sejttől történő kiáramlását /Kapfhammer és Bischoff, 1930/. Ezután mostuk a tenyészetet 3x és

kiszáritottuk. Ilford L4 fotoemulzióból desztvizet 1:1 higitást készítettünk, amit detergenssel stabilizáltunk, s a loop-technikának megfelelő módszerrel /Nagata és Nawa, 1966/ lefedtük a tenyészeteket. 7-20 napos expozíciók után Kodak D-19 B jelű hívóval előhívtuk és fixáltuk, majd toluidinkékes festés után fénymikroszkópban vizsgáltuk az autoradiogramokat.

2.2.8. Az AChR biokémiai és autoradiográfiás kimutatása

Az AChR biokémiai vizsgálatánál a korábban leírt durva szinaptoszomális /P₂/ frakciót használtuk fel. A mérés során a muszkari-nos AChR antagonistá, a reverzibilis kötődésű ³H-QNB receptorhoz történő kapcsolódását tanulmányoztuk scopolamin /10⁻⁸M/ jelenlétében és hiányában. A specifikus QNB kötődést úgy határozhatjuk meg, hogy a scopolamin nélküli kísérlet eredményéből levonjuk azt az értéket, amelyet a 10⁻⁸M scopolamint tartalmazó kísérlet adott. Ennek megfelelően a kísérleti rendszert a következő módon állítottuk össze. Az egyik mintában 50 µl homogenátum, 50 µl 2.10⁻⁷M scopolamin és 100 µl 10 nM-os ³H-QNB volt /a végkoncentrációk az oldatban 10⁻⁸M scopolamin ill. 5 nM ³H-QNB/. A másik minta 50 µl homogenátot, 50 µl pH: 7,4-es puffert és 100 µl 10 nM-os ³H-QNB-t tartalmazott. Egy órai inkubálás után a 200 µl-t membránszűrőn le-szűrtük /Gilson 0,45 µm vagy Synpor 0,40 µm/, 3 ml pufferrel átmos-tuk a szűrőn fennmaradt anyagot, majd a filtert 10 ml Unisolve-ba vagy a fent leírt szcintillációs koktélba tettük; alapos rázás és 12 órai állás után a cpm-eket folyadékszcintillációs készüléken megmértük.

Az AChR-ok jelzett QNB-vel történő kimutatása autoradiográfiásan szövettenyészeteken és kriosztát metszeteken történt. A tenyésztést a kolin felvétel vizsgálatánál leírt módon végeztük.

A 4-7 napos, tápoldattól lemosott szövettenyészetekre 5 ml 5 μ M-os ^3H -QNB-t tettünk, s 20 percen át 37°C -on CO_2 termosztátban /5% CO_2 , 95% O_2 / inkubáltunk. Egy perces pufferes kimosás után a tenyészeteket szárítottuk, s a loop-módszerrel 1:1 hígítású fotoemulzióval lefedtük. 14-30 napos expozíciók után Kodak D 19 B hívóval előhívtuk, fixáltuk és fénymikroszkópban vizsgáltuk az autoradiogramokat.

A kriosztáttal metszett, ^3H -QNB-vel jelölt szövetszeletek autoradiográfiás vizsgálatával többféle módon is megpróbálkoztunk. Young és Kuhar /1979/ által leírt módszer szerint a krómaluminiomos tárgylemezre felvett metszeteket 5 nM-os ^3H -QNB-vel ill. egy részüknél előtte 10^{-8} M-os scopolaminnal vagy 10^{-5} M-os atropinnal kezeltük. A mosott, szárított lemezekre ezután sötétben emulzióval fedett fedőlemezeket tettünk, egyik végüknél a tárgylemezhez ragasztva, s csiptetővel a metszetre szorítva azokat. Az előhívásnál /14-30 nap után/ a tárgy- és fedőlemez közé kis éket tettünk, hogy a hívó /Kodak D 19B/ akadálytalanul elérje az emulziót.

Gerlach és McEven /1972/ módszerének alkalmazása során a patkány liquorterében vagy a farokvénán át, testébe juttatott izotóp /50 ill. 150 mM, a higulás figyelembevételével /agyban történő eloszlása után -- 60 perc -- a bulbusokat gyorsan kivettük, fagyasztottuk és kriosztáton 15-20 μm vastag szeletekre vágtuk. Az esetek egy részében a ^3H -QNB adása előtt 5 mg/kg állat mennyiségű atropinnal kezeltük a patkányokat, hogy a specifikus receptorkötést vizs-

gálhassuk.

Az említett módszer szerint a kriosztát metszeteket sötétben, emulzióval előre lefedett tárgylemezekre szedtük fel úgy, hogy a hideg késen levő szövetszeletekhez nyomtuk a melegebb tárgylemezt; akkor a lemezre olvadt a metszet. Sötétben, szilikagélt tartalmazó, jól záródó dobozokban + 4°C-on 14-30 napig exponáltuk a preparatumokat, majd Kodak D 19B hívóval előhívtuk és 20% Na-tioszulfáttal fixáltuk azokat. Toluidinkékkel aláfestve fénymikroszkópban vizsgáltuk az autordiogrammekat.

3. Eredmények

3.1. A GABA neuronális lokalizációja a bulbus olfactoriusban

Az in vitro kísérleteknél a GABA-val történt inkubálás során a bulbusból készült szeleteknek csak a felszínén és pár μ -os mélységig találtunk a szövetdarab felszínétől távolodva rohamosan csökkenő számú, s még eléggé intenzív radioaktív jelet, ami azonban diffúz volt; az egyes idegelemek nem szelektíven vették fel a GABÁ-t. A mikroinjekciók formájában a ventriculuson át bejuttatott GABA sokkal egyenletesebben oszlott el és a szűrés helyétől több száz μ -os távolságban is észlelhető volt. Ezért valamennyi, a GABA megoszlására vonatkozó megállapításunkat kizárólag az in vivo kísérletek eredményeiből vezetjük le.

Az in vivo vizsgálatok során először fénymikroszkópos autordiográfiás képen tájékozódunk, s ez azt mutatja, hogy a külső rostos rétegben sok a jelzett szöveti elem. A mélyebb rétegekben jelzett sejtesteket alig figyelhettük meg /ll. kép/. A mitrális sejtek rétege és a szemcses sejtek egymás mellett elhelyezkedő szómáinak sora világosan kirajzolódik, mutatva, hogy ezen idegelemek nem vették fel a jelzett GABÁ-t.

Szinapszisok, amelyekben az acetilkolin transzmitter szerepet játszik

A szinapszis helye	A hatás jellege	Gátló anyag
Paraszimpatikus végkészülék	muszkarinszerű	atropin, szkopolamin
Vegetatív ganglion	nikotinszerű	hexametonium, kuráre
Neuromuszkuláris junkció	nikotinszerű	kuráre
Központi idegrendszer kolinerg szinapszisa	a) muszkarin-szerű b) nikotinszerű	atropin mekamilamin

10. kép: A kolinerg szinapszisok típusai



11. kép: Fénymikroszkópos autoradiográfiás felvétel triciált GABÁ-val kezelt bulbusból. Expozíciós idő: 28 nap. A rétegek jelölése: GR: str. granulosum; M: str. mitrale; PLEX.EXT.: str. plexiforme externum; GLOM: str. glomerulosum. x 300

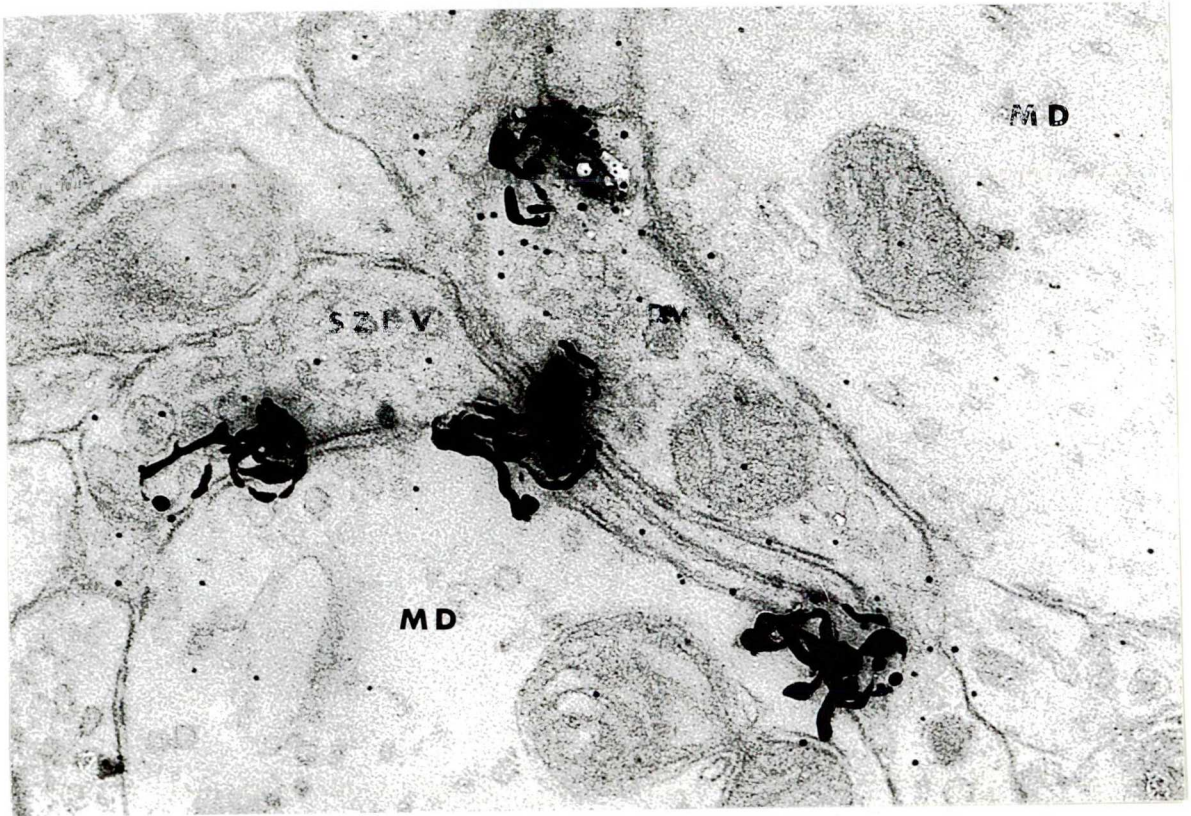


Ha elektronmikroszkóp alatt a külső rostos réteg jellegzetes reciprok szinapszisa, a szekunder mitrális dendritvégződés és szemcsesejtek dendritjei végződéseinek jelzettségét tanulmányozzuk, szembetűnik, hogy a mitrális sejtek dendritjei a triciált GABÁ-t alig vették fel, míg a szemcsesejtek dendritvégződéseire felett nagyarányú ezüstkiválás mutatkozik, jeléül az intenzív GABA felvételnek /12. kép/. Az elektronmikroszkópos képen a mitrális sejtek dendritjei nagyobbak, citoplazmájuk világosabb, kevesebb bennük a vezikula és rendszeresen megfigyelhetjük a mikrotubuláris rendszer tagjait. A szemcsesejtek dendritvégződése kisebbek, citoplazmájuk sötétebb, vezikulájuk is több van /12. kép/.

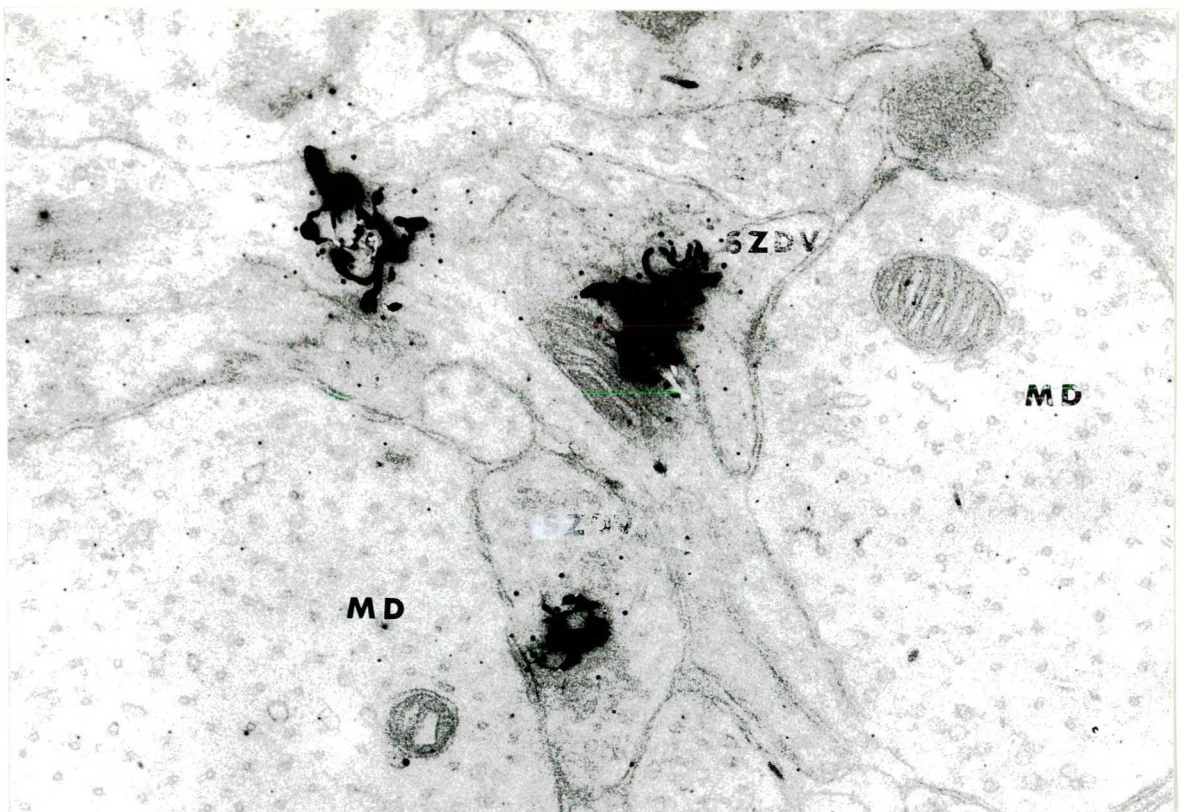
A 13. képen is hasonló a helyzet: a szemcsesejt dendritvégződése egységnyi területén jóval több ezüstszemcsét tartalmaz, mint a mitrális dendrité. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a feltételezést, hogy eme szinapszisban a gátló elemek, vagyis a szemcsesejt dendritvégződése GABÁ-val működhetnek. Ez a GABA intraneuronális lokalizációjával kapcsolatos megállapításunk.

3.2. A GABA intraneuronális transzportja

A vizsgálatok tanulsága szerint a GABA koncentrációja -- amit egyértelműen jelez az autogrammon levő ezüstszemcsék száma -- a ventriculustól a bulbus külső felszíne, a n. olfactorius felé csökken; ez a megoszlás megfelel a GABA diffúzió irányának. Ugyanakkor, ha csak a szemcsesejteket tekintjük, a ventriculusba való injektálás helyétől legtávolabb eső, a külső rostos rétegben lévő végződéseik mutatják a legmagasabb GABA akkumulációt: $6,2/10 \mu^2$; a szemcsesejt dendritek $10 \mu^2$ -jára pedig 1,7 db ezüstszemcse jut átlagosan /14. kép/.



12. kép: Részlet a külső rostos rétegből: reciprok dendrodendritikus szinaptikus kapcsolat a mitrális dendrit /MD/ és a szemcsesejt dendritvégződés közt /SzdV/. Amidollal előhívott autoradiogramm. x 66700



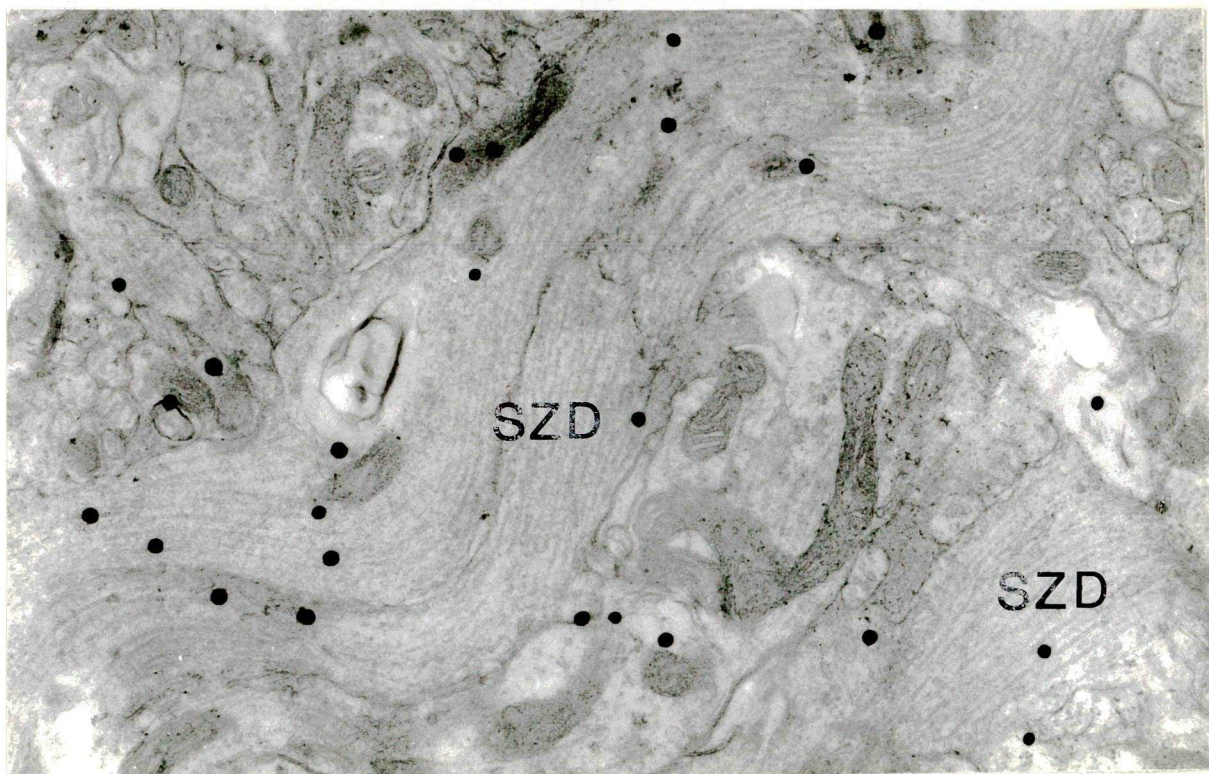
13. kép: Reciprok szinapszis a külső rostos rétegből. Jelölések, mint a 12. képen. Amidollal előhívott metszet. x 38500

A belső rostos rétegben -- amit a mitrális sejtek rétege és a felszínes szemcsesejtek sora közt találunk -- a dendritekre 3, a szemcsesejtek rétegében levőkére 4,1 db ezüstszemcse esik /15.kép/. A szemcsesejtek rétegének zónájában elhelyezkedő szemcsesejteket két mélységben vizsgáltuk meg, amit a réteg tetemes vastagsága indokolt. Ezekben $10 \mu^2$ -on 1,5 illetve a ventriculushoz közelebb eső szómák 1,4 db ezüstszemcse található /15. kép/. A szemcsesejtekről készült elektronmikroszkópos felvételen látható az erre az idegsejttípusra jellemző nagy mag és szemcsézett endoplazmatikus retikulumban szegényes, vékony citoplazma.

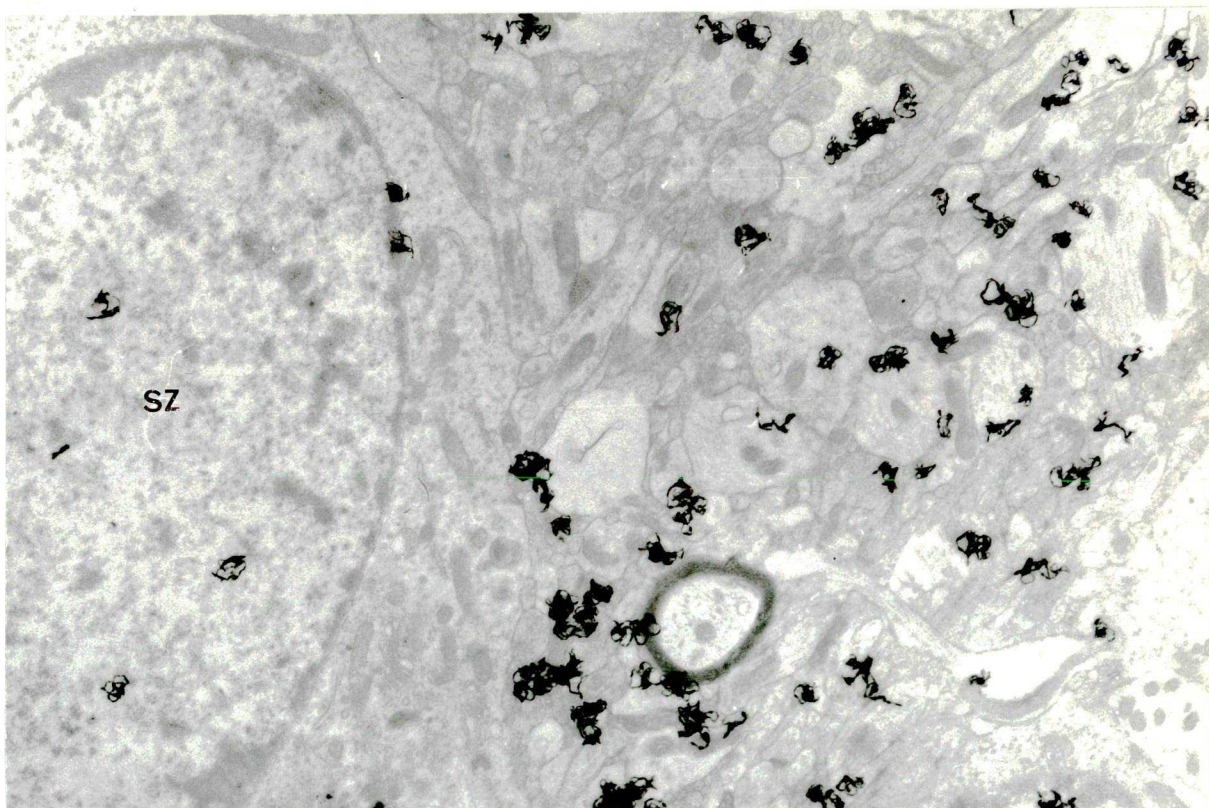
A GABA intraneuronális transzportjával foglalkozó vizsgálataink eredménye után táblázatosan adjuk meg az egyes idegelemek felett talált szemcseeloszlást /16. kép/.

A GABA transzportsajátságait a 16/a képen foglaltuk össze. A képen két szemcsesejt látható sematikusan, leolvasható a rétegek vastagsága is. A grafikonon az egyes idegelemek területére eső szemcseszámot ábrázoltuk a mennyiségi analízishez lefényképezett területek egymástól való távolsága függvényében. A pontsor a GABA tartalom növekedését mutatja a belső rostos és a szemcsesejtek rétegében levő dendritekben. Látható, hogy az injektált területtől legtávolabb van a legtöbb GABA és a ventriculushoz közeledve egyre kevesebb.

Az exogén GABA tehát a ventriculusba való injektálás helyétől távol dúsul fel. Ezt a diffúzióval ellentétes irányú koncentrációkülönbséget, valamilyen aktív mechanizmusnak kellett létrehoznia. Ugy gondoljuk tehát, hogy a szemcsesejtek dendrittörzsének és sejtestének jelölődését a dendritvégződés GABA felvétele és retrográd dendritikus transzportja okozhatja. Ez a GABA intraneuronális



14. kép: Elektronmikroszkópos részlet a belső rostos rétegből, a képen szemcsedendriteket /SZD/ látunk hosszszetben. Phenidollal előhívott autoradiogramm. x 18200

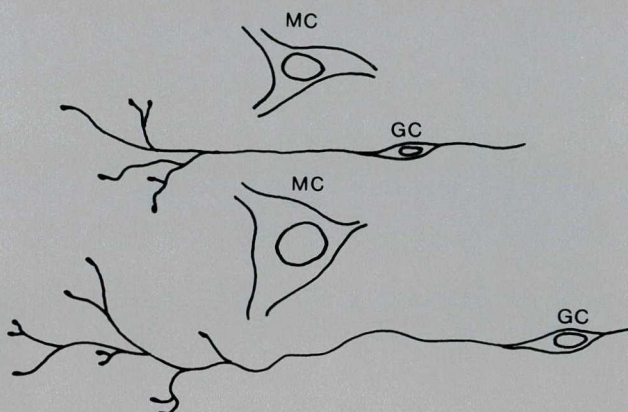
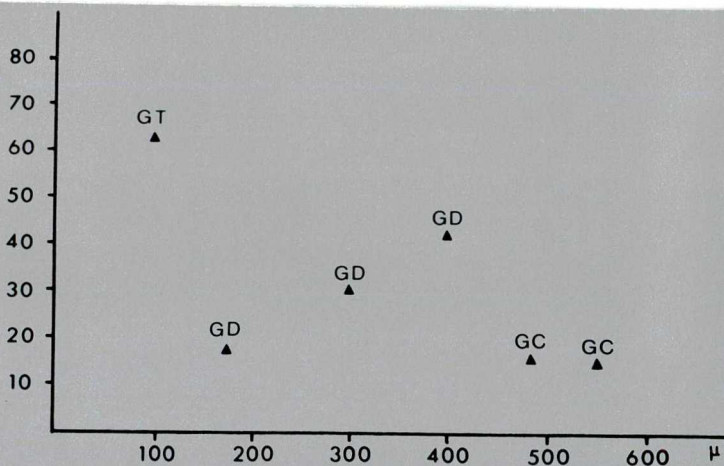


15. kép: Szemcses sejtek /Sz/ elektronmikroszkópos autoradiográfiás képe. Amidollal előhívott metszet. x 12100

Összefoglaló táblázat a szemcsesejtek teste, periférikus dendritjei és ezek végződéseit felett talált ezüstszemcsék megoszlásáról

Vizsgált réteg		Vizsg. ter./ μ^2	Ag - szám	Ag/T	Ag/ $10 \mu^2$	Szórás
str. plexif. ext.	SzDV	93.1	55	5.9	6.2	5.5
	SzD	190.9	34	1.8	1.7	1.6
str. plex. internum		240.7	73	3.0	3.0	1.5
str.	SzD	81.9	27	3.3	4.1	3.4
granu- felsz.		1003.4	151	1.5	1.5	1.3
losum mély		423.4	62	1.5	1.4	0.8

16. kép: Egyes idegelemek felett talált szemcseloszlás



16/a kép: Az ezüstszemcsék sűrűségének ábrázolása a szemcsesejt dendritvégződéseitől a sejttestig.

Ordináta: területegységre eső ezüstszemcseszám, abszcissza: a mintavétel távolsága a glomeruláris rétegtől.

GT: szemcsesejt terminál;

GD: szemcsesejt dendrit;

GC: szemcsesejt;

MC: mitrális sejt



transzportjával kapcsolatos megállapításunk. Megfelelően hosszú túlélési idő után elképzelhető -- amikorra az idegvégződéseken felvett GABA eljut a szómáig -- hogy az egész neuron egyenletesen jelzetté válik és a GABA az anyagcserefolyamatokban felhasználódik.

A transzportfolyamat sebességére 14,4 - 15,3 mm/nap értéket kaptunk. Számszerűleg ez Droz /1974/ lassú axonális transzportjával, vagy Kiss /1976/ lassú anterograd dendrittranszportjával mutat legjobb egyezést. Ez a lassú típusú transzport a dendritek és/vagy a sejttest citoplazmájának az anyagellátását egészítheti ki. Ez a transzportfolyamat sebességére vonatkozó megállapításunk.

A kezelést különböző időkkel túlélő ill. colchicinnel kezelt állatok GABA transzportjának sajátásaival foglalkozó kísérleteink e munka megírásakor még nem fejeződtek be, így esetleges eredményeit nem tudjuk közölni.

3.3. Az acetilkolinészteráz hisztokémiai lokalizációja a bulbus olfactoriusban

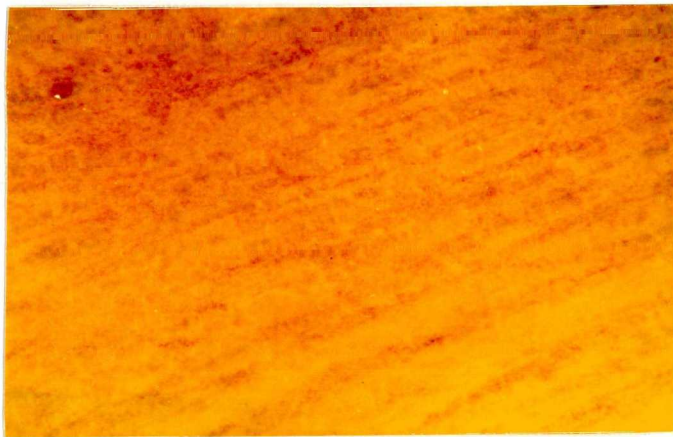
Vizsgálataink során feltérképeztük a bulbus acetilkolinészteráz aktivitást mutató elemeit. A 20-30 μ -os fagyasztott metszetekből készült képek tanulsága szerint a tractus olfactorius mind mediális, mind laterális kötegeiben haladnak a bulbus felé AChE pozitivitást mutató rostok. Ezek közül néhány jól nyomonkövethető, egészen a granuláris réteg szemcsesejtsorai közé való belépéséig /17. kép/. A granuláris réteg jól rendezett szemcsesejtszómái közt, párhuzamosan haladva ezekkel, futnak a centrum felől érkező AChE pozitív rostok /18. kép/. A granuláris rétegben rövidebb-hosszabb szakaszon haladva felfelé, a magasabban fekvő bulbáris régiók felé irányulnak. Ezeknek a rostoknak a terminálisai a belső rostos rétegben, a mitrális sejtek rétegében, a külső rostos rétegben és

a glomerulusok rétegében végződnek /19. kép/. Sok esetben észteráz pozitív sejteket figyelhetünk meg a szemcses sejtek között, főleg a magasabb régiókban. Ezek a sejtek a GOLGI II. típusú sejtek közé tartoznak. Horizontális vagy vertikális elhelyezkedésűek, axonjaik rövidek és a külső rostos réteg alján vagy a szemcses sejtek rétegében végződnek. Megfigyeléseink szerint szómáik mérete nagyobb, számuk kisebb, mint az ugyanabban a rétegben elhelyezkedő szemcses sejteké. Számos esetben találunk az észteráz hisztokémia alapján barnán festődő, a mitrális rétegbe lokalizálható sejteket is. Előfordul ritkán, hogy a külső rostos rétegben elhelyezkedő kihelyezett mitrális sejtek ill. külső ecsetsejtek némelyike is észteráz pozitivitást mutat /20. kép/. A glomerulusok rétegében igen erős enzimaktivitást lehet felismerni. Ezen gömbszerű szinapszishalmazok között ill. bennük végződik a centrális központok felől érkező rostok némelyike /21. kép/. Az intraglomeruláris területen megfigyelhető, hogy a glomerulus nem homogén, hanem több, a szaglóiideggel szinaptizáló mitrális és ecsetsejt fődendrittel kisebb rekeszekre oszlik. Ennek megfelelően, a rostok végződései is hasonló megoszlást mutatnak: a terminálisok ilyen, a szaglóiidegek és a mitrális ill. külső ecsetsejt fődendritjeinek elágazó nyúlványai alkotta intraglomeruláris apró gömbök környékén végződnek. A bulbus legkülső, szaglóiidegrostokból álló rétege nem mutat még nyomokban sem acetilkolinészteráz aktivitást.

A bulbus olfactorius idegelemei közül legerősebb acetilkolinészteráz aktivitása kétségtelenül a glomeruláris és granuláris rétegnek van. Ezeken a helyeken főleg a neuropil mutatja a reakciót. Emellett azonban jelentős az egyes idegelemek enzimaktivitása



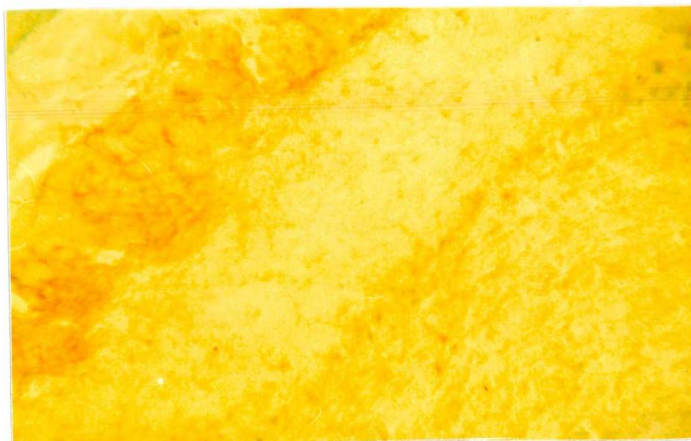
17. kép: normál bulbus tractu-
sában futó észteráz pozitív
rostok. x 380



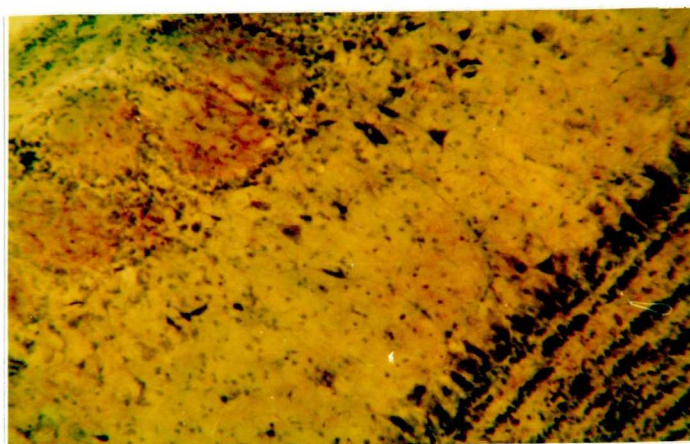
18. kép: normál bulbus granulá-
ris rétegének AChE aktivitása.
x 150



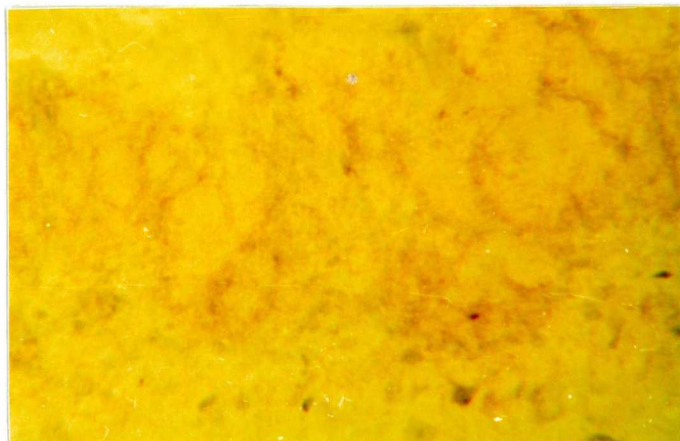
18/a kép: a bulbus granuláris
rétege Golgi II. típusú sejtjei-
nek AChE aktivitása normál szö-
vetben. x 390



19. kép: normál bulbus észteráz
hisztokémiai képe. x 240



20. kép: normál bulbus észteráz
hisztokémiai képe toluidinkékkel
felülfestve.
x 240



21. kép: normál szagló gumó glomeru-
láris rétege. Egyes glomerulusok
közti sejtek is mutatnak észteráz
pozitivitást.
x 350

is, így a granuláris réteg belső rövid axonú sejtjei, a mitrális sejtek némelyik sejtjei és a külső rostos réteg egyes ecsetsejtjeinek számája az, amelyik észteráz pozitivitást mutat.

A bulbus acetilkolinészteráz aktivitása jelentősen megváltozik a bulbus és a tractus olfactorius határán alkalmazott bulbectomia hatására. A bulbectomiát hét nappal túlélő állatok bulbusából készült hisztokémiai metszetek tanulása szerint a granuláris réteg felső harmadában lévő sejtek némelyike és a mitrális réteg sejtjei közül néhány jóval erősebb pozitivitást mutat a kontrollhoz viszonyítva. Az idegsejtek számai erősebb észteráz aktivitásúak, míg a neuropil -- így a granuláris réteg szómasora között és a külső rostos rétegben -- világosabb a festődés /22. 23. kép/. A glomeruláris rétegben kevésbé aktív az enzim. A centrális oldalon bulbectómiát követően a tractus olfactoriusban is megnő az észteráz aktivitás, amit az intenzívebb barna csapadék jelez /24. kép/. A bulbus olfactorius accessoriusban -- tehát szintén a vágás bulbus felőli oldalán -- is megnő az acetilkolinészteráz aktivitása, az egyes észteráz pozitív szómák erősebben festődnek.

3.4. Az acetilkolinészteráz és a kolinacetiltranszferáz kvantitatív meghatározása normál és bulbectomizált állatok bulbusában

A bulbus olfactorius Metabostattal történő mikrohullámú roncsolását követő ACh és kolin tartalom meghatározásakor kolinra $21,97 \pm 0,01$ nM/g nedves szövet, ACh-ra $11,0 \pm 1,1$ nM/g nedves szövet értékeket kaptunk. Ez az ACh ill. kolin tartalom számottevő ChAc és AChE aktivitást tételez fel a bulbusban.



22. kép: megnövekedett AChE pozitivitás a granuláris rétegben bulbectomia után. Erős enzimaktivitású interneuronok. x 175



23. kép: hisztokémiai kép bulbectomia után. A granuláris rétegben megerősödött AChE aktivitás. x 130



24. kép: megerősödött AChE aktivitás a tractusban bulbectomiát követően. x 370

A bulbus olfactorius azonos homogenátumaiból mind az AChE-t, mind a ChAc-t meghatároztuk az anyag és módszer c. fejezetben leírtak szerint. A mért értékek $\mu\text{M}/\text{h}/\text{g}$ szövetben vannak megadva a normál és bulbectomizált bulbusok enzimtartalmánál egyaránt /25. kép/.

A bulbectomia során a bulbus acetilkolinészteráz aktivitásának 68%-át veszítette el, jeléül annak, hogy a centrális területek felől a laterális és mediális tractus olfactoriusban egyaránt nagymennyiségű AChE-t tartalmazó rost éri el a bulbust, s a bulbus AChE tartalmához jelentősen hozzájárul. A ChAc aktivitásnak kb. 58%-os vesztesége azt mutatja, hogy a bulbectomia során átvágott centrális rostok nagyrésze kolinerg transzmissziójú lehetett, s az átvágás során ez az enzimmennyiség kiesett. A fennmaradó ChAc tartalom származhat részben a bulbus kolinerg interneuronjainból -- ezeket nem vágtuk át -- amelyek vagy belső interneuronjai a főbulbusnak, vagy pedig a bulbus olfactorius accessoriusból eredhetnek. A táblázatból látható, hogy a két enzim aránya a kezelt és a kontroll bulbusok esetében eltérő, ami a fejt említett, sajátos enzimeloszlástól függhet.

3.5. Degenerációs vizsgálatok a bulbus olfactoriusban

A szaglógumó acetilkolinészterázának hisztokémiai és biokémiai, transzferázának biokémiai vizsgálata során a normál és bulbectomizált szövet között megfigyelt eltérő enzimaktivitás szükségessé tette, hogy demonstráljuk azokat a rostokat, amelyeket a bulbectomia során átvágtunk, s lehetőség szerint lokalizáljuk a degenerált rostok termináljait a bulbus egyes rétegeiben.

A glomeruláris rétegben interglomerulárisan számos degenerált rostterminális mutatható ki /26. kép/. Ezek a végződésök zömmel a periglomeruláris sejtek környékén végződnek, s csak kisebb hányaduk intraglomeruláris. A Golgi-féle arany impregnációval felülfestett degenerációs metszeteken hasonló a helyzet /27. kép/, s nyomomonkövethetőek a glomerulusok környékén végződő rostok is, amelyek a külső rostos rétegen haladnak át. Ebben a rétegben is találunk degenerálódott rostterminálisokat, jelölül annak, hogy a centrális rostok egy része ebben a rétegben adja le moduláló impulzusait. A legtöbb rostvégződés kétségtelenül a granuláris rétegben figyelhető meg. A degenerálódott terminálisok a szemcse-sejtek szómái közötti neuropilben végződnek nagy számban, s zömükben e sejtek dendritjeivel szinaptizálnak ... /28. kép/. A képen jól kirajzolódik a szemcsesejtek testének tömör sora, amelyek között kötegekben haladnak a centrális eredetű rostok; néhol megfigyelhető a felsőbb rétegek felé elforduló rost is. A bulbectomia során átvágott tractus olfactorius lateralis és medialis rostjai is mutatják a degeneráció jellegzetességeit. A felsőbb idegközpon-tok felől a szaglórendszerben futó rostok párhuzamosan, rendezetten haladnak a bulb. olfactorius accessor és a fő bulbus granuláris rétege felé /29. kép/.

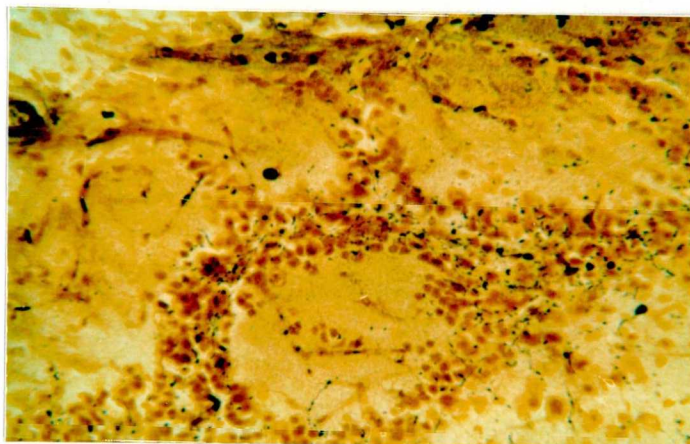
3.6. A magas affinitású kolin felvétel demonstrálása bulbus homogenátumban

A magas affinitású kolin felvételt -- mint a kolinergitás egyik markerét -- bulbus homogenátumban vizsgáltuk /30. kép/. A vizsgálat szerint a K^+ -mal preinkubált homogenátum Na^+ dependens kolin felvétele a kontroll 174%-ára nőtt, ami a bulbus centrális

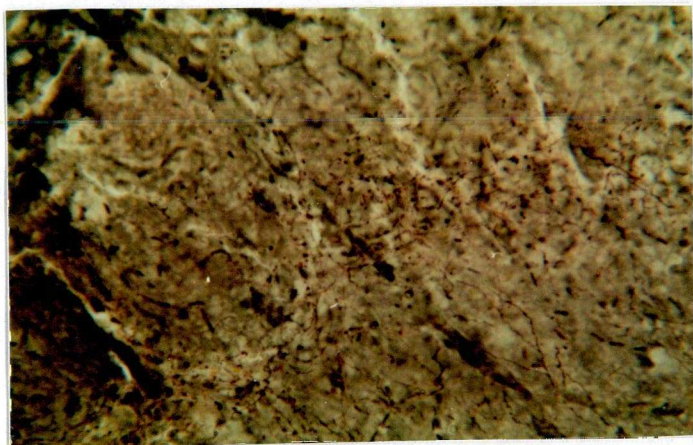
A patkány bulbus olfactoriusának AChE és ChAc
enzim aktivitása $\mu\text{M}/\text{h}/\text{g}$ szövet súlyban kifejezve

Enzim vizsgálat	AChE $\mu\text{M}/\text{h}/\text{g}/$	ChAc $\mu\text{M}/\text{h}/\text{g}/$	$\frac{\text{AChE}}{\text{ChAc}}$
Kezelt	154,27	2,67	57,56
Kontroll	475,2	6,29	75,45
$\frac{\text{Kezelt}}{\text{Kontroll}}$	32,46%	42,5%	-

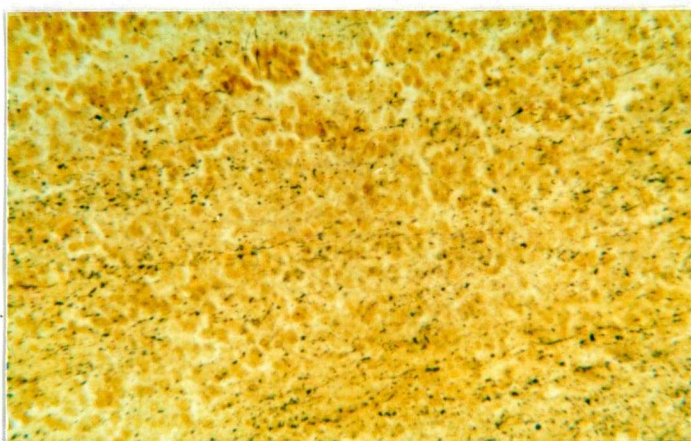
25. kép: a bulbus AChE és ChAc aktivitásának összefoglaló táblázata



26. kép: degenerálódott rost-
terminálisok a glomerulusok
környékén. Degenerációs fes-
tés. x 380



27. kép: Golgi-féle arany impregnációval felülfestett degenerációs metszet a glomeruláris és külső rostos rétegről. x 375



28. kép: degenerálódott terminálisok a granuláris rétegben. x 375



29. kép: a bulbectomia hatására degenerálódott centrális rostok a tractusban. x 220

eredetű kolinerg terminálisainak és esetlegesen saját kolinerg -- a fő bulbusban ill. a bulbus olfactorius accessoriusban előforduló -- interneuronjai jelenlétére utal.

A szövettanyészen történő magas affinitású kolin felvétel kimutatását megnehezíti a magas háttér, a nem specifikus jelölődés, esetenként pedig az emulzió gyűrődése vagy leválása tette értékelhetetlenné az autoradiogramot. A kísérletek még folyamatban vannak.

3.7. Kolin uptake autoradiográfiás vizsgálata

A kolinerg rendszer tanulmányozása során olyan kísérletet is végeztünk, amellyel a jelzett kolin in vivo felvételére és inkorporációjára kívántunk információt kapni. A vizuális kontroll mellett a ventriculusba injektált 5 μ l-nyi ³H-kolin /spec. akt.: 8,3 Ci/mmol/ megoszlását 30 perces túlélés után kívántuk vizsgálni aralditba ágyazott bulbus szeleten. A beágyazás, lefedés és előhívás a már korábban ismertetett módon történt.

A vizsgálat azt mutatja, hogy az ezüstszemcsék eloszlása a teljes bulbusban nagyjából egyenletes, de a mitrális sejtek és azok alatti zónában, a szemcsesejtek között akadnak olyan idegelemek, amelyek sokkal jobban akkumulálják a jelzett kolint, mint a bulbus más idegelemei /31. kép/. Ez a többlet kolin-felvétel származhat a kolinerg idegsejtek magasabb kolin felhasználásából is, és ez felveti eme idegsejtek -- a belső rövid axonú sejtek esetlegesen kolinerg működésének kérdését.

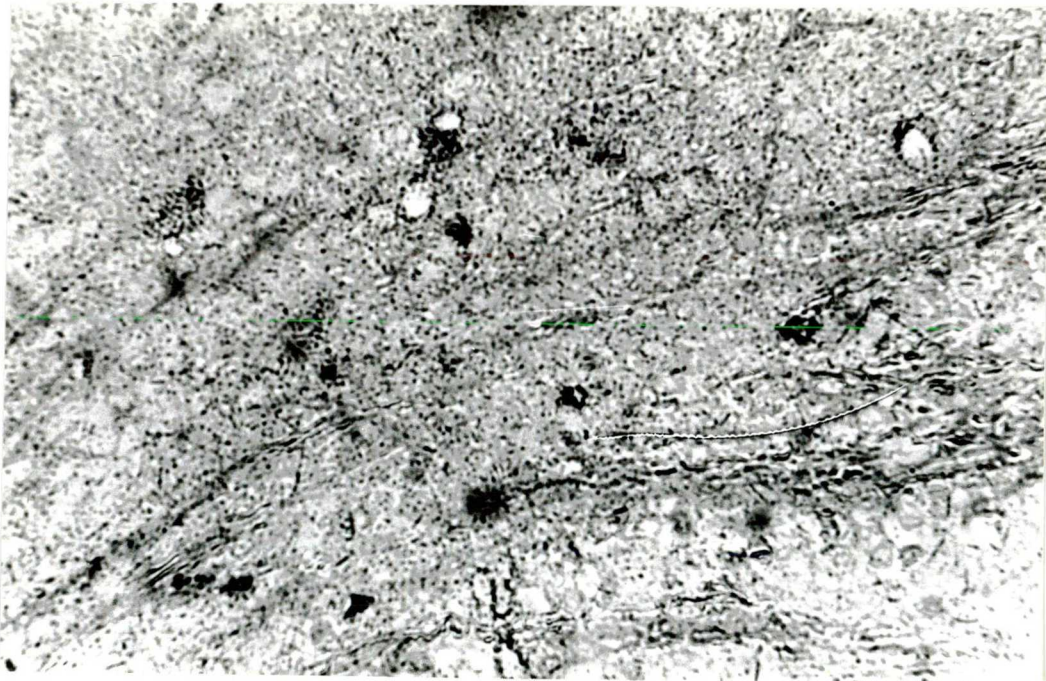
A magas affinitású kolin felvétel vizsgálata patkány
bulbus homogenátumon ^x

V i z s g á l a t		Kontroll aktivitás /cpm/	Preinkubált aktivitás /cpm/
Puffer	Na ⁺ tart.	91486±29000	119321±20100 ^{xx}
	Na ⁺ mentes	41705±2300	32578±2250
Na ⁺ dependens aktivitás		49781	86746
Kolin fel- vétel növekedés a kontrollhoz viszonyítva		1	1,74

x Az értékeket hat mérés átlagából számoltuk

xx Az érték négy mérés átlaga

30. kép: Összefoglaló táblázat a nagy affinitású kolin felvétel vizsgálata során nyert adatokról.



31. kép: ³H-kolinnal kezelt bulbus granuláris rétegének fénymikroszkópos autoradiográfiás képe. Az ezüstszemcsék a belső rövid axonú sejtek felett halmozódtak fel. x 900

3.8. ^3H -QNB kötés a muszkarinos acetilkolin receptorokhoz

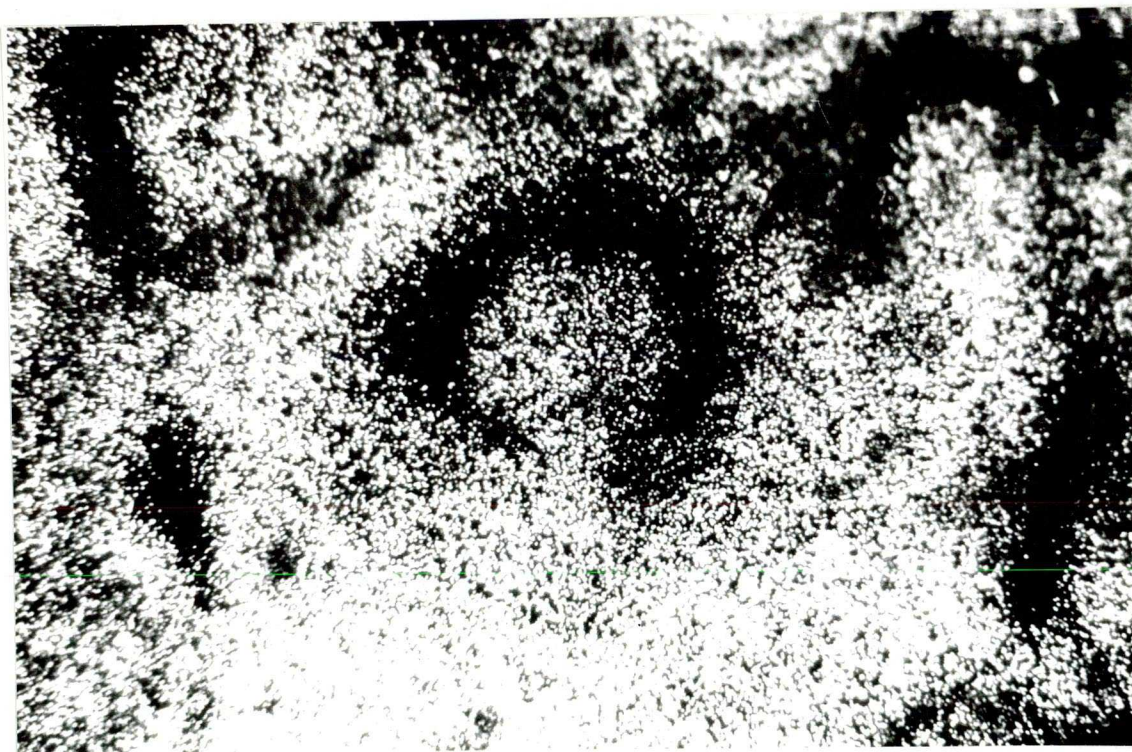
A bulbus P_2 frakcióján elvégzett receptorkötési vizsgálatok eredményét a 32. képen táblázatosan adjuk meg. A központi idegrendszer más területeiről származó és a muszkarinos típusú receptorokra vonatkozó irodalmi adatokkal való összevethetőség érdekében a specifikus ^3H -QNB kötést mg fehérjére vonatkoztatva is megadtuk. A fehérjemeghatározás /Lowry, 1951/ 9,78% fehérjetartalmat mutatott ki 1 mg bulbus szövetben. Az eredményekből kitűnik, hogy a patkány szaglógumója számottevő muszkarinos AChR-ral rendelkezik, bizonyítva, hogy a bulbusban a kolinerg transzmisszió is jelen van.

3.9. Muszkarinos acetilkolin receptorok fénymikroszkópos autoradiográfiás lokalizálása

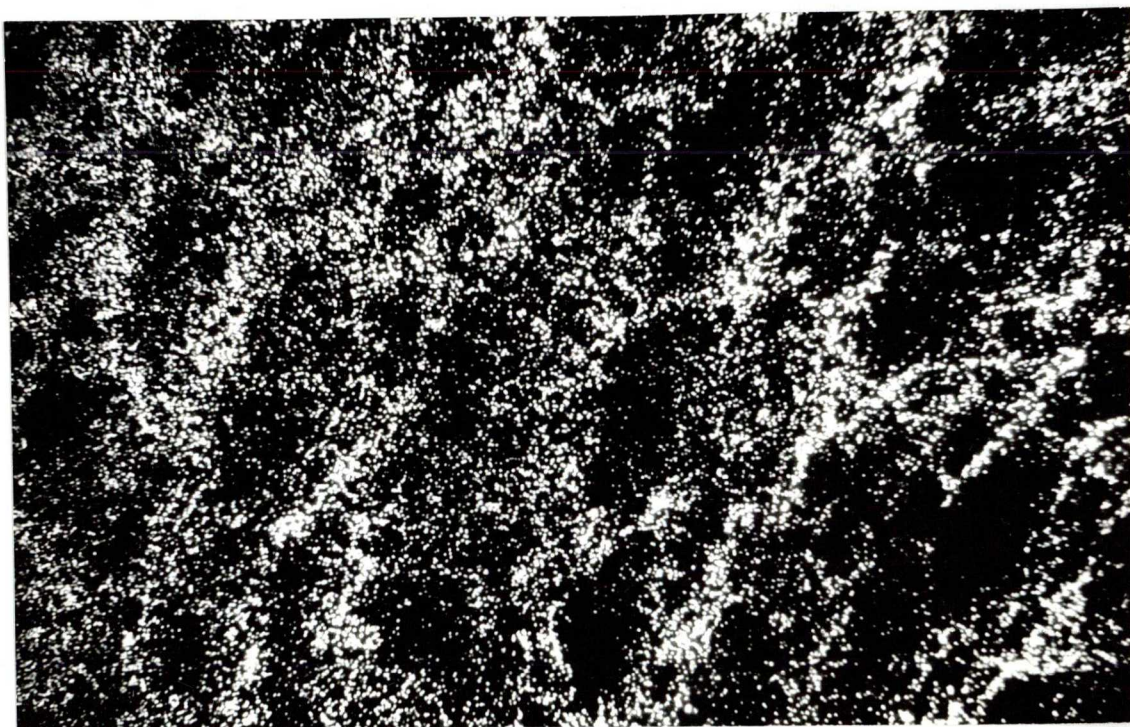
A muszkarinos AChR-ok fénymikroszkópos autoradiográfiás vizsgálatát ^3H -QNB-vel jelölt bulbusok kriosztáttal metszett 10-20 $\mu\text{-os}$ metszetein végeztük. A receptorokhoz kötött jelzett ligand eloszlására a következő eredményeket kaptuk: legerősebb ezüstszemcse felhalmozódás a glomerulusokban és a granuláris rétegben található. Az intraglomeruláris specializációk, a fő projekciós neuronok dendritarborizációja is kivehető a fénymikroszkópos sötétlátóteres felvételen /33. kép/. A granuláris rétegben található ezüstszemcsék zöme a szemcses sejtek sorai közt oszlik el; kevesebb a szemcse a sejtek szómái felett /34. kép/. A szaglógumó külső rostos rétege kevesebb jelzett QNB-t kötött meg, ennek megfelelően e terület felett található szemcseszám is alacsonyabb, s főleg a réteg neuropilje, a mitrális és szemcses sejtdendritek jelződtek /35. kép/.

^3H -QNB kötés	cpm	dpm	nCi	pmól	$\frac{\text{pmól}}{\text{mg feh.}}$	$\frac{\text{pmól}}{1 \text{ bulbos}}$
spec. QNB kötés	2955	6873	3,1	0,258	1,057	2,067

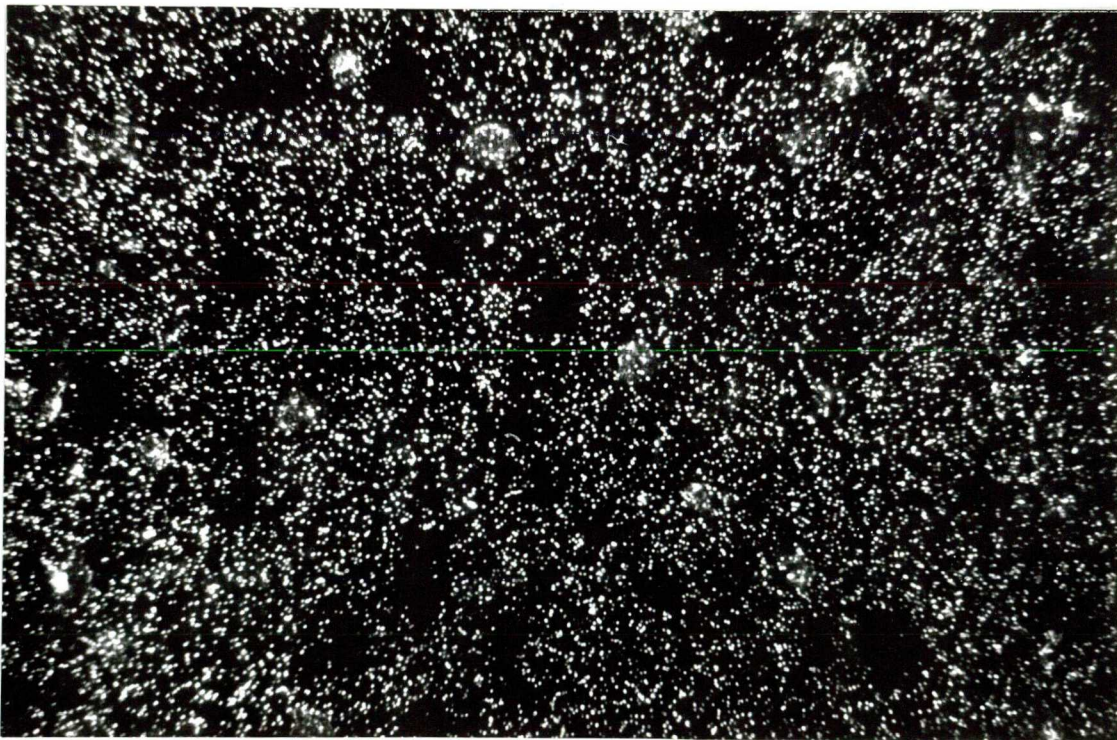
32. kép: A specifikus ^3H -QNB kötés eredményeinek táblázatos összefoglalása. Az értékeket öt mérés átlagából számoltuk.



33. kép: ^3H -QNB receptorkötés a glomeruláris rétegben. Fénymikroszkópos sötétlátóteres autoradiográfiás felvétel. x 680



34. kép: ³H-QNB receptorkötés a granuláris rétegben. Fénymikroszkópos sötétlátóteres autoradiográfia. x 680



35. kép: ³H-QNB receptorkötés a külső rostos rétegben. Fénymikroszkópos sötétlátóteres autoradiográfia. x 680



4. M e g b e s z é l é s

Az elvégzett vizsgálatok alapján valószínűsíteni kívántuk a GABAerg -- kolinerg interakció létét a bulbus olfactoriusban.

A vizsgálatok során először ^3H -GABA bulbáris felvételét és intraneuronális transzportját tanulmányoztuk. A fény- és elektronmikroszkópos autoradiográfiás technikával a jelzett GABA sajátos megoszlását figyeltük meg a bulbuson belül; a szemcses sejtek periferikus dendritjei a külső rostos rétegben szelektíven akkumulálják a GABÁ-t. Ez a megfigyelés jól összhangban van a korábbi bulbáris GABAerg működésre vonatkozó adatokkal /Halász és mtsai, 1979/. Ribak és mtsai /1977/ a glutaminsav-dekarboxilázt térképezték fel peroxidáz immuncitokémiával, Jaffé és Cuello /1980/ biokémiailag határozta meg a GABÁ-t szintetizáló enzim eloszlását a bulbus rétegeiben. Ezen vizsgálatok kiderítették, hogy a szintetizáló enzim legnagyobb mennyiségben a külső plexiform rétegben és a glomeruláris rétegben fordul elő, ennél kevesebb található a granuláris rétegben; a többi réteg glutaminsav-dekarboxiláz tartalma elenyésző. Az enzimeloszlás maximuma egybeesik a szemcses sejt dendritarborizációjának zónájával, ami megerősíti vizsgálataink eredményét: a szemcses sejtek periferikus dendritjei gátló transzmitterként GABÁ-t használnak. A szemcses sejteknek a ventriculushoz közelebb eső dendritzónája ugyancsak jelentős, de kevesebb enzimtartalmat tárol; a granuláris rétegben a szemcses sejtek dendritjeinek egységnyi területe felett kevesebb az ezüstszemcse a kisebb GABA inkorporációnak megfelelően.

A periférikus dendritvégződéseken át felvett GABA intraneuronálisan transzportálódik. Vizsgálataink szerint a transzport retrográd,

a szemcses sejtek szómája felé haladó anyagáramlás. Streit és mtsai /1979/ munkájában merül fel először, hogy létezhethet egy szelektív transzmitter felvételen alapuló és azt követő retrográd /axonális vagy dendritikus/ transzport. Munkájukban a GABA-ra is bizonyították a substantia nigra és a nucl. caudatus, valamint a putamen közti transzmitterspecifikus, retrográd jelölődést. Vizsgálatainkból úgy tűnik, hasonló a helyzet a bulbusban: a szemcses sejtek specifikus GABA felvételét követi a retrográd, eme sejttypus esetében dendritikus anyagtranszport a szóma felé /Halász és Gulya, 1979; Gulya és Halász, 1979; Gulya, 1979; Gulya és mtsai, 1980/.

A transzportsajátságokat leíró görbe -- úgy véljük -- magán viseli az előzőekben már említett Gross és Beidler által /1975/ közölt görbék néhány jellegzetességét, amely azonban a különböző időkben megvizsgált GABA-transzport köztes tagjaként fogható fel.

Felvetjük természetesen, hogy míg az általunk vizsgált autoradiográfiás jel az idegvégződéseken bizonyára zömében az eredetileg jelzett GABA-é /Halász és mtsai, 1979/, addig a sejttest felé áramló radioaktív jel származhat részben vagy teljes egészében is olyan fehérjéktől, amelyekbe a GABA beépült. Ennek figyelembevétele mellett beszéltünk GABA transzportról, mivel a vándorló jelzett vegyületet a jelenleg rendelkezésünkre álló eszközökkel meghatározni nem tudtuk. Hasonló módon Hunt és Künzle /1976 b/ munkájában sem volt eldönthető, hogy maga az aminosav, vagy annak egy származéka vándorol-e.

Munkánk későbbi szakaszában a bulbus AChE hisztokémiáját tanulmányoztuk. Eredményeink összhangban vannak a korábbi hisztokémiai vizsgálatokkal. Godfrey és mtsai /1980/ vizsgálatai szerint az AChE

legnagyobb mennyiségben a glomeruláris és granuláris rétegben van -- ezt jól jelzik hisztokémiai képeink is -- de nem elhanyagolható a külső rostos réteg enzimetartalma sem. Vizsgálatainkban eme rétegre jellemzőnek inkább a diffúz AChE aktivitást találtuk, de esetenként jól kivehetően rostok és egyes idegelemek is észteráz pozitivitást mutattak.

Bulbectomy hatására szembetűnő volt az egyes idegsejtek -- főleg a mitrális sejteknek és a szemcsesejtek felső harmadának zónájában -- megerősödött észteráz pozitivitása. Ezek az idegsejtek /Golgi és Cajal-féle sejtek/ intrabulbárisak és rövid axonnal rendelkeznek. Nyúlványaik a külső rostos réteg alsó harmadában illetve a szemcsesejtek rétegében a mitrális és szemcsesejtek szómáin és nyúlványain végződnek, ugyanakkor önmaguk pedig centrális eredetű kolinerg axonoktól is innerválnak. A jelzett kolint a bulbus többi idegeleménél jobban akkumulálják, ami arra utal, hogy ezek a belső rövid axonú sejtek nemcsak kolinoceptívek, hanem kolinergiek is lehetnek. Ez megindokolja a bulbectomizált szövet megmaradó ChAc és AChE aktivitását, ami nem származhat csupán a centrális rostvégzódések enzimetartalmától. Hisztokémiai képeken esetenként a glomerulusok közt is megfigyeltünk erős AChE pozitív festődésű sejteket is. Mivel ez a sejttípus teljesen hasonló morfológiai sajátosságokat mutat a belső rövid axonú sejtekkel, az AChE hisztokémia alapján azonosan festődik, feltételezhető, hogy ezek a külső rövid axonú sejtek is kolinergiek -- bár e megállapítás bizonyításához további vizsgálatok elengedhetetlenek. Néha a mitrális sejtek közt is megfigyeltünk erősen festődő észteráz pozitív sejteket.

Hunt és Schmidt /1978 a,b/ vizsgálatai vetették fel, hogy ezek a neuronok kolinerg, mert azokon a területeken, ahol szinaptizálódnak, az α -bungarotoxin kötődését figyelték meg. Felvetődik a kérdés, ugyanazok a tulajdonságok jellemzik-e a toxinnak a központi idegrendszerben történő kötődését, mint a neuromuszkuláris junctionban? A mitrális sejtek kolinergitását vizsgálataink nem bizonyítják.

A bulbectomizált szövet tractusa jól reprezentálja az erős AChE festődésű centrális rostokat, amelyek a bulbusba futnak. A degenerációs vizsgálatok hasonlóan jelzik az átvágott rostokat, amelyek egy része kolinerg. A bulbectomia bulbus felőli oldalán nem látunk AChE pozitív axonokat befutni a felsőbb agyi központok felé, ami azt bizonyítja, hogy a bulbust kolinerg rostok nem hagyják el, így a bulbus ChAc tartalma a centrális kolinerg terminálisok és a kolinerg interneuronok enzimtartalmának tudható be.

A magas affinitású kolin felvételt kimutattuk a bulbusban, ami arra utal, hogy kolinerg idegelemek találhatók benne. Ezek az elemek egyrészt efferens terminálisok, amelyek AChE pozitivitást is mutatnak és zömmel a granuláris rétegben, a mitrális sejteken és nyúlványaikon, valamint szintén nagy tömegben a glomerulusok közt végződnek, kisebb részben a külső rostos rétegben. A kolin felvétel másrészt származhat bulbáris kolinerg interneuronoktól; ebből a szempontból számbajöhetnek a belső rövid axonú sejtek és a glomerulusok közötti hasonló jellegzetességű kis sejtek, a külső rövid axonú sejtek.

A 62 mM-os K^+ tartalmú pufferrel történő preinkubálás után a nagy affinitású kolin felvétel a kontroll 174%-ára nőtt -- ez összehasonlítva a korábbi, más agyterületeken történt vizsgálatok eredményeivel /Murrin és Kuhar, 1976/ -- erős bizonyítékot ad a bulbaris kolinerg idegelemek létére.

Az AChR-hoz történő szelektív ligandum kapcsolás / 3H -QNB/ során az ezüstszemcsék zöme a glomerulusokhoz és a granuláris réteghez lokalizálható. Ezek a területek külön-külön a kolinerg centrális rostokra és a külső és belső rövid axonú sejtekre nézve egyaránt poszt-szinaptikusak, ugyanakkor e területeken lépnek szinaptikus kapcsolatba egymással az extrabulbáris kolinerg rostok és az intrabulbáris kolinerg neuronok is, megmagyarázva az ezüstszemcsék feldúsulását ezekben a rétegekben. A külső rostos réteg szegényebb AChR-okban, amit az indokol, hogy itt főleg a centrális rostok szinaptizálnak, a belső rövid axonú sejtek nyúlványai ebben a zónában ritkábban fordulnak elő. Az AChR-ok ilyen eloszlását erősítik meg az AChE hisztokémia lokalizálásának eredményei is.

A GABAerg -- kolinerg interakció tehát reálisan feltételezhető a szaglógumóban. A bulbus számottevő kolin, acetilkolin, AChE és ChAc tartalma kolinerg idegelemek létét valószínűsítette, amelyet az AChE hisztokémiai, a magas affinitású kolin felvétel és a receptorkötés tanulmányozása során kapott eredményeink megerősítenek.

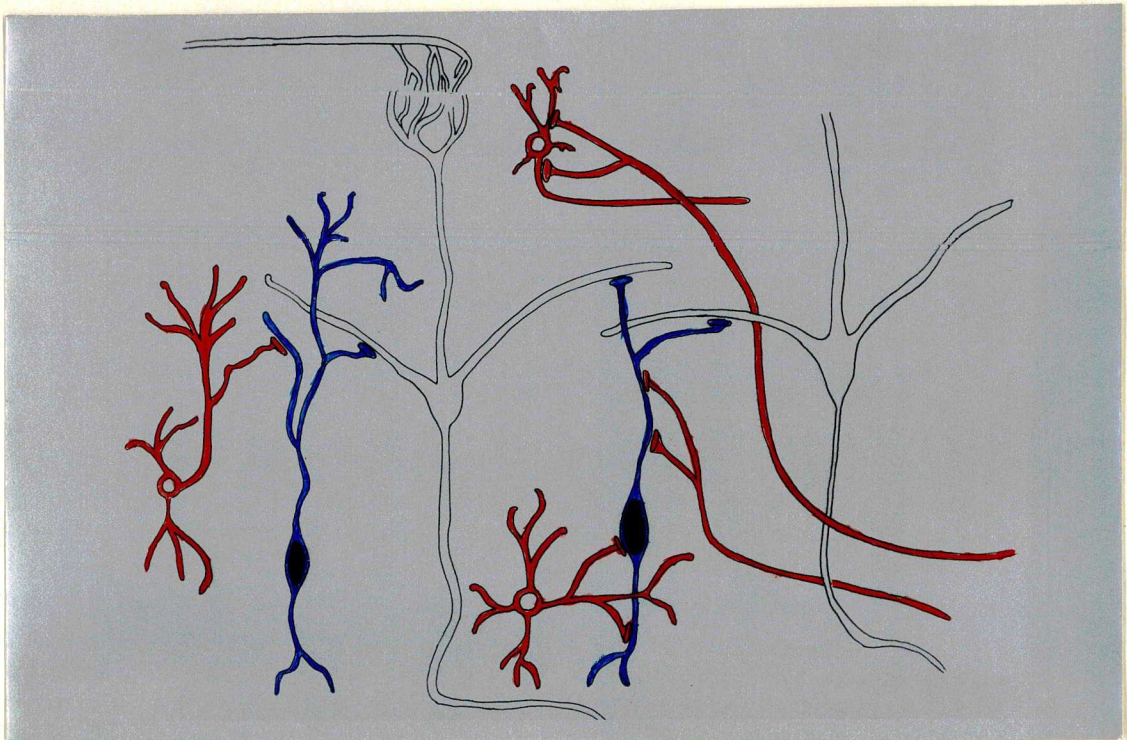
Vizsgálataink a bulbusban két kolinerg rendszert valószínűsítettek. Az extrabulbáris kolinerg rostok a szemcsesejtek zónájában, a mitrális sejteken, a külső rostos rétegben és a glomerulusok közt végződnek, miközben a GABAerg szemcsesejteken és az esetlegesen szintén kolinerg külső rövid axonú sejteken szinaptizálnak. E rostok zöme a nucl. olfactorius anteriorból jön /Shepherd, 1972/.

A másik kolinerg rendszer intrabulbáris, a bulbus valódi interneuronjaiból, a belső rövid axonú sejtekből áll, kisebb a valószínűsége -- a bizonyítékok csak közvetettek -- a külső rövid axonú sejtek kolinergitálásának. A belső rövid axonú sejtek axonjai a szemcsesejteken végződnek, kolinerg-GABAerg interakciót valósítva meg. Elképzelhető, hogy ezen kolinergek jellemzett sejttípus más, extrabulbáris kolinerg rostokkal is szinaptizál. A valószínűsített kolinerg--GABAerg interakció összefoglaló sémája a 36. képen látható.

Ö s s z e f o g l a l á s

Munkánk célja az volt, hogy a patkány bulbus olfactoriusában feltérképezzük azokat az idegelemeket, amelyek mediátor anyagként GABÁ-t vagy ACh-t használnak. E vizsgálatok során a következő megfigyeléseket tettük:

- 1./ Az exogén uton bejuttatott GABA autoradiográfiás lokalizációjával identifikáltuk a GABAerg transzmissziós helyet. Ezen eredményünk megerősíteni látszik a GABA feltételezett gátló szerepét a szemcsesejt dendritok és mitrális dendritok közötti gátló szinapszisban.
- 2./ A szemcsesejtek perikarionjának és primer dendritjének jelölődését a dendritvégződés GABA felvétele és a retrográd dendritikus transzportja okozhatja. A GABA transzportja vizsgálataink szerint 14,4-15,3 mm/nap.
- 3./ A bulbus kolinerg markereinek vizsgálata -- ACh, AChE, ChAc, nagy-affinitású kolin felvétel, AChR -- a kolinerg idegelemek létét valószínűsíti. Ezek egyrészt az extrabulbáris kolinerg rostok, másrészt az intrabulbáris interneuronok: a belső rövid axonú /Golgi és Cajal-féle/ sejtek, valamint a külső rövid axonú sejtek lehetnek.
- 4./ Vizsgálataink alapján a kolinerg--GABAerg interakció a következő szinapszisokban lehetséges: efferens centrális axon → szemcsesejt dendrit; intrabulbáris rövid axonú sejt → szemcsesejt.



36. kép: Összefoglaló sémás rajz a bulbusban feltételezhető kolinerg -- GABAerg interakcióról. A kolinerg transzmissziójú elemek pirossal, a GABAergek kékkel jelzettek.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezuton mondok köszönetet Dr. Kása Péter professzor Urnak, a SZOTE Központi Kutatólaboratórium Vezetőjének, hogy munkám elvégzését intézetében lehetővé tette és értékes észrevételeivel, szakmai tanácsaival irányította.

Köszönetet mondok Dr. Halász Norbert tudományos főmunkatársnak, a SZBK Biofizikai Intézete igazgatóhelyettesének a dolgozat GABÁ-val kapcsolatos vizsgálatait során nyújtott irányításáért, segítségéért.

Ezt az alkalmat megragadva köszönöm a SZOTE Központi Kutatólaboratóriuma minden dolgozójának munkám során tanúsított segítőkész emberi magatartását, értékes szakmai segítségét.

- Agranoff, B.W. /1974/: Neurotransmitters and synaptic transmission.
Fed. Proc. 34, 1911-1914
- Albrecht, M.H. /1954/: Mounting frozen sections with gelatin.
Stain Technol. 29, 89-90
- Anderson, C.R., Stevens, C.F. /1973/: Voltage clamp analysis of
acetylcholine produced endplate current fluctuations at
frog neuromuscular junction.
J. Physiol. Lond. 235, 655
- Ansell, G.B., Spanner, S. /1967/: The metabolism of labeled ethanol-
amine in brain of the rat in vivo.
J. Neurochem. 14, 873-885
- Barber, R.P. et al. /1978/: GABAergic terminals are presynaptic
to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa
of the rat spinal cord.
Brain Res., 141, 35-55
- Birdsall, N.J.M., Hulme, E.C., Burgen, A. /1980/: The character of
the muscarinic receptors in different regions of the rat
brain. Proc. R. Soc. Lond. B. 207, 1-12
- Bisti, S., Joshif, G., Strata, P. /1971/: Suppression of inhibition in
the cerebellar cortex by picrotoxin and bicuculline.
Brain Res., 28, 591-593
- Bloom, F.E., Costa, E., Salmoiraghi, G.S. /1964/: Analysis of individual
rabbit olfactory bulb neuron responses to the microelectro-
phoresis of acetylcholine, norepinephrine and serotonin
synergists and antagonists. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 146,
16-23
- Browning, E.T., Schulman, M.P. /1968/: ¹⁴C-Acetylcholine synthesis by
cortex slices of rat brain. J. Neurochem., 15, 1391-1395
- Butcher, L.L. /ed/: Cholinergic -- monoaminergic interactions in the
brain. Academic Press, 1978.

- Cajal, Ramón Y. /1911/: Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. A Maloine, Paris
- Cheney, D.L., Costa, E. /1978/: The transsynaptic regulation of acetylcholine metabolism in nuclei of rat brain: pharmacologic implications. In: Cholinergic -- monoaminergic interactions in the rat brain. Ed.: L.L. Butcher, Academic Press
- Collius, G.G.S. /1979/: Effect of chronic bulbectomy on the depth distribution of amino acid transmitter candidates in rat olfactory cortex. Brain Res., 171, 552-555
- Curtis, D.R., Duggan, A.W., Felix, D., Johnston, G.A.R. /1970/: Bicuculline and central inhibition. Nature, 226, No. 5252, 1222-1224
- Curtis, D.R., Johnston, G.A.R. /1974/: Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. Rev. Physiol., 69, 97-188
- Dahlström, A., Fuxe, K., Olson, L., Ungerstedt, U. /1965/: On the distribution and possible function of monoamine nerve terminals in the olfactory bulb of the rabbit. Life Sci., 4, 2071-2074
- Diamond, I., Kennedy, E.P. /1969/: Carrier - mediated transport of choline into synaptic nerve endings. J. Biol. Chem., 244, 3238-3263
- DiGiamberardino, L. /1971/: Independence of the rapid axonal transport of protein from the flow of free amino acids. Acta Neuropath. /Berl./ Suppl. V., 132-135
- Droz, B. /1974/: Conclusion générales. In: Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Médicales. Vol. 30. Fasc. 1-3, 124-137
- Droz, B., Rambourg, A., Koenig, H.L. /1975/: The smooth endoplasmic reticulum: structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport. Brain Res., 93, 1-13
- Duggan, A.W., McLennan, H. /1971/: Bicuculline and inhibition in the thalamus. Brain Res., 25, 188-191

- Eckernäs, S.-A., Aquilonius, S.-M. /1977/: A simple radioenzymatic procedure for the determination of choline and acetylcholine in brain regions of rats sacrificed by microwave irradiation. *Acta Physiol. Scand.*, 100, 446-451
- Ellman, G.L. et al. /1961/: A new and rapid colorimetric determination of acetyl - cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95
- Farb, D.H., Berg, D.K., Fischbach, G.D. /1979/: Uptake and release of ^3H - γ -aminobutyric acid by embryonic spinal cord neurons in dissociated cell culture. *J. Cell. Biology*, 80, 651-661
- Felix, D., McLennan, H. /1971/: The effect of bicuculline on the inhibition of mitral cells of the olfactory bulb. *Brain Res.*, 25, 661-664
- Ferriero, D., Margolis, F.L. /1975/: Denervation in the primary olfactory pathway of mice. II. Effects on carnosine and other amine compounds. *Brain Res.*, 94, 75-86
- Fonnum, F. /1969/: Radiochemical microanalysis for the determination of cholinacetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Biochem. J.* 115, 465-472
- Gerebtzoff, M.A. /1959/: Cholinesterases. Pergamon Press, New York.
- Gerlach, J.L., McEven, B.S. /1972/: Rat brain binds adrenal steroid hormone radioautography of hippocampus with corticosterone. *Sciences*, Vol. 175, 1133-1136
- Godfrey, D.A. et al. /1980/: Distribution and derivation of cholinergic elements in the rat olfactory bulb. *Neurosci.*, 5, 273-295
- Graham, L.T. /1973/: Distribution of glutamic acid decarboxylase activity and GABA content in the olfactory bulb. *Life Sci.*, 12, 443-447
- Greengard, P. /1976/: Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. *Nature*, 260, 101

- Gross, G.W., Beidler, L.M. /1975/: A quantitative analysis of isotope concentration profiles and rapid transport velocities in the C fibers of the garfish nerve. *J. Neurobiol.* 6, 213-232
- Groves, P.M., Young, S.J., Wilson, C.J. /1978/: Nigro - striatal relations and the mechanisms of action of amphetamine. In: *Cholinergic monoaminergic interactions in the brain*. Ed.: L.L. Butcher, Academic Press.
- Gulya, K. /1979/: ^3H -GABA felvételének és transzportjának autoradiográfiás vizsgálata patkány bulbus olfactoriusában. Szakdolgozat.
- Gulya, K., Halász, N. /1979/: ^3H -GABA felvételének és transzportjának autoradiográfiás vizsgálata patkány bulbus olfactoriusában. XI. Magyar Elektronmikroszkópos és Mikroanalízis Konferencia, Szeged, Összefoglaló 380-381
- Gulya, K., Szepes, G., Bánsághi, K., Kása, P. /1980/: Acetylcholine mediated transmission sites in the rat olfactory bulb. XXVIII. Internat. Congress of physiological sciences, Budapest /in press/.
- Guyenet, P. et al. /1973/: Inhibition by hemicholinium-3 of ^{14}C -Acetylcholine synthesis and ^3H -choline high affinity uptake in rat striatal synaptosomes. *Mol. Pharmacol.* 9, 630-639
- Halász, N. et al. /1977/: Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. *Brain Res.*, 136, 455-474
- Halász, N., Ljungdahl, Á., Hökfelt, T. /1978/: Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. II. Fluorescence histochemical, autoradiographic and electron microscopic localization of monoamines. *Brain Res.*, 154, 253-271
- Halász, N., Ljungdahl, Á., Hökfelt, T. /1979/: Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. III. Autoradiographic localization of ^3H -GABA. *Brain Res.*, 167, 221-240
- Halász, N., Gulya, K. /1979/: Preszinaptikus dendritek GABA felvétele. Magyar Anatómus, Hisztológus és Embriológus Társaság előadóülése.
- Hanson, M., Edström, A. /1978/: Mitosis inhibitors and axonal transport. *Internat. Rev. Cytol. Suppl.* 7, 373-402

- Hanin, I., Costa, E. /1976/: Approaches used to estimate brain acetylcholine turnover rate in vivo; effects of drugs on brain acetylcholine turnover rate. In: Biology of cholinergic function. Ed.: Goldberg and Hanin. Raven Press, New York.
- Hebb, C., Silver, A. /1956/: Choline acetylase in the central nervous system of man and some other mammals. J. Physiol. Lond. 134, 718-728
- Heiwall, P.O., Larsson, P.A., Dahlström, A. /1977/: Further evidence for the involvement of microtubule on axonal transport; comparison between the blocking effect of colchicine and lumicolchicine. In: Synapses. The proceedings of an Internat. Symp. held under the auspices of the Scottish Electrophysiol. Soc. Ed.: Cottrell and Usherwood. Blackie Press.
- Holden, J.T. et al. /1975/: Inhibition of high-affinity choline transport in rat striatal synaptosomes by alkyl-bisquaternary ammonium compounds. Mol. Pharmacol. 11, 19-27
- Hökfelt, T., Dahlström, A. /1971/: Effects of two mitosis inhibitors /colchicine and vinblastine/ on the distribution and axonal transport of noradrenaline storage particles studied by fluorescence and electron microscopy. Z. Zellforsch. 119, 460-482
- Hökfelt, T., Ljungdahl, Å. /1972/: Histochemical determination of neurotransmitter distribution. Neurotransmitters Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis., 50, 1-24
- Hökfelt, T., Ljungdahl, Å. /1975/: Uptake mechanisms as a basis for the histochemical identification and tracing of transmitter specific neuron populations. In: Use of axonal transport for studies of neuronal connectivity. Ed.: W.M. Cowan, M. Cuenod. Elsevier, Amsterdam, pp. 249-305
- Hökfelt, T. et al. /1978/: Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamin-containing neurons in the rat central nervous system. Neurosci., 3, 517-538
- Hunt, S.P., Künzle, H. /1976,a/: Observations on the projections and intrinsic organization of the pigeon optic tectum: an autoradiographic study based on anterograde, axonal and dendritic flow. J. Comp. Neur. 170, 153-172

- Hunt, S.P., Künzle, M. /1976, b/: Selective uptake and transport of label within three identified neuronal systems after injection of ^3H -GABA into the pigeon optic tectum: an autoradiographic and Golgi study. J. Comp. Neurol. 170, 173-190
- Hunt, S., Schmidt, J. /1978, a/: Are mitral cells cholinergic?
In: Society for Neuroscience Symposia Vol. III. Aspects of Behavioral Neurobiology. Ed.: Ferrendelli, J.A., 204-218.
The Society for Neuroscience, Bethesda.
- Hunt, S., Schmidt, J. /1978, b/: Some observations on the binding patterns of α -bungarotoxin in the central nervous system of the rat. Brain Res. 157, 213-232
- Iversen, L.L., Neal, M.J. /1968/: The uptake of ^3H -GABA by slices of rat cerebral cortex. J. Neurochem. 15, 1141-1149
- Jaffé, E.H., Cuello, A.C. /1980/: The distribution of catecholamines, glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in layers of the rat olfactory bulb. Brain Res. 186, 232-237
- Jenden, D.J., Jope, R.S., Weiler, M.H. /1976/: Regulation acetylcholine synthesis: does cytoplasmic acetylcholine control high affinity choline uptake? Science, Vol. 194, 635-637
- Karnovsky, M.J. /1965/: A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell. Biol. 27, 1371-1381
- Kapfhammer, J., Bischoff, C. /1930/: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 191, 179.
- Katz, B., Miledi, R. /1975/: The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. J. Physiol. Lond. 224, 655.
- Kása, P. /1968/: Acetylcholinesterase transport in the central and peripheral nervous tissue: the role of tubulus in the enzyme transport. Nature, 218, 1265-1267

- Kása, P. /1971/: Ultrastructural localization of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in central and peripheral nervous tissue. In: Progress in brain Res., Ed.: Frankö, Elsevier, Amsterdam.
- Kása, P. /1975/: Histochemistry of choline acetyltransferase pp. 271-281. In: Cholinergic mechanisms. Ed.: Waser, P.G. Raven Press
- Kása, P., Csillik, B. /1966/: Electron microscopic localization of cholinesterase by a copper-lead-thiocholine technique. J. Neurochem. 13, 1345-1349
- Kása, P., Csillik, B. /1968/: Acetylcholinesterase synthesis in cholinergic neurons: electron histochemistry of enzyme translocation. Histochemie, 12, 175-183
- Kása, P., Mann, S.P., Hebb, C. /1970/: Localization of choline acetyltransferase. Nature, 226 : 5248, pp. 812-816
- Kása, P. et al. /1973/: Transport of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the rat sciatic nerve: a biochemical and electron histochemical study. J. Neurochem., 21, 431-436
- Kerkut, G. et al. /1965/: The presence of glutamate in nerve - muscle perfusates of Helix, Carcinus and Periplaneta. Comp. Biochem. Physiol. 15, 485-502
- Kerkut, G.A., Shapira, A., Walker, R.J. /1967/: The transport of ¹⁴C-labelled material from CNS to muscle along a nerve trunk. Comp. Biochem. Physiol. 23, 729-748
- Kiss, J. /1976/: A neuronális fehérjetranszport. Kandidátusi értekezés tézisei.
- Koelle, G.B., Friedenwald, J.S. /1949/: Histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70, 617-619
- Koelle, G.B. /1954/: The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. J. Comp. Neur., 100, 211-235

- Kopriwa, B.M. /1975/: A comparison of various procedures for fine grain development in electron microscopic radioautography. *Histochemistry* 44, 201-224
- Kuhar, M.J. et al. /1973/: Choline: selective accumulation by central cholinergic neurons. *J. Neurochem.* 20, 581-593
- Kuhar, M.J., Yamamura, H.J. /1976/: Localization of cholinergic muscarinic receptors in rat brain by light microscopic autoradiography. *Brain Res.*, 110, 229-243
- Ladinsky, H., Consolo, S., Peri, G., Garattini, S. /1973/: Increase in mouse and rat brain acetylcholine levels by diazepam. In: *The benzodiazepines*. Eds.: S. Garattini, E. Mussini, L.O. Randall, Raven Press, New York, pp. 241-242
- Lettre, H., Paweletz, N. /1966/: Probleme der electronmikroskopischen Autoradiographie. *Naturwiss.* 53, 268-271
- Levin, B.E. /1978/: Axonal transport of ^3H -proteins in a noradrenergic system of the rat brain. *Brain Res.*, 150, 213-232
- Lewis, P.R. /1961/: The effect of varying conditions in the Koelle technique. *Bibliotheca Anat.* 2, 11-20
- Lewis, P.R., Shute, C.C.D. /1967/: The cholinergic limbic system. Projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90, 521-540
- Lichtensteiger, W. /1966/: Uptake of norepinephrine in periglomerular cells of the olfactory bulb in the mouse. *Nature* 210, 955-956
- Lowry, O.H. et al. /1951/: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Luft, J.H. /1961/: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 404-414
- Lynch, G., Smith, R.L., Browning, M.D., Deadwyler, S. /1975/: Evidence for bidirectional dendritic transport of horseradish peroxidase. In: *Advances in neurology*, Vol. 12, Ed.: G.W. Kreutzberg, Raven Press.

- Makara, G.B., Gyévai, A., Rappay, Gy. /1976/: ^3H -GABA uptake and acetylcholinesterase activity in dissociated cultures of the medial hypothalamus. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 27, 191-197
- Marchbanks, R.M. /1968/: The uptake of ^{14}C -choline into synaptosomes in vitro. *Biochem. J.* 110, 533-541
- Margolis, R., Lajtha, A. /1968/: Ion dependence of amino acid uptake in brain slices. *Biochem. Biophys. Acta /Amst./* 163, 374-385
- Massarelli, R., Stefanovic, V., Mandel, P. /1976/: Cholinesterase activity and choline uptake in intact nerve cell cultures. *Brain Res.*, 112, 103-112
- McGeer, P.L., McGeer, E.G. /1976/: The GABA system and function of the basal ganglia: Huntington's disease. In: GABA in nervous system function. Eds.: E. Roberts, T.N. Chase, D.B. Tower, Raven Press
- McLennan, H. /1971/: The pharmacology of inhibition of mitral cells in the olfactory bulb. *Brain Res.*, 29, 177-181
- Mitchell, J.F. /1963/: The spontaneous release of acetylcholine from the cerebral cortex. *J. Physiol. Lond.* 165, 98-116
- Mulder, A.H., Yamamura, H.J., Kuhar, M.J., Snyder, S. /1974/: Release of acetylcholine from hippocampal slices by potassium depolarization: dependence on high affinity choline uptake. *Brain Res.*, 70, 372-376
- Murrin, L.C., Kuhar, M.J. /1976/: Activation of high affinity choline uptake in vitro by depolarizing agents. *Mol. Pharmacol.* 12, 1082-1090
- Nandy, K. /1965/: Histochemical study of the olfactory bulb in the rodent. *Ann. Histochem.* 10, 245-256
- Nagata, T., Nawa, T. /1966/: A modification of dry-mounting technique for radioautography of watersoluble compounds. *Histochemie*, 7, 370-371

- Nauta, W.J.H., Gyax, P.A. /1954/: Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technique. Stain Techn. 29, 91-93
- Nicoll, R.A. /1970,a/: GABA and dendro-dendritic inhibition in the olfactory bulb. Pharmacologist 12, 236
- Nicoll, R.A. /1970,b/: Identification of tufted cells in the olfactory bulb. Nature, 227, 623-625
- Nicoll, R.A. /1971/: Pharmacological evidence for GABA as the transmitter in granule cell inhibition in the olfactory bulb. Brain Res., 35, 137-149
- Ochi, J. /1963/: Olfactory bulb response to antidromic olfactory tract stimulation in the rabbit. Japan J. Physiol. 13, 113-118
- Ochs, S., Johnston, J. Ng, M-H. /1967/: Protein incorporation and axoplasmic flow in motoneuron fibres following intra-cord injection of labelled leucine. J. Neurochem. 14, 317-331
- Palkovits, M. et al. /1974/: Choline acetyltransferase content of limbic nuclei of the rat. Brain Res., 79, 443-450
- Pelham, R.W., Munsat, T.L. /1979/: Identification of direct competition for and indirect influences on striatal muscarinic cholinergic receptors: in vivo ³-H-quinuclidinyl benzilate binding in rats. Brain Res. 171, 437-480
- Polak, R.L., Molenaar, P.C., van Gelden, M. /1977/: Acetylcholine metabolism and choline uptake in cortical slices. J. Neurochem. 29, 477-485
- Popov, N., Pohle, W., Rösler, V., Matthies, H. /1967/: Regionale Verteilung von γ -Aminobuttersäure, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Dopamin, Noradrenalin und Serotonin in Rattenhirn. Acta Biol. Med. Germ. 18, 695-702
- Ribak, C.E. et al. /1977/: Glutamate decarboxylase localization in neurons of the olfactory bulb. Brain Res., 126, 1-18

- Roberts, E., Chase, T.N., Tower, D.B. /eds./: GABA in nervous system function. Raven Press, 1976.
- Robinson, B., Quinn, M.R. /1978/: Simple method for staining unmyelinated axons in rat olfactory bulb. Brain Res. Bull., 3, 563-566
- Rogers, A.W.: Techniques of autoradiography, Elsevier, 1973.
- Roskosky, R., Ryan, J., Diecke, F.J.P. /1974/: γ -aminobutyric acid synthesized in the olfactory nerve. Nature 251, 526-528
- Rossier, J. /1977/: Choline acetyltransferase: a review with special reference to its cellular and subcellular localization. In: Internat. review of neurology, Vol. 20, Ed.: J.R. Smythies, R.J. Bradley. Academic Press
- Rotter, A. et al. /1979,a/: Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of ^3H -propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. Brain Res. Rew., 1, 141-165
- Rotter, A., Field, P.M., Raisman, G. /1979,b/: Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. III. Postnatal development of binding of 3 -propylbenzilylcholine mustard. Brain Res. Rew. 1, 185-205
- Schubert, P., Kreutzberg, G.W., Lux, H.D. /1972/: Neuroplasmic transport in dendrites: effect of colchicine on morphology and physiology of motoneurons in the rat. Brain Res., 62, 331-343
- Shanthaveerappa, T.R., Bourne, G.H. /1965/: Histochemical studies on the olfactory glomeruli of squirrel monkey. Histochemie 5, 125-129
- Sharma, N.N. /1968/: Studies on the histochemical distribution of simple esterase and cholinesterases in the olfactory bulb of the rat. Acta Anat. /Basel/ 69, 168-175

- Shelton, D.L., Nadler, J.V., Cotman, C.W. /1979/: Development of high affinity choline uptake and associated acetylcholine synthesis in rat fascia dentata. *Brain Res.*, 163, 263-275
- Shepherd, G.M. /1972/: Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.*, 52, 864-917
- Shute, C.C.D., Lewis, P.R. /1963/: Cholinesterase containing systems of the brain of the rat. *Nature* 199, 1160-1164
- Shute, C.C.D., Lewis, P.R. /1967/: The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 90, 497-520
- Stavinoha, W.B. et al /1970/: Microwave radiation to inactive cholinesterase in the rat brain prior to analysis for acetylcholine. *Pharmacologist* 12, 316
- Streit, P., Knecht, E., Cuenod, M. /1979/: Transmitter specific retrograde labeling in the striato-nigral and raphe-nigral pathways. *Science* 205, 306-308
- Szepesy, G., Bánsághy, K., Kása, P. /1979/: Acetilcolin szintézis regulációja a központi idegrendszerben különböző hidrazin származékokkal. *Biokémiai Vándorgyűlés*, 1979. Szeged.
- Tucek, S. /1967/: Subcellular distribution of acetyl-CoA synthetase, ATP citrat lyase, citrate synthetase, choline acetyltransferase, fumarat hydrolase and lactate dehydrogenase in mammalian brain tissue. *J. Neurochem.* 14, 531-545
- Wallach, D.P. /1961/: Studies on GABA pathway. The inhibition of γ -aminobutyric acid - α - Ketoglutaric acid in vivo by U 7524 /amino-oxyacetyl-acid/. *Biochem. Pharmacol.* 5, 323-331
- Whittaker, V.P., Michaelson, I.A., Kirkland, R.J.A. /1964/: The separation of synaptic vesicles from nerve ending particles /synaptosomes/. *Biochem. J.*, 90, 293-305
- Whittaker, V.P. /1965/: The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 15, 39-91

- Vizi, S.E., Palkovits, M. /1978/: Acetylcholine content in different regions of the rat brain. Brain Res. Bull., 3, 93-96
- Weiss, P., Hiscoe, H.B. /1948/: Experiments on the mechanism of nerve growth. J. Exp. Zool., 107, 315-395
- Yamamoto, C., Yamamoto, T., Iwama, K. /1963/: The inhibitory system in the olfactory bulb studied by intracellular recording. J. Neurophysiol. 26, 403-415
- Yamamura, H., Snyder, S. /1973/: High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. J. Neurochem., 21, 1355-1374
- Yamamura, H., Kuhar, M.J., Snyder, S.H. /1974/: In vivo identification of muscarinic cholinergic receptor binding in rat brain. Brain Res., 80, 170-176
- Yamadori, T. /1977/: A simplified method for selective silver impregnation of degenerating axons and their terminals in the central nervous system. Kobe J. Med. Sci., 23, 1-5
- Young, W.S., Kuhar, M.J. /1979/: A new method for receptor autoradiography: ³H-opioid receptors in rat brain. Brain Res., 179, 255-270

