A SZINAPTIKUS APPARÁTUS VIZSGÁLATA A SZIMPATIKUS GANGLION KÜLÖNBÖZŐ MŰKÖDÉSI ÁLLAPOTAIBAN

Párdutz Árpád

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

JATE Elektronmikroszkóp Laboratórium

Szeged, 1970.

JATE KÖZPONTI KÖNYVTÁRA
Folyóiratok
Szeged

Diss. B 439

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED

Tartalomjegyzék

Bevezetés..... 1

A ganglion cervicale superius
morfológiája és fiziológiája..... 11

Vizsgálati anyag és módszer..... 25

Kisérleti eredmények..... 29

Az eredmények megbeszélése..... 5o

Tézisek..... 57

Irodalom..... 6o

Bevezetés

Az idegrendszer szerveződésében élettani valamint morfológiai szempontból egyaránt különleges jelentőségűek az idegingerület továbbitására specializált strukturák: a szinapszisok. Az egymással szorosabb kölcsönhatásban lévő idegsejtek ingerületi folyamatában lényeges szerepet játszó speciális helyek megjelölésére SHERRINGTON /1897/ használta először a szinapszis kifejezést. A szinapszis, azaz két egymással ingerületi kapcsolatban lévő sejt nyulványrendszerének érintkezési felületének és alkotóelemeinek strukturális vizsgálata a mult század közepétől kezdve egyre nagyobb mértékben került az érdeklődés előterébe. Az idegrendszer elemi felépitésére vonatkozó, a századfordulón Lenhossék és Apáthy között lezajlott nagy irodalmi vitát már RAMON Y CAJAL fénymikroszkópos vizsgálatai /1911/, majd később az elektronmikroszkópos kutatások egyértelmüen eldöntötték, amikor megállapitották, hogy a szinaptizáló membránokat jól definiált, un. szinaptikus rés választja el egymástól. Igy végül az idegrendszer elemi szerkezetére vonatkozó hosszas vita a contiguitás-elmélet győzelmével zárult.

Az élettani kutatások később az idegingerület áttevődésének mechanizmusára vonatkozóan kétféle lehetőséget fedtek fel:

1. A <u>kémiai</u> mediációval müködő szinapszisok esetében egy

specifikus mediátoranyag szabadul fel az idegingerület hatására a presszinaptikus axoplazmából, átdiffundál a 2oo-3oo Å széles szinaptikus résen, miközben megváltoztatja a postszinaptikus membrán permeabilitási viszonyait ugy, hogy azon vagy depolarizációt / ingerlő hatás / vagy hyperpolarizációt / gátló hatás / vált ki. Ha a depolarizáció egy bizonyos küszöbértéket elér, tovahaladó "spike" potenciál keletkezik a postszinaptikus membránon. Az ingerületáttevődés polarizált jellegü, tehát az áttevődés is csak egyirányu.

2. Az <u>elektromos</u> szinapszisok esetében a presszinaptikus impulzus közvetlenül depolarizálja a postszinaptikus neuront. Az elektrofiziológiai módszerek szerint elektromos áttevődéssel müködő szinapszisok: aranyhal Mauthner-sejtjeinek laterális dendritjén végződő golf-ütő szinapszisok / ROBERTSON 1963 /, csirke ganglion ciliarejának kehelyszinapszisai / De LORENZO 1966 /, ill. csirke nucleus vestibularis tangentialisának szinapszisai / HINOJOSA 1967 / elektronmikroszkóppal történő vizsgálata során, a rutin technika alkalmazása mellett sikerült valódi membránfuziót találni, melyek az un. "tight-junction"-ok formájában jelentek meg. ROBERTSON ezen adatai jó összhangban látszottak lenni az elektrofiziológiai módszerekkel kapott adatokkal. Egy uj preparálási eljárással azonban, nevezetesen az aldehyd-rögzités után és a dehydrálás előtt alkalmazott uranil-acetát kezelés hatására az elektromos szinapszisokban

is sikerült az érintkező membránok között egy 2o-3o Å vasteg rést feltüntetni / BRIGHTMAN és REESE 1969/. Ez azt jelenti, hogy ezeken a helyeken nincs valódi membránfuzió, hanem a sejtkapcsolódás un. "gap-junction" tipusu. Ez az észlelés ugyan egy sor, jelenleg megmagyarázhatatlan problémát vet fel, mégis aláhuzza a contiguitás elvének általános voltát.

Mivel a kémiai mediációval működő szinapszisok sokkal gyakoribbak az idegrendszerben, mint az elektromos szinapszisik, érthető, hogy az irodalomban nagy számban találhatók a transzmitterek anyagi természetére, hatásaira vonatkozó közlemények. PATON /1958/, CURTIS /1961/ és McLENNAN /1963/ postulátumai szerint ahhoz, hogy egy anyagról kimondhassuk, hogy transzmitter szerepet tölt be az idegrendszerben, az alábbi kritériumoknak kell megfelelnie:

1. Megtalálható legyen a preszinaptikus végződésben.

2. Ugyanitt legyen jelen a szintetizáló enzimrendszere.

3. A preszinaptikus rost ingerlésére, az ingerléssel arányos mennyiségben kell felszabadulnia.

4. A vegyület mikroelektroforetikusan bejuttatva a postszinaptikus sejten a szinaptikus aktivitásnak megfelelő hatést okozzon.

5. Jelen legyen az inaktiváló enzim.

Az idegrendszerben jelenlévő farmakológiailag aktiv anyagok / acetilkolin /ACh/, γ-amino vajsav /GABA/, norad-

renalin, 5-hydroxy-triptamin, dopamin, hisztamin, glutaminsav/ közül ezen kritériumoknak maradéktalanul csupán az acetilkolin tesz eleget a vegetativ ganglionok és a neuromusculáris junctio esetében, míg a noradrenalin és a GABA csak nagy valószinüséggel tekinthető transzmitternek.

A fénymikroszkóppal végzett klasszikus morfológiai vizsgálatok az idegrendszerben rendkivül sok és változatos formáju szinapszist mutattak ki. Szerkezetükre vonatkozóan az ismert impregnálási és festési technikák segitségével csupán a neurofibrillumok és mitokondriumok kimutatása valamint a pre- és postszinaptikus cytoplazma eltérő festődésének észlelése sikerült. Az elektronmikroszkópos technika az 1950-es évek elejétől kezdve lehetővé tette az ultravékony metszetek vizsgálatát és ebből eredően a szinapszis ultrastrukturájára vonatkozó ismereteink is lényegesen bővültek. SJÖSTRAND /1953/, PALADE /1954/ és PALAY /1956/ valamint De ROBERTIS vizsgálatai uttörő jelentőségüek és ezek alapján ismertetjük azokat az általános morfológiai sajátságokat, melyek a nagy változatosság ellenére valamennyi szinapszisra jellemzőek.

A pre- és postszinaptikus terminált egy 200-300 Å széles rés az un. szinaptikus rés választja el egymástól, melyben bizonyos szinapszisokban un. interszinaptikus filamentumokat találtak / De ROBERTIS et al; 1961 és van der LOOS 1962/ A szinaptikus membránok az ismert kb. 75 Å-nél vastagabbak

és főleg a postszinaptikus membrán megvastagodása, elektronelnyelőképességének növekedése jellemző. A preszinaptikus végződésben találjuk a már fénymikroszkóppal is kimutatott mitokondriumok mellett az un. szinaptikus vesiculákat. Ezek a különböző méretü és alaku hólyagok konzekvensen jelentkeznek és a preszinaptikus terminál legjellemzőbb cytoplazmatikus organellumainak tekinthetők. Az elektronmikroszkópos feldolgozás során történő megjelenésük alapján két tipusuk különböztethető meg: a közönséges, kb. 4oo Å átmérőjü, üres vagy sima /clear/ vesiculák és a belsejükben elektronszóró anyagot tartalmazó un. dense-core vesiculák. A clear vesiculákat már kezdettől fogva igyekeztek valamilyen módon kapcsolatba hozni az átvivő anyaggal, nevezetesen az acetilkolinnnal. Ezt az elképzelést támasztja alá az az észlelés, hogy az átvivő anyag felszabadulása nem folytonos, hanem kvantumszerü, többezer molekulás egységekben történik / FATT és KATZ 1952 /. Valószinü az a feltételezés, hogy a szinaptikus vesiculák tartalmaznak egy ilyen kvantumot. Másrészről differenciál-centrifugálással izolált szinaptikus vesicula frakciókat analizálva, azokban acetilkolin volt kimutatható / De ROBERTIS et al. 1962 /. A közvetett bizonyitékok ellen látszik szólni CSILLIK és JOÓ 1967-es adata, miszerint patkány nucleus caudatusban az acetilkolin szintet 9o%-al csökkentő HC-3 kezelés után a szinaptikus vesiculák számában nem tapasztaltak csökkenést és ennek alapján felvetették annak a lehetőségét, hogy a

transzmitter nem magukban a vesiculákban található, hanem mint passziv hordozón csupán azok külső felületéhez kapcsolódik.

A "dense-core" vesiculatipusokat nagyság szerint osztályozzuk:

a./ kb. 400 Å átmérőjü, az adrenerg terminálisokban kimutatott vesiculák, melyekről bebizonyosodott, hogy noradrenalint tartalmaznak / HÖKFELT 1967a,b /

b./ 800-900 Å átmérőjü, főleg a szimpatikus ganglionok preszinaptikus termináljában, simaizom neuromusculáris junctiójában, hypothalamusban és az idegrendszer egyéb helyein a közönséges vesiculákkal együtt előforduló és tartalmát tekintve ismeretlen csoport.

c./ kb. 1500 Å átmérőjü, a neurohypophysis neurosecretoros végződéseinek vasopressin és oxitocyn tartalmu vesiculái.

A közönséges /clear/ vesiculák és a velük összefüggésbe hozott acetilkolin kapcsolatára vonatkozó kisérleteket már ismertettük.

Ujabban aldehyd-, és OsO_4 kettős fixálás után ezt az egységes csoportot sikerült tovább osztani. Ilyen fixálás alkalmazásával ugyanis a 300-400 Å átmérőjü kerek vesiculák mellett kisebb méretü ovoid formák is felismerhetők / UCHIZONO 1965 /. Több szerző ezeket a gátló szinapszisok mor-

fológiai jellemzőjének tartja és LARRAMENDI, FICKENSCHER és LEMKEY-JOHNSTON /1967/ valamint HALÁSZ és CSILLIK /1969/ vizsgálatai szerint az ovoid és szferoid vesiculák előfordulási aránya jellemző a kisagy egyes ingerlő ill. gátló funkcióju szinapszisára, de az ovoid vesiculák önmagukban nem jelzik az inhibitorikus működésü szinapszisokat.

A szinapszisok működésére vonatkozó előbb felvázolt és nagyrészt hipotetikus ismereteink bővülését nagyban elősegitették azok a vizsgálatok, melyek az ismertetett alkotórészek, főleg a szinaptikus vesiculák funkcionális szerepét igyekeztek tisztázni. Ezek lényege az, hogy különböző ingerekkel /elektromos, fény, kémiai/ morfológiai változásokat igyekeznek létrehozni a szinapszisokban. De ROBERTIS és FRANCHI /1956/ albino nyul retinájának szinapszisait vizsgálta sötétadaptáció során. 24 óra mulva a szinaptikus vesiculák bizonyos akkumulációját figyelték meg a szinaptikus membrán aktiv helyeinél, mig 9 nap mulva a vesiculák átmérőjének csökkenését találták. Más vizsgálatokban / De ROBERTIS és FERREIRA 1957 / kisérletet végeztek a mellékvese kromaffin sejtjeivel szinaptizáló nervus splanchnicus rostok ingerlésével is. Ebben az esetben az ingerléskor a mellékvesében felszabaduló katecholamin mennyiségét mérve következtettek az áttevődés mértékére. 1o perces 1oo/sec. frekvenciáju ingerlés után a preszinaptikus terminálokban a szinaptikus vesiculák száma megnőtt, a szinaptikus membrán

denzitása fokozódott és több vesiculának a membránokhoz való kapcsolódását észlelték. Ez a frekvencia volt egyébként a legoptimálisabb a katecholamin-felszabadulásra. 400/sec frekvencia hatására a katecholamin- mennyiség jelentősen kisebb, ugyanakkor a szinaptikus vesiculák számában is lényeges csökkenést tapasztaltak. Leirják, de kevésbé tartják jelentősnek a mitokondriumok károsodását. Az eredmények azt jelzik, hogy a szinaptikus vesiculák szerepet játszanak az idegi impulzus átvitelében és, hogy egyensuly áll fenn a vesiculák keletkezése és kiürülése között. HUBBARD és KWANBUNBUMPEN /1968/ a transzmitter vesiculáris raktározódását felvető hipotézist támogató eredményre jutott patkány rekeszizom neuromusculáris junctión végzett kísérleteiben, amikor is az izmot különböző ionösszetételü, a szinaptikus aktivitásra hatást gyakoroló közegbe juttatva jelentős változásokat észlelt a szinaptikus vesiculák eloszlásában. DYACHKOWA, HÁMORI és FEDINA /1967/ a ganglion ciliare szinapszisait vizsgálták a nervus oculomotorius elektromos ingerlése után és szintén jelentős változásokat tapasztaltak. A szinaptikus vesiculák átmérője és száma egyaránt növekedett, a szinaptikus membrán strukturájában is figyeltek meg változást, postszinaptikusan pedig a sejtek cytoplazmájában az endoplazmatikus retikulumhoz kötött és a szabadon előforduló riboszómák felszaporodását észlelték. Az emlitett kisérletek rámutattak arra, hogy a funkcionális

állapot változása eltéréseket idéz elő a szinapszis ultrastrukturájában, főleg a szinaptikus vesiculák vonatkozásában. Ezen adatok értékelésénél feltétlenül figyelembe kell venni, hogy az idézett szerzők a szinapszisok fiziológiai állapotát csak közvetett uton kisérték figyelemmel. Ilyen szempontból legegzaktabb De ROBERTIS és FERREIRA /1957/ kisérlete, bár az általuk használt 100-400/sec frekvencia a fiziológiástól elég távolinak tünik.

A fentebb vázolt funkcionális morfológiai problémák megközelitésére igen alkalmasnak látszik a macska felső nyaki szimpatikus ganglionja, mivel preganglionáris elektromos ingerlés mellett a szinaptikus áttevődés mértéke, a szinapszisok állapota a pislogóhártya összehuzódás illetve a ganglionról elvezetett akciópotenciál regisztrálásával jól figyelemmel kisérhető. Ugyanakkor a már régebben kidolgozott izolált perfuziós módszer segitségével különböző farmakológiailag aktiv anyag hatását is egyidejüleg tudjuk tanulmányozni / KIBJAKOV 1933 /.

Célunk az volt, hogy a szinaptikus kapcsolatai szempontjából viszonylag egyszerü strukturán, jól meghatározott kisérleti körülmények között olyan összefüggéseket keressünk, melyek a végződések szubmikroszkópos morfológiája és azok funkcionális állapota között állnak fenn. Megvizsgáltuk, hogy azok a hatások, melyek neurofiziológiai módszerekkel regisztrálhatóan a ganglion acetilkolin raktárát kiüritik

illetve annak ujraszintetizálódását megakadályozva az ingerületáttevődés blokkját idézik elő, milyen finomszerkezeti változásokat okoznak a szinapszisok alkotóelemeiben.

Értekezésünkben célkitüzéseinknek megfelelően a következő kérdésekre kivántunk feleletet kapni:

1. Élettani körülmények között, azaz természetes vérellátás mellett elektromosan ingerelve kimeríthető-e a ganglionáris transzmisszió és a hosszantartó ingerlés milyen finomszerkezeti változásokat idéz elő?
2. A ducokat kolin-mentes Locke-oldattal izoláltan perfundálva kimutatható-e szubmikroszkópos szinten a ganglion acetilkolin anyagcseréjében bekövetkező és az áttevőképességet csökkentő zavar?
3. A kolin-transzport specifikus bénitója a HC-3, mely az átvivőanyag raktárainak ingerléssel való kimeritését teszi lehetővé, okoz-e eltérést a szinapszisok alkotórészeinek finomszerkezeti képében?
4. A ganglionáris transzmisszió megszünését kisérő finomszerkezeti eltérések kivédhetők-e valamilyen anyaggal?

A ganglion cervicale superius morfológiája és fiziológiája.

/ Irodalmi áttekintés /

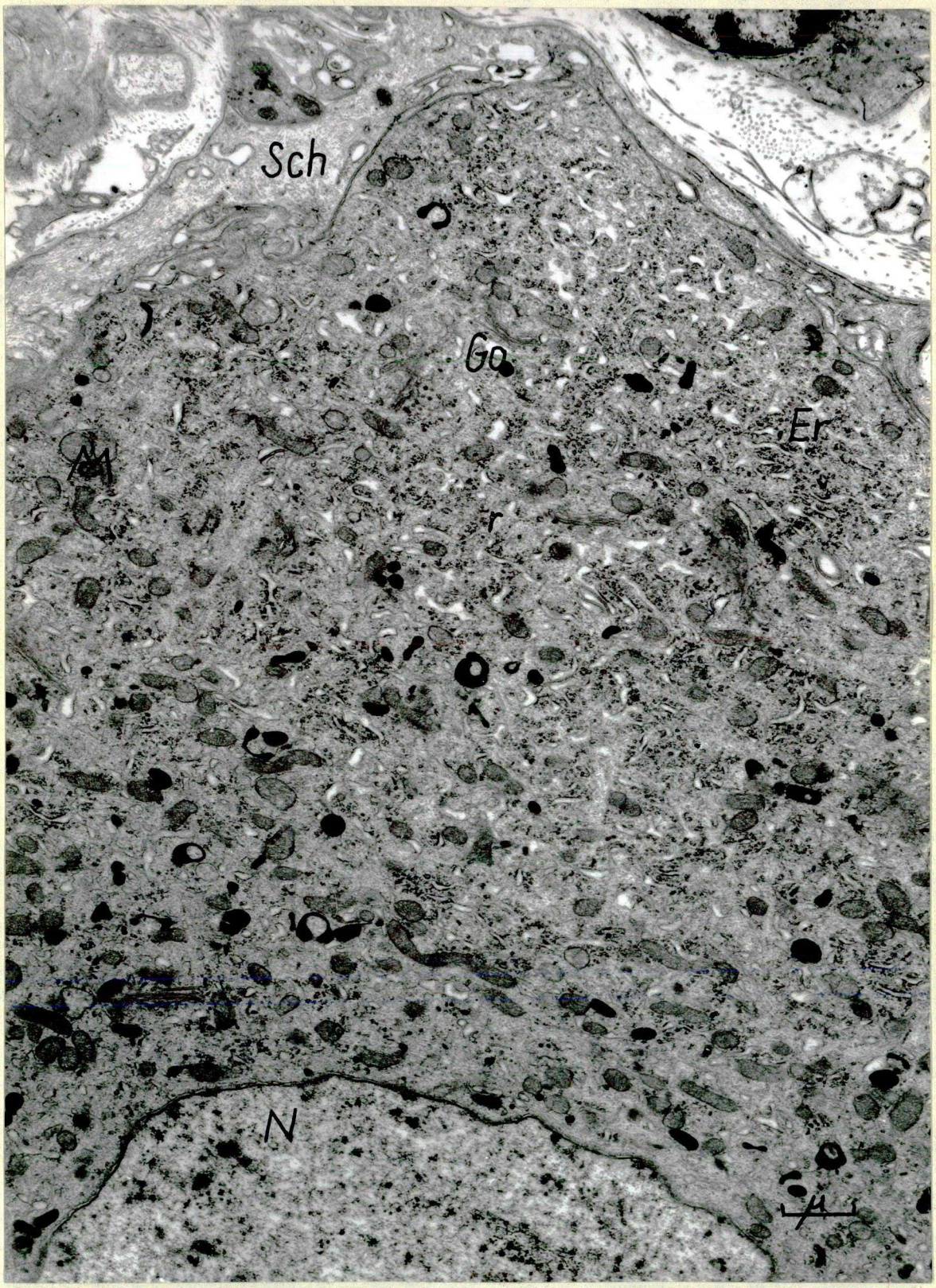
Macskákon az arteria carotis communis elágazásánál találjuk a kötőszöveti tokba ágyazott ganglion cervicale superiust a ganglion nodosummal együtt. A preganglionáris rostokat adó szimpatikus köteg az arteria subclavia magasságától a nervus vagussal együtt haladva alkotja az un. vagoszimpatikus köteget. A két rostrendszer nem keveredik egymással és jól megkülönböztethető a vékonyabb tr. sympathicus és a vastagabb nervus vagus, habár ducaik nagyon közel vannak egyméshoz. A szinte egynek tünő két duc közül a lateralisabban fekvő a ganglion nodosum vagi, a medialis és kissé szürkébb szinü pedig a ganglion cervicale superius. A felső nyaki szimpatikus ganglion postganglionáris rostjai a fej nagyrészét, többek között a musculus dilatator pupillae-t és a pislogóhártyát is beidegzik.

A ganglionsejtek, mint az emlősöknél általában multipolárisak, 15-50 μ átmérőjüek, cytoplazmájuk sejtorganellumokkal zsufoltan kitöltött. Nagyszámu cristás tipusu mitokondrium található bennük és kiterjedt endoplazmatikus retikulumhálózat, melyhez riboszómák kapcsolódnak. A riboszómák egyébként a plazmában szabadon, rozettás formában is gyakran előfordulnak. A Golgi-apparátus más szöve-

tek sejtjeivel azonos, tipusos megjelenésü. A kettős maghártyával határolt magplazma világos, kromatinállománya finoman eloszlott. Az elektronmikroszkópos felvételen jól látható az egész ganglionsejtet kapszulaként beborító Schwann-sejt cytoplazmája. /1. ábra/ A Schwann-sejtek nyulvány-rendszere az idegsejtek és azok nyulványaitól élesen megkülönböztethetők, mivel azo előbbiek világosabb megjelenésüek és rendszerint igen vékonyak, csupán a sejtmag közelében szélesednek ki. Ezekben a kiszélesedett régiókban található a jellegzetes sejtalkotórészek /mitokondrium, Golgi-zóna stb./ többsége is. Igen gyakran, mint az a 2. ábrán látható, a perikaryont borító Schwann-hüvelyben vékony rostok is futnak, melyek feltehetően preganglionáris eredetüek.

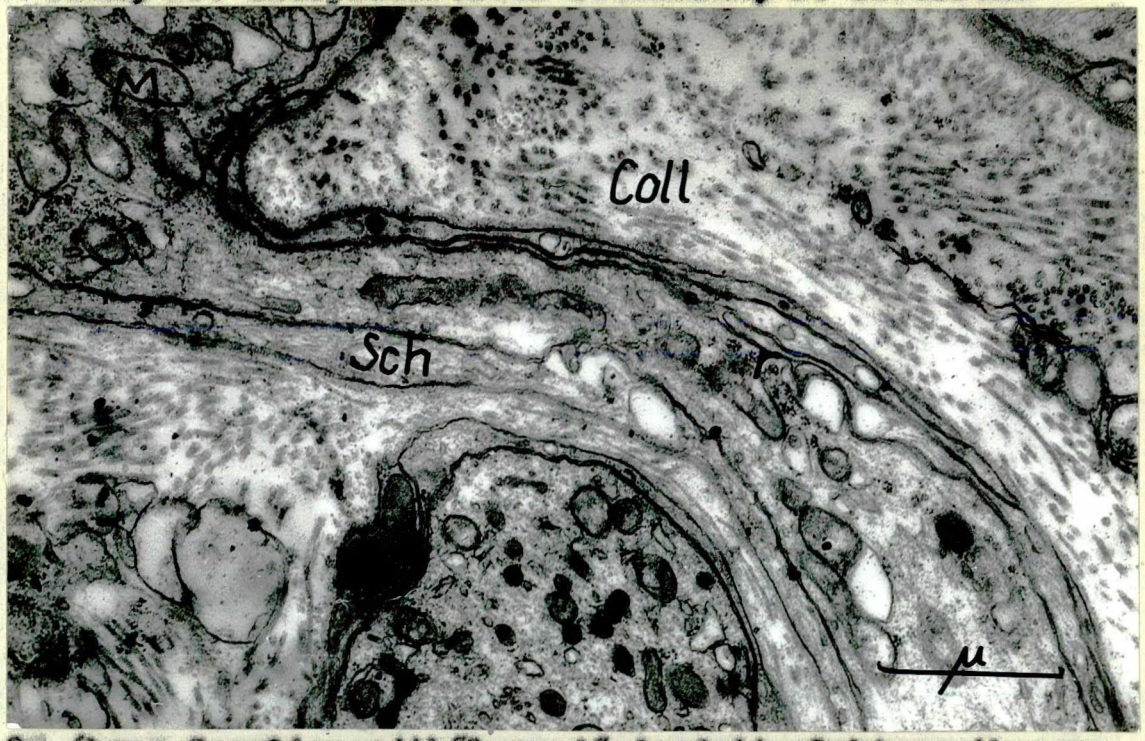
Az axon és dendrit közötti különbségtétel nehézségei miatt a ganglionsejt esetében általában csupán sejtnyulványokról beszélhetünk. Ezek a nyulványok az elektronmikroszkópos képeken távolabb nagyon ritkán követhetők, de a 3. ábra alapján megállapitható, hogy a sejtet borító Schwann-hüvely magukra a nyulványokra is ráterjed./ELFVIN 1963a /

A kollagén rostokkal gazdagon kitöltött sejtközötti térben kötegszerü elrendezésben futnak a különböző nyulványok / 4. ábra /. Ezek eredetük szerint preganglionáris rostok, ganglionsejtek dendritjei és a ganglionból



1. ábra. Ganglionsejt-részlet macska ganglion cervicale superiusából. N: nucleus, M: mitokondrium, G: Golgi apparátus, Er: endoplazmatikus retikulum, r: riboszóma Sch: Schwann-sejt

2. ábra. Ganglionsejt-részlet a sejttestet beborító szatellitasejtben futó idegrostokkal /nyíl/. M: mitokondrium, Er: endoplazmatikus retikulum, r: riboszóma

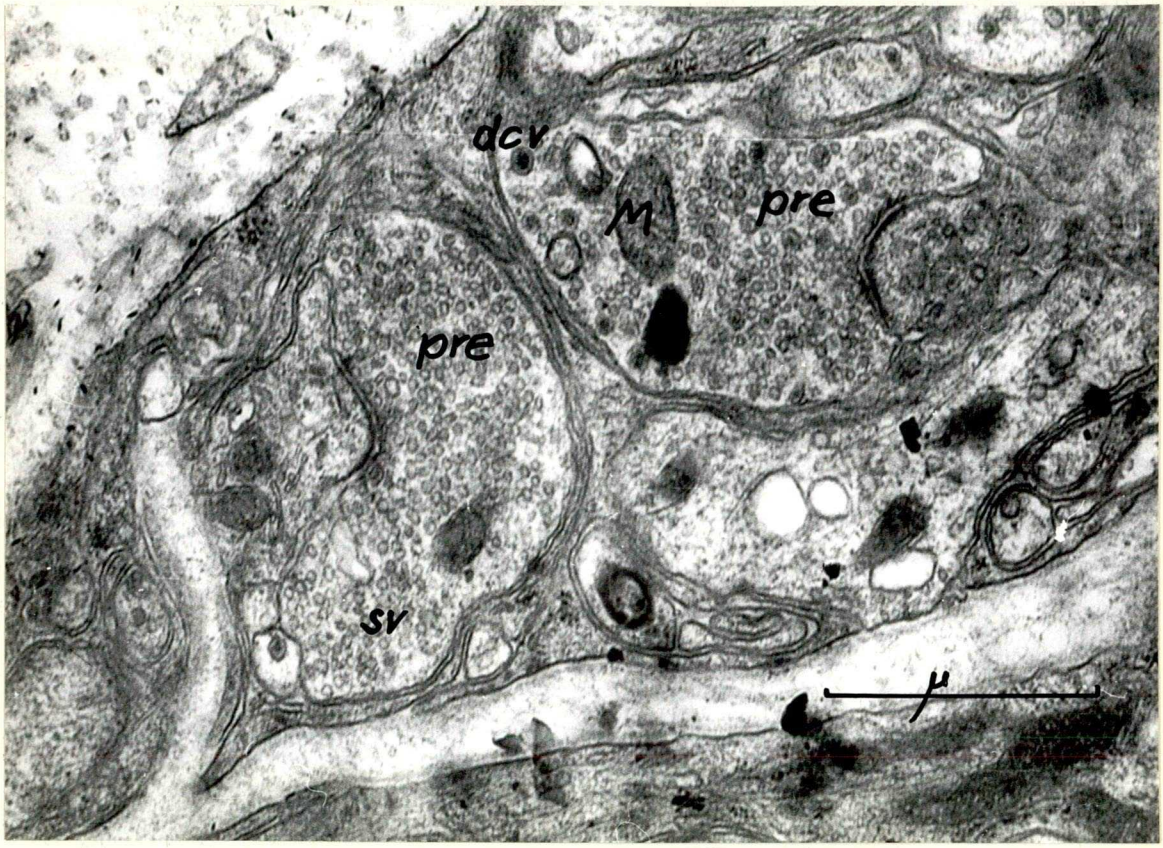


3. ábra. Ganglionsejtből eredő dendrit elektronmikroszkópos képe. M: mitokondrium, r: riboszóma, coll: kollagén rostok, Sch: Schwann-sejt

4. ábra. Schwann-sejt cytoplazmájában futó idegrostok. N: nucleus, nyil: mezaxon ill. mezodendrit, coll: kollagén rostok

kilépő postganglionáris rostok. A dendritnyulványok és a preganglionáris rostok myelinhüvelyeiket már elvesztett terminális részei Schwann-hüvelyben futnak. Egyetlen Schwann-sejt rendszerint számos különböző eredetü dendritet ill. axont borit be. A 4. ábrán két ilyen nyulványköteget látunk. Csupán a rostok morfológiai megjelenése alapján - amennyiben szinaptikus kontaktust nem létesitenek - nem dönthető el eredetük. A képen jól láthatók a Schwann-sejtek felszini membránbefüződéseivel létrejövő mezaxonok ill. mezodendritek.

A macska felső nyaki szimpatikus ganglionjának szinaptikus viszonyaira jellemző, hogy a belépő preganglionáris rostok myelinhüvelyeik elvesztése után elágazva több ganglionsejttel létesitenek szinaptikus kapcsolatot. Ezek a kapcsolatok csaknem kizárólag axodendritikusak, axoszomatikus rendkivül ritkán fordul elő / ELFVIN 1963b és DYACHKOWA 1968 /. Egy preszinaptikus rost több, vele közös Schwann-burokban futó dendrittel létesit szinaptikus kontaktust. Lefutásában vékonyabb, nem szinaptizáló, csak neurofilamentumokat és neurotubulusokat tartalmazó szakaszok váltakoznak kiszélesedő részekkel, ahol mitokondriumok és különböző tipusu vesiculák akkumulációja figyelhető meg. Itt az axonális és dendritikus eredetü membrán direkt kontaktusba kerül, és az ismert, a szinapszisra jellemző morfológiai differentáció is megfigyelhető.



5. ábra. Axodendritikus szinapszisok macska ganglion cervicale superiusából. A preszinaptikus terminál /pre/ vesiculákkal kitöltött. M: mitokondrium, sv: szinaptikus vesicula, dcv: dense core vesicula

A macska ganglion cervicale superius jellegzete szinapszistipusát az 5. ábra mutatja be. A preszinaptikus terminál szinaptikus vesiculákkal zsufoltan kitöltött, melyek az un. üres. "clear" tipusba tartoznak, átmérőjük 3oo-6oo Å, de esetenként megfigyelhetők nagyobb, 7oo-1ooo Å nagyságu un. "dense-core" vesiculák is. A szinaptikus apparátus jellegzetes alkotórészei közül a mitokondriumok is megtalálhatók csaknem minden terminálban. A mitokondriumok a cristás tipusba tartoznak. A postszinapti-

kus membránvastagodás mellett gyakran egy kevésbé kifejezett preszinaptikus membránvastagodást is megfigyeltünk. A membránok ilyen megnövekedett osmiophiliája legtöbbször nem az egész érintkező felületen, csupán annak egy vagy több meghatározott helyén észlelhető.

A macska ganglion cervicale superiusának működésére vonatkozó adataink igen gazdagok és tulajdonképpen az interneuronális ingerületáttevődésre vonatkozó ismereteink tekintélyes része is ezen objektum vizsgálatából ered. KIBJAKOV / 1933 / volt az, aki az általa kidolgozott izolált perfuziós módszer segitségével kimutatta, hogy a preganglionáris ingerlés mellett elfolyó perfuzátum nyugvó ganglion érpályájába visszajuttatva ganglionizgató hatásu. A perfuzátumban ilyenkor jelenlévő hatékony anyag - amint azt egész sor kisérlettel bizonyitották - acetilkolin. A postganglionáris rostok ingerlése az acetilkolin felszabadulására teljesen hatástalan, tehát az csak preganglionáris ingerlésre jelenik meg. Több kisérletben meghatározták a perfundált és ingerelt ganglionból felszabaduló acetilkolin mennyiségét és azt a pislogóhártya összehuzódás mértékével minden esetben párhuzamosnak találták. Ezek alapján megállapitották, hogy az acetilkolin felszabadulása a ganglion cervicale superiusban a szinaptikus áttevődés oki tényezője, tehát a transzmisszió kolinerg. Az is világosan kimutatható volt, hogy a gang-

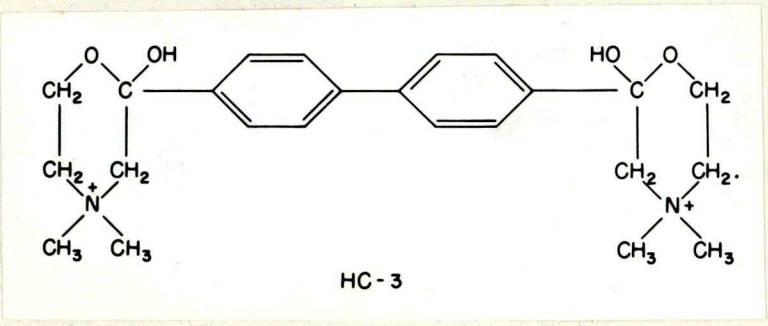
lionból kivonható és ingerlésre belőle felszabaduló acetilkolin mennyisége nem egyezik meg, a felszabaduló mennyiség többszöröse a kivonhatónak, tehát a ganglionban acetilkolin szintézisnek kell folynia. Az erre vonatkozó vizsgálatokat BIRKS és MACINTOSH / 1957, 1961 / végezték, amikor mérték az acetilkolin tartalmat és az acetilkolin felszabadulást nyugalmi állapotban és hosszantartó ingerlés mellett. Az anyagcsere lépéseinek elemzése céljából különböző gátlószerek segitségével esetenként HC-3-al gátolták az acetilkolin szintézist ill. eserinnel az acetilkolineszteráz müködését.

Az acetilkolin bioszintézisére vonatkozó adataink is ujabb keletüek. BROWN és FELDBERG / 1936 / vizsgálataiból ismeretes, hogy extracelluláris kolin és glükóz kell ezen szintézis zavartalan lefolyásához. Azóta bebizonyitották / KORKES 1952; MARCHBANKS 1968, 1969 /, hogy a szintézis végső soron a következő egyszerü sémára vezethető vissza:

$$AcCoA + Ch \longrightarrow ACh + CoA$$

A szintézist katalizáló enzim a kolin-acetiláz / kolin-acetát-transzferáz / az idegrendszerben sok helyen kimutatható, pontos lokalizációjáról azonban igen keveset tudunk. A ganglion cervicale superius preganglionáris idegét átvágva az enzim pár nap mulva eltünik a distális szakaszból, mig a metszés helye felett mennyiségé-

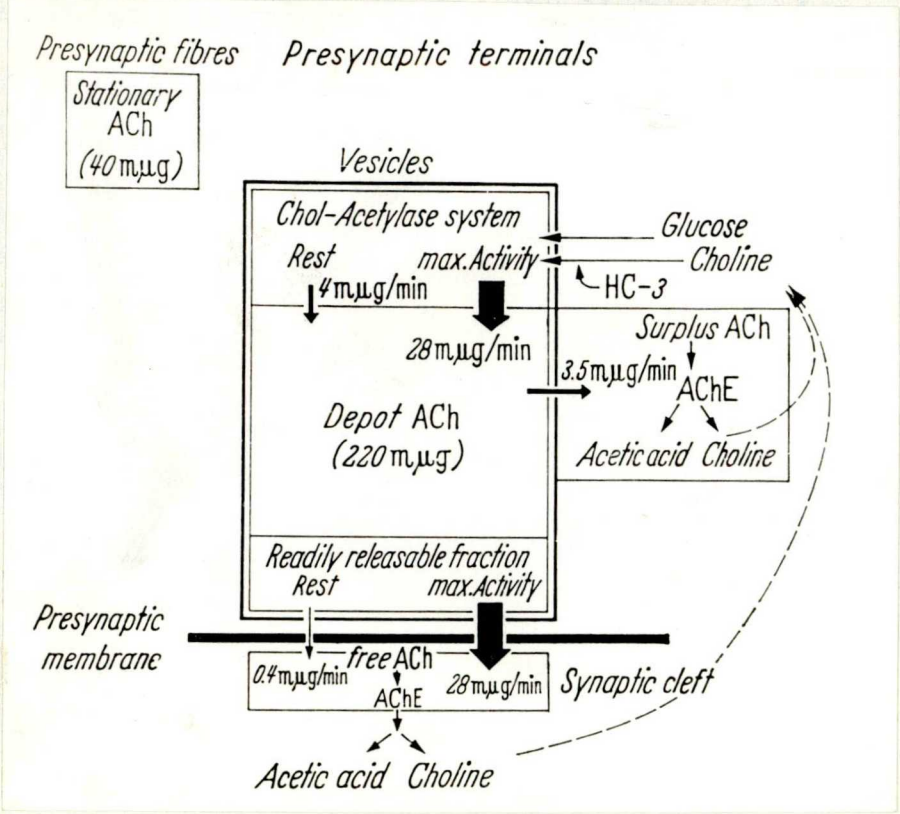
nek átmeneti növekedése mutatható ki. Ugy tünik tehát, hogy az acetilkolin szintézisében szerepet játszó enzim az idegsejtben keletkezik és az axonon keresztül jut a végződésbe. Az acetilkolin szintézis specifikus gátlószere egy hemikolinium fajta a HC-3.



6. ábra. A HC-3 szerkezeti képlete

A HC-3 szelektiv gátló hatását a membránon keresztül történő kolin transzport kompetitiv gátlásának tulajdonitják / LONG és SCHUELER 1954; MACINTOSH et. al. 1956, 1958; MACINTOSH 1961 /.

A 7. ábra BIRKS és MACINTOSH / 1961 / nyomán a ganglion cervicale superius acetilkolin metabolizmusának vázlatos áttakintését mutatja. A macska felső nyaki szimpatikus ganglionjának acetilkolin tartalma 3 elkülönithető részben található. Van egy kb 4o mμg acetilkolin mennyiség, amely a preganglionáris rost hosszantartó ingerlésével sem ürithető ki, ha a reszintézist HC-3-al blokkoljuk és ez a mennyiség a ganglion acetilkolineszteráza számára is hozzáférhetetlen. Ez az un. állandó-acetilkolin



7. ábra. Macska ganglion cervicale superius acetilkolin anyagcseréjének vázlata Birks és MacIntosh /1961/ nyomán. Részletes leirás a szövegben.

/ stationary-ACh / valamilyen extraszinaptikus régióban, feltehetően a ducban futó preganglionáris rostokban található. A fennmaradó és kivonható acetilkolin mennyiség két, egymással diffuziós kapcsolatban lévő egységben található magukban a terminálokban. Preszinaptikus ingerlés a raktározott acetilkolinból szabaditja fel a transzmittert / depot-ACh /. Ennek mennyisége 22o mμg és a szinaptikus vesiculákhoz kötött, a harmadik frakció pedig / surplus-ACh/ a terminálok extra-vesiculáris terében ta-

lálható, az acetilkolineszteráz hatásának kitéve. Ez az acetilkolin mennyiség sem szabadítható fel ingerlésre. Az előbb említett kolin-acetiláz rendszer feltételezhetően a depot-ACh-t tartalmazó részben, talán a szinaptikus vesiculákban működik. Nyugalmi állapotban a szintézis kb. 4 mμg/perc sebességgel folyik. A szintetizált mennyiségnek csupán 10%-a / 0,4 mμg/perc / mutatható ki az elfolyó perfuzátumban, a fennmaradó kb. 3,6 mμg/perc diffuzió utján a surplus-ACh-t tartalmazó extravesiculáris térbe kerül, ahol a jelenlévő acetilkolineszteráz hidrolizálja. A ganglion preszinaptikus ingerekkel történő aktiválása két szembetünő változást okoz. Jelentősen növekedik a felszabaduló acetilkolin mennyisége és optimális körülmények között eléri ill. hosszabb időn keresztül tartja a 28 mμg/perc mennyiséget. Ezzel párhuzamosan fokozódik az acetilkolin szintézis gyorsasága is amely szintén 28 mμg/perc szintet ér el. Ezek alapján könnyen érthetővé válik, hogy a ganglion kedvező körülmények között / természetes vérellátás ill. plazmával történő perfuzió / gyakorlatilag kimeríthetetlen. Természetesen az acetilkolin szintéziséhez szükséges a folyamatos kolin ellátás, amely a vérplazmában fiziológiás koncentrációban jelen van, de Locke-oldattal történő perfuzió esetén erről külön kell gondoskodnunk.

Kolinnak a ganglionáris acetilkolin szintézisben játszott szerepét izotópos módszerrel direkt uton is bebizonyitották / FRIESEN et al. 1965; COLLIER és LANG 1969 /. A perfuzióval bevitt kolinklorid / metil-csoportban ^{3}H-al jelzett / radioaktivitása az acetilkolin frakcióban jelentkezett. Az utóbbi szerzők hivták fel a figyelmet arra, hogy a kolin, mint prekurzor fontos lehet egyéb, a ganglionáris anyagcserében szerepet játszó anyag szintézisében is. Ezek közül a legfontosabbak a foszforilkolin és a kolin tartalmu foszfolipidek. Kisérleteikben kolin beépülését figyelték az emlitett frakciókba és ugy találták, hogy az egyenletes sebességgel történik, és ezt a sebességet az acetilkolin szintézistől eltérően a preganglionáris ingerlés egyáltalán nem fokozza. Szintén rendkivül figyelemreméltó, hogy HC-3 adására a foszforilkolin és foszfolipid frakciókba a jelzett kolin beépülése folytatódott, mig az acetilkolin szintézis gyakorlatilag leállt. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az idegszövetben a foszfolipidek szintézise olyan mechanizmuson keresztül játszódik le, amely nem függ a HC-3 érzékeny kolin-transzportáló rendszertől. Érdekesek azok a számitások, melyet a szerzők a foszfolipid és foszforilkolin anyagcserével kapcsolatban végeztek. Megállapitják, hogy ezen anyagok folyamatos elbomlásakor keletkező kolin mennyisége elegendő egy kisebb mértékü acetilkolin szin-

tézis folyamatos biztositásához.

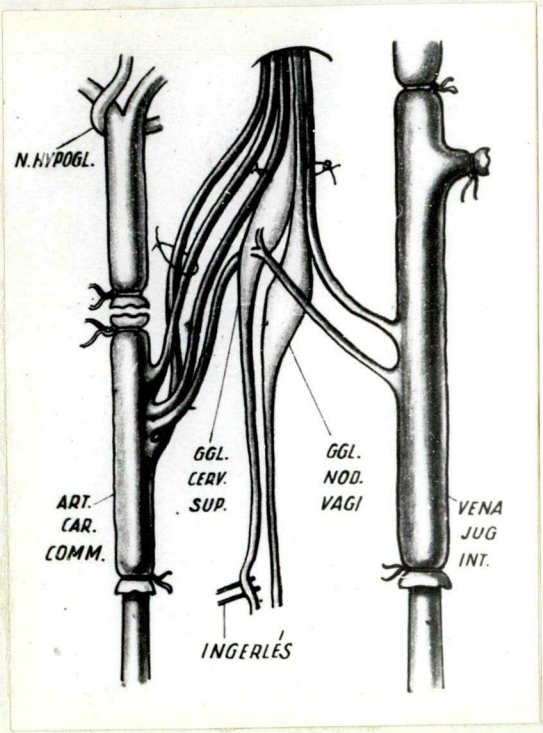
COLLIER és MACINTOSH / 1969 / kimutatták, hogy a ganglionban preganglionáris ingerlésre fokozott mértékü acetilkolin szintézist ill. a kolin beépülést a ganglionáris áttevődés blokkolójaként ismert hexamethonium még 100 g/ml koncentrációban sem gátolja, szemben a HC-3 korábban már emlitett ilyen hatásával. A szerzők mérései szerint 1 órás ingerlés mellett a ganglion acetilkolin tartalmának 85%-a lesz jelzett, ami összeegyeztethető más szerzők adataival / BIRKS és MACINTOSH 1961 /, melyek szerint a ganglionból ingerléssel eltávolitható transzmitter tartalom az eredeti készlet kb. 85%-a.

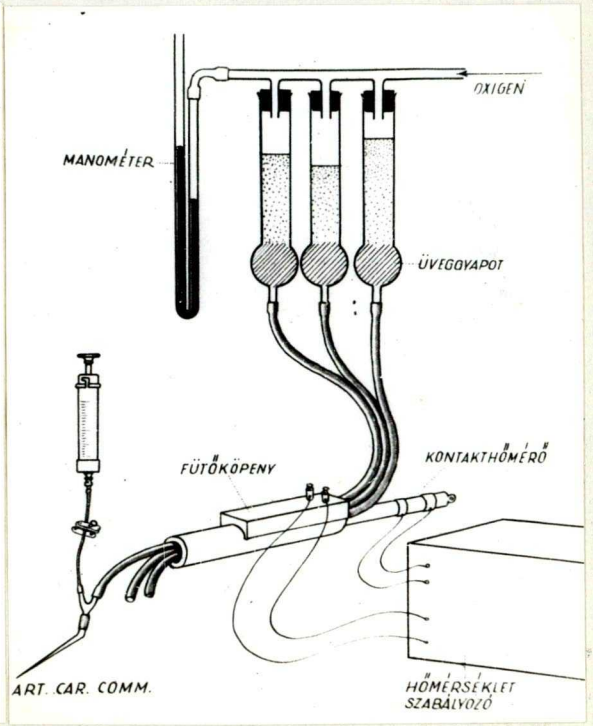
Érdekes jelenség az, hogy a folyamatos ingerlés mellett frissen szintetizálódott acetilkolin gyorsan fel is szabadul, vagyis az ingerléssel kiüríthető transzmitter depó nem egységes és az "uj" acetilkolin nem keveredik azonnal a meglévő transzmitter mennyiséggel, hanem olyan állapotban ill. helyen marad ahonnan impulzusok hatására kiürülése valószinübb. A szerzők azt is megállapitották, hogy magának a transzmitternek az ujrafelvétele -az adrenerg végződésekkel éles ellentétben - csaknem teljesen elhanyagolható, de a kolineszteráz által elbontott acetilkolin maradványoknak kb. felét a végződések ujra felveszik és azt később a kolin-acetiláz rendszer acetilkolinná szintetizálhatja.

Vizsgálati anyag és módszer.

Vizsgálatainkat mindkét nembeli 1,5-3 kg sulyu macskákon végeztük. Az állatokat intraperitoneálisan adott 4o mg/kg Nebubarbitallal altattuk. A ganglion cervicale superiusokat KIBJAKOV /1933/ módszere alapján, PATON és PERRY /1953/ által ajánlott módositásokkal mindkét oldalon feltártuk és esetenként izoláltan perfundáltuk. Az arteria carotis communisba bekötött kanülön vezettük be a 37 C^{o}-os és oxigénnel telitett Locke-oldatot. Az oldat összetétele %-ban: NaCl: o,9o ; KCl: o,o42 ; $CaCl_2$: o,o24 $NaHCO_3$: o,o2o ; glükóz: o,1o ; pH-ja: 7,4. A perfuzió anatómiai viszonyait a 8. ábra mutatja. A perfuziós folyadék állandó hőmérsékletét, O_2-vel való telitettségét és nyomását biztositó berendezés sematikus ábrázolása a 9. ábrán látható. A szükséges / 7o-8o Hgmm / nyomást oxigénbombából reduktoron keresztül nyertük és vezettük a perfuziós folyadékot tartalmazó edénybe, hogy az állandó nyomás mellett az O_2-vel való telitettséget is elérjük. Az egyenletes hőmérsékletet ultratermosztát tartotta 37 ± o,5 C^{o} szinten.

A preganglionáris ingerlést négyszöghullámu generátorral végeztük. Az ingerlés paraméterei: feszültség: 6-8 V; frekvencia: 1o-2o/sec; impulzusszélesség: 1 msec. Az ingerlés hatását a pislogóhártya izotóniás összehuzódásán





8. ábra 9. ábra

8. ábra. A ganglion cervicale superius perfuziójának anatómiai viszonyai /FEHÉR 1959/.

9. ábra. A perfuziós berendezés vázlatos rajza. Leirás a szövegben /FEHÉR 1959/.

regisztráltuk. Az ingerületáttevődés mértékére vonatkozóan rögzitettük a ganglionról elvezetett akciós potenciálokat is. Az elvezetés gömbvégü ezüst elektróddal kétcsatornás DISA Electromyograph segitségével történt.

Kisérleteink során a különböző fiziológiai állapotba hozott ganglionokat elektronmikroszkópos vizsgálatokra dolgoztuk fel. A kisérletes behatások és a rögzités közötti idő csökkentése végett, perfuziós fixálást alkalmaztunk. Az arteria carotis communisba vagy az arteria

carotis externába bekötött kanülön keresztül áramoltattunk át Karnovsky-f. aldehyd rögzitőt 2o percig, majd a kivett anyagot felszeletelve 1 óra 3o percig 4 C°-on ugyanebben az oldatban tartottuk. Kimosás után 1 órás utórögzitést végeztünk MILLONIG /1962/-féle pufferben oldott 1%-os OsO_4-ben. Pufferes mosás után felszálló alkoholsorozatban viztelenités következett / 3o-5o-7o-9o-96% majd abs. alkohol/. A 7o %-os alkoholban 3-4 % uranylacetátot oldottunk az anyag kontrasztosságának növelése érdekében. A viztelenités után etanol és 1,2-epoxy-propán 1:1 arányu keverékébe, majd tiszta propilénoxidba, ezt követően propilénoxid és araldit / Durcupan, FLUKA / 1:1 arányu keverékébe helyeztük anyagainkat, majd araldítban kapszuláztunk. A műgyanta polimerizációját 6o perces 37 C°-os, majd 3 napos 56 C°-os hőmérsékletü termosztátban tartással biztositottuk.

Az ultravékony metszeteket Porter-Blum tipusu ultratómmal készitettük és REYNOLDS-féle ólomcitráttal / 1963 / kontrasztoztuk. Elektronmikroszkópos felvételeinket Tesla 242 D asztali és Philips 3oo elektronmikroszkópokon készitettük.

Egyes esetekben 1o mg/kg HC-3 intravénás injiciálása után végeztük vizsgálatainkat, ilyenkor, szükség esetén mesterséges lélegeztetést is alkalmaztunk.

Az axonterminálok vesicula-populációjának értékelését

planimetriás módszerrel végeztük: az értékelésre kerülő képeket azonos mikroszkópfokozattal fényképeztük és azonos fotonagyitással készitettük. Vizsgálati anyagonként 10-15 felvételen számoltuk meg a szinaptizáló axonterminálok vesiculáit. A nagyitás ismeretében poláris planiméterrel meghatároztuk az axonprofilok területeit és a vesiculaszámot 1^2-re vonatkoztattuk. A kapott adatokat átlagoltuk, majd a standard deviációkat határoztuk meg az ismert képlet segitségével:

$$s = \frac{/ x_n - x /^2}{n - 1}$$, ahol x_n: az aritmetikai átlag; x: az egyes axonterminálok vesiculáinak száma; n: a figyelembe vett axonterminálisok száma.

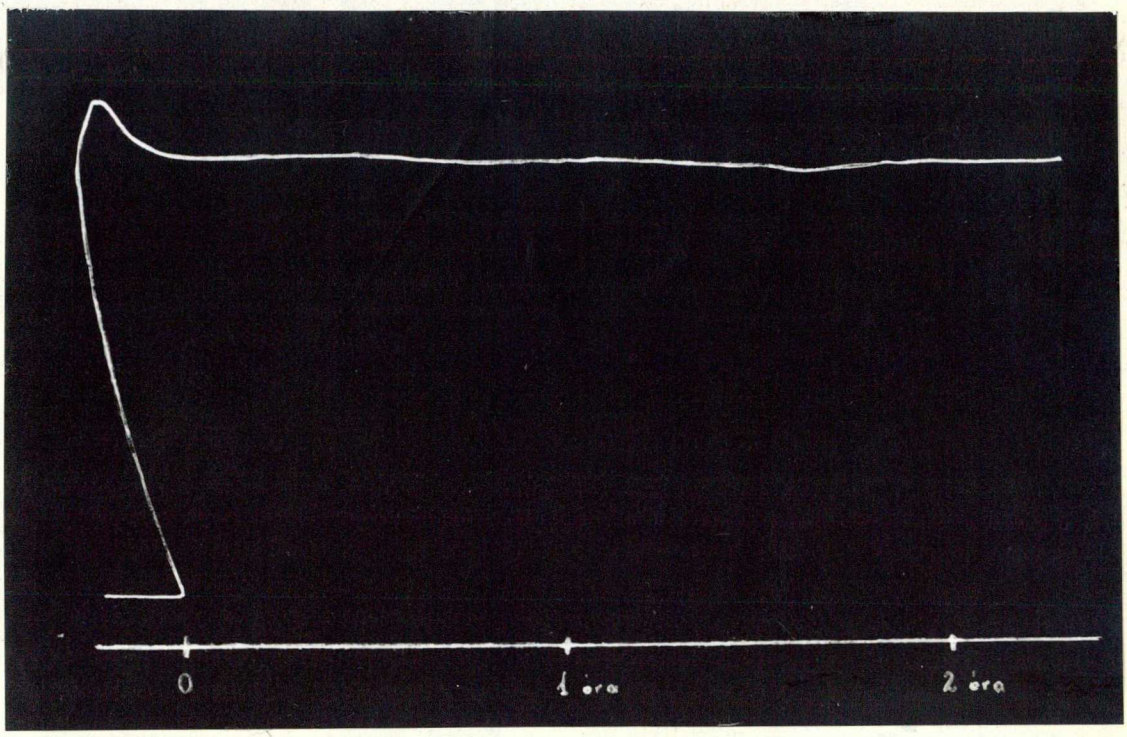
Kisérleti eredmények.

1. A természetes vérellátásu ganglionon kapott eredmények.

Vizsgálataink első részében arra kerestünk választ, hogy természetes vérellátás esetén alkalmazott hosszantartó preganglionáris elektromos ingerlés milyen hatással van a ganglion cervicale superius müködésére, azaz kimerithető-e a ganglion átvivőanyagtartalma és követi-e ezt finomszerkezeti változás a ganglionáris szinapszisok ultrastrukturájában és szinaptikus vesiculáinak számában?

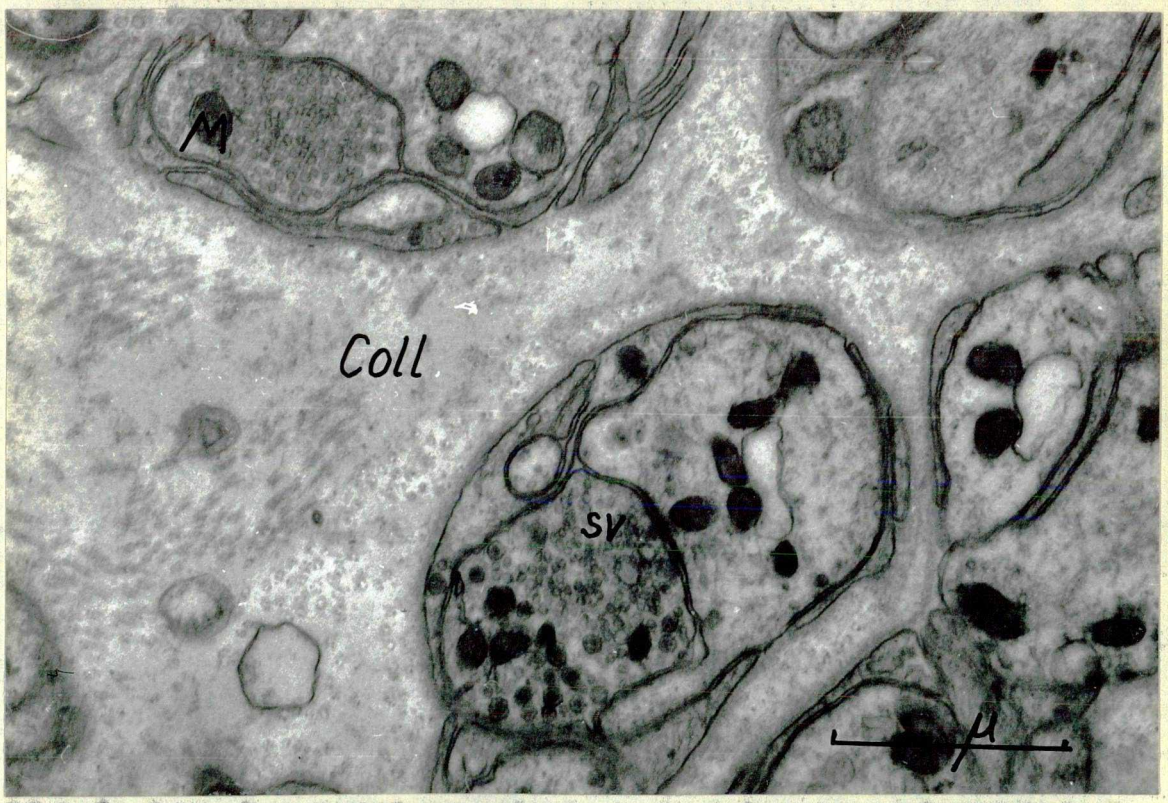
Ezért a már ismertetett módon altatott macska felső nyaki ganglionját kipreparálás után az egyik oldalon a preganglionáris szimpatikus rostokon keresztül négyszögimpulzusokkal ingereltük. Ugyanakkor kimográfon regisztráltuk az azonos oldali pislogóhártya izotóniás összehuzódását. A kimogramm mutatja / lo. ábra /, hogy az összehuzódás mértéke hosszu ideig állandó magas szinten marad, kifáradás nincs. / 2 óra után félbeszakitottuk a kisérletet./ A kezdeti kontrakciós maximum valószinüleg a felszabaduló és közben ujratermelődő transzmittermennyiség dinamikus egyensulyát megelőző állapotot jelzi.

Az ingerlés első órája után rögzitett anyag elektronmikroszkópos felvételeit elemezve / 11. és 12. ábra /nem találunk feltünő változást a szinapszisok szerkezetében,



1o. ábra. A pislogóhártya összehuzódása természetes vérellátásu ganglion hosszantartó elektromos ingerlése alatt. Az ingerületáttevődés szintje végig maximális.

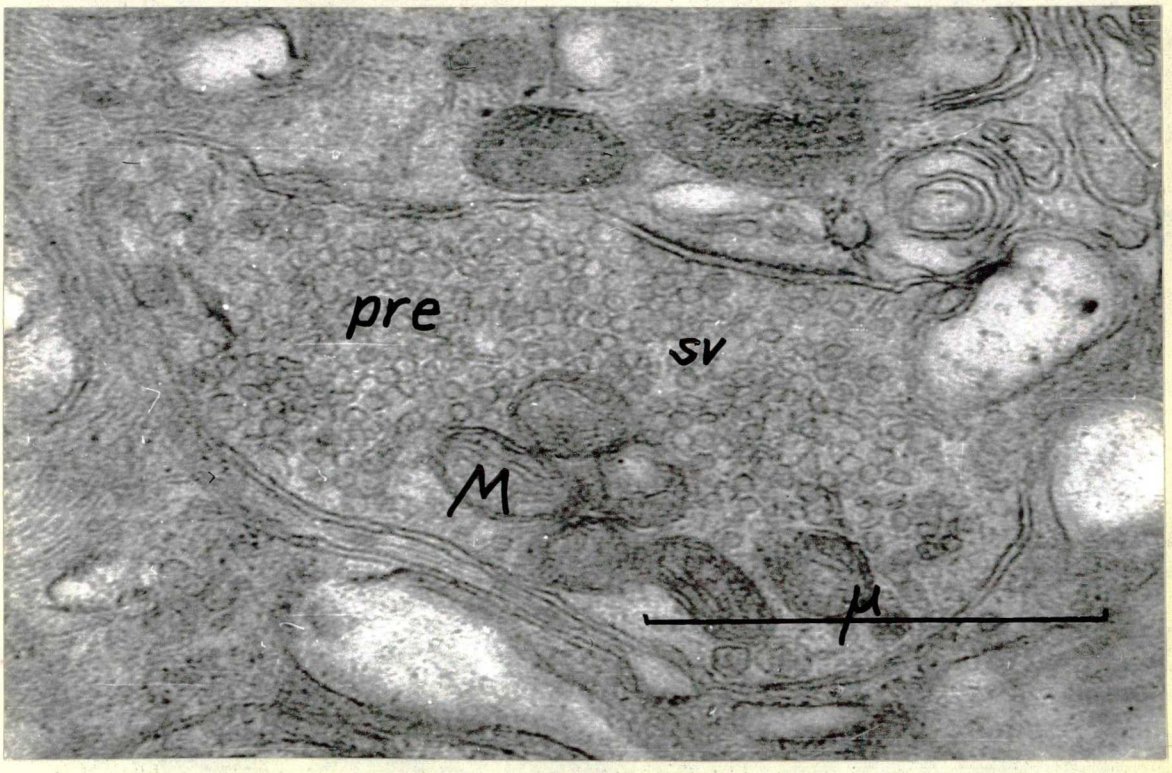
a szinaptikus vesiculák száma nem mutat szignifikáns eltérést./ 273 ± 88/μ^2 nyugalmi állapotban és 287 ± 7o/μ^2 ingerlés után / Megállapitható viszont az, hogy a vesicula-populáció heterogénebb, azaz átmérőjét és alakját tekintve nem uniform, hanem kisebb / kb. 2ooÅ / és egész nagy / kb. 1ooo Å / átmérőjü és különböző alaku vesiculák is előfordulnak. Az axonvégződésekben, valamint a Schwann-sejtekben található mitokondriumok normális szerkezetet mutatnak.

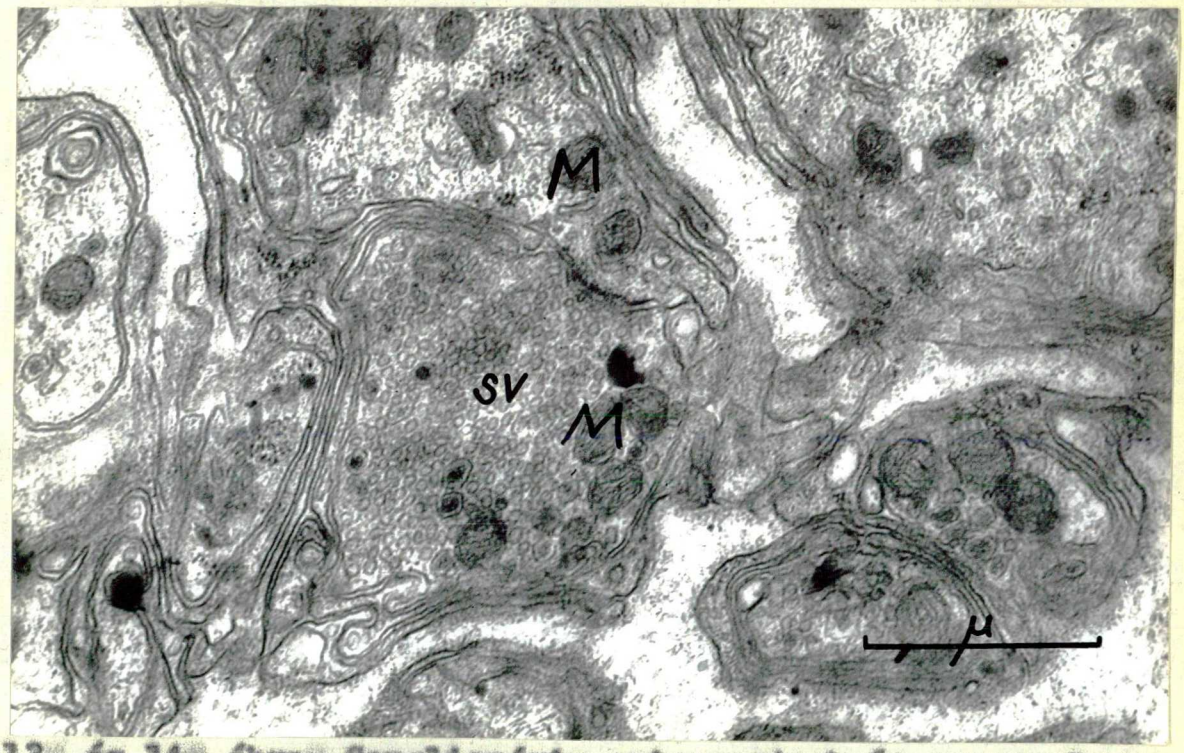


11. és 12. ábra. Szinapszisok a természetes vérellátás mellett 1 óráig ingerelt ganglionból. A mitokondriumok /M/ a pre-, és postszinaptikus oldalon egyaránt épek. Figyelemreméltó a szinaptikus vesiculák /sv/ heterogenitása. coll: kollagén rostok

2. A Locke-oldattal perfundált ganglionon kapott eredmények.

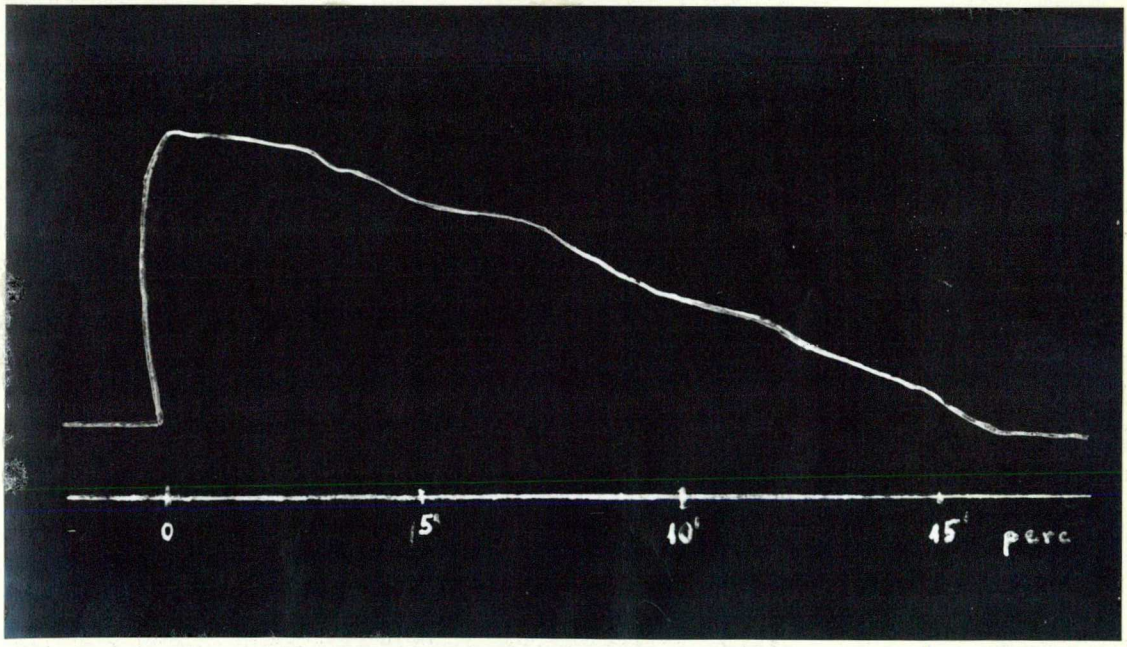
Ismeretes, hogy a szimpatikus ganglion megfelelő fiziológiás oldatban rendkivül hosszu ideig működőképes marad. NICOLESCU és munkatársai szerint / 1966 / patkány ganglion cervicale superiusa in vitro körülmények között 36 órával az eltávolitás után is megtartja szinaptikus ingerületátvevő képességét. Mivel a macska ganglion cervicale superiusa alkalmas arra, hogy izoláltan perfundáljuk és igy a legkülönbözőbb anyagok hatását vizsgáljuk meg, lényegesnek tartottuk magának a perfuziónak a ganglion finomszerkezeti elemeire kifejtett hatását figyelemmel kisérni. Az átáramoltatás első és második órája között egyes ingerek adásával győződtünk meg arról, hogy a szinaptikus átvevődés képessége megmaradt-e. Ezt a kontroll-állapothoz viszonyitva valamennyi esetben változatlannak találtuk. Az ilyen állapotban rögzitett anyag a korábban már ismertetett normál állapotnak megfelelő képhez nagyon hasonló. / 13. és 14. ábra / A preszinaptikus terminál vesiculákkal kitöltött, a vesiculák alakja tulnyomórészt szferoid néhány ovoid formával; elvétve a dense core tipus is megtalálható. Az 1 μ^2-re vonatkoztatott vesiculaszám: 253 ± 59. A szinapszis jellemző alkotórészei, a pre-, és postszinaptikus membrán, a mitokondriumok normális szerkezetet mutatnak.





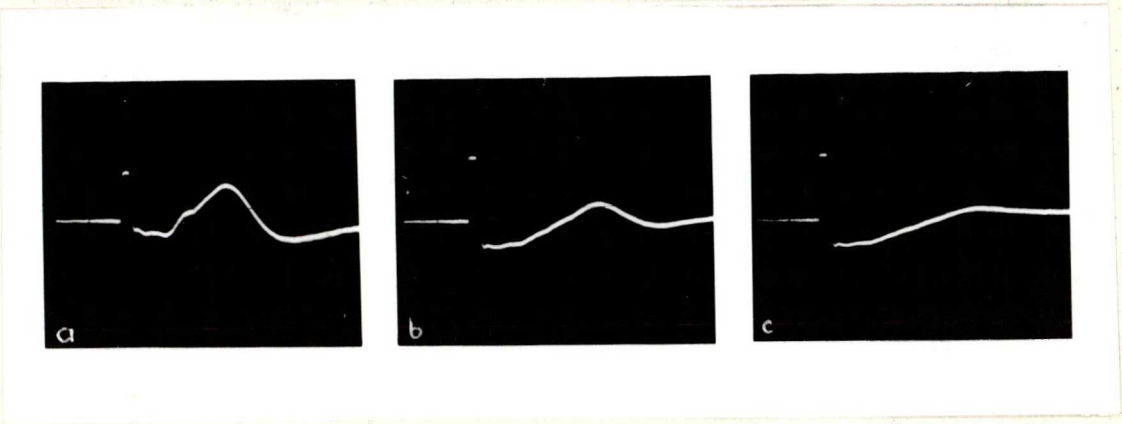
13. és 14. ábra. Ganglionáris szinapszisok 60 perces Locke perfuzió után. A szinaptikus vesiculák számában és alakjában nem látható változás /sv/, a mitokondriumok /M/ épek. pre: presszinaptikus végződés

Ha az ilyen, Locke-oldattal átáramoltatott ganglion egyidejüleg a már ismertetett paraméterekkel a preszinaptikus rostokon keresztül ingereljük, érdekes változást tapasztalunk. A pislogóhártya összehuzódás regisztrálása alapján világosan látszik / 15. ábra /, hogy az összehuzódás és ennek megfelelően az intraganglionáris ingerületáttevődés fokozatosan csökken és 15 percen belül egy az alapvonalhoz közelálló minimumra áll be. Ezt az állapotot a ganglionáris áttevődés kifáradásának tekinthetjük.



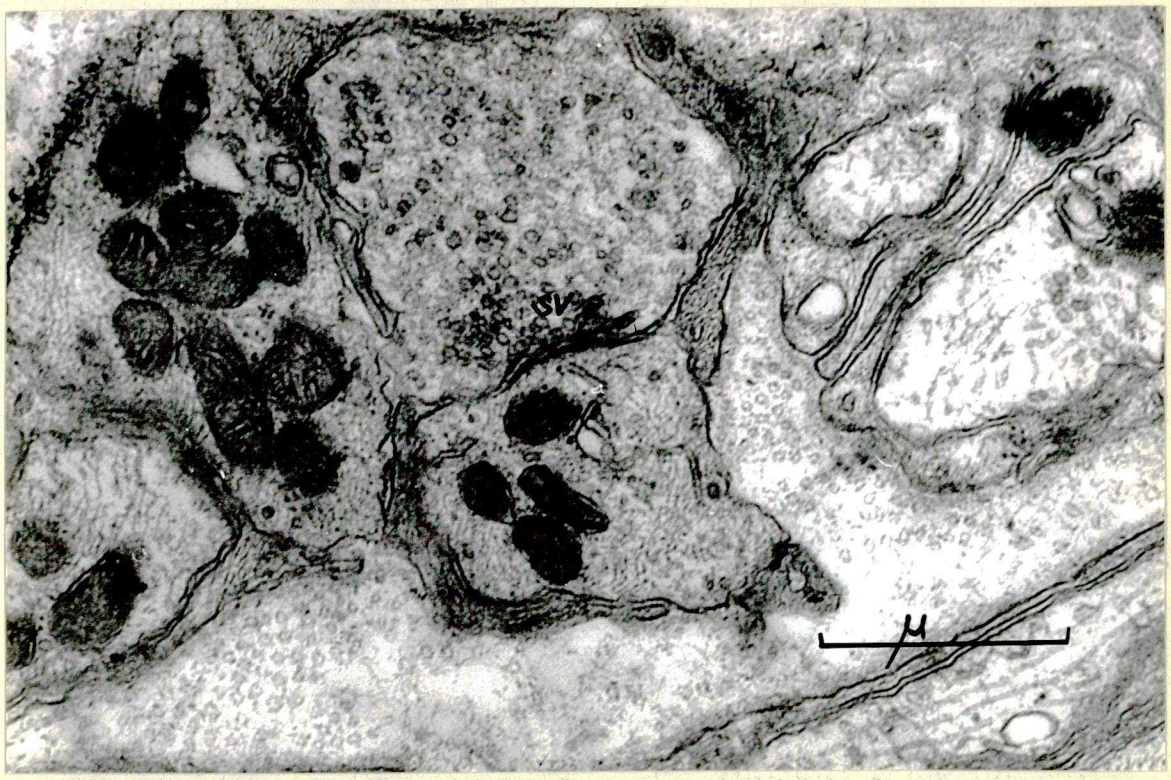
15. ábra. A pislogóhártya összehuzódása Locke-oldattal perfundált ganglion elektromos ingerlése alatt. Az áttevődés 15 perc alatt minimálisra csökken.

Az elvezetett és rögzitett akciós potenciálok képei szintén az áttevődés megszünését jelzik. / 16. ábra /

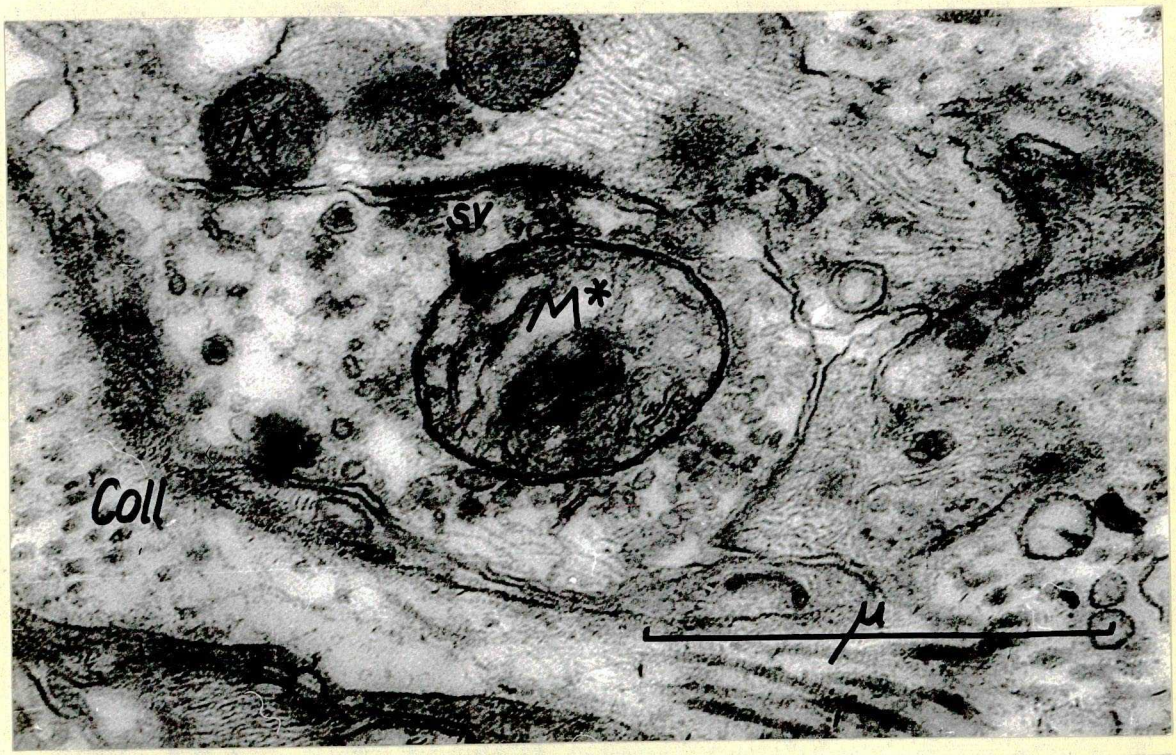


16. ábra. Locke-oldattal perfundált ganglionról elvezetett akciós potenciálok a folyamatos ingerlés első /a/, hetedik /b/ és tizenötödik percében. Az ingerületáttevődés a 15. percben gyakorlatilag megszünt.

Az elektronmikroszkópos képeken / 17.-2o. ábra / legelőször a szinaptikus vesiculák számának csökkenése tünik fel. Az 1 μ^2-ra jutó vesiculák száma : 24 ± 6, az eddig ismertetett valamennyi értéknél szignifikánsan alacsonyabb. Ha megfigyeljük a vesiculák elrendeződését, azt találjuk, hogy azok a szinaptikus kontaktus helye felé csoportosulnak. Az előbbiekben már emlitett alakokon kivül / szférikus, ovoid, dense core / elég nagy számban tünnek fel az ezen csopertokba nem osztható formák, a vesicula-populáció ilyenkor is elég heterogén. Rendkivül szembetünő viszont az, hogy a preszinaptikus terminál mitokondriumai nagymértékben duzzadtak, erős strukturális



17. és 18. ábra. Perfunddlt és ingerléssel kimeritett ganglion szinapszisai. Kisszámu vesicula /sv/ és duzzadt mitokondrium /M*/ látható a presszinaptikus terminálban.



19. és 2o. ábra. Csökkent számu, különböző alaku és nagyságu vesiculák /sv/ perfundált és ingerléssel kimerített ganglion szinapszisaiban. Jellemző, hogy a mitokondriumok csupán az axonvégződésekben duzzadtak /M*/, egyéb helyeken épek /M/. coll: kollagén rostok

károsodást mutatnak. Azt, hogy nem egy általános, aspecifikus - estleg fixálási hibából eredő artefíciális - hatásról van szó, jól mutatja az, hogy a postszinaptikus oldalon, valamint a Schwann-sejtekben is a mitokondriumok teljesen épek. E jelenség értelmezésére később még visszatérünk.

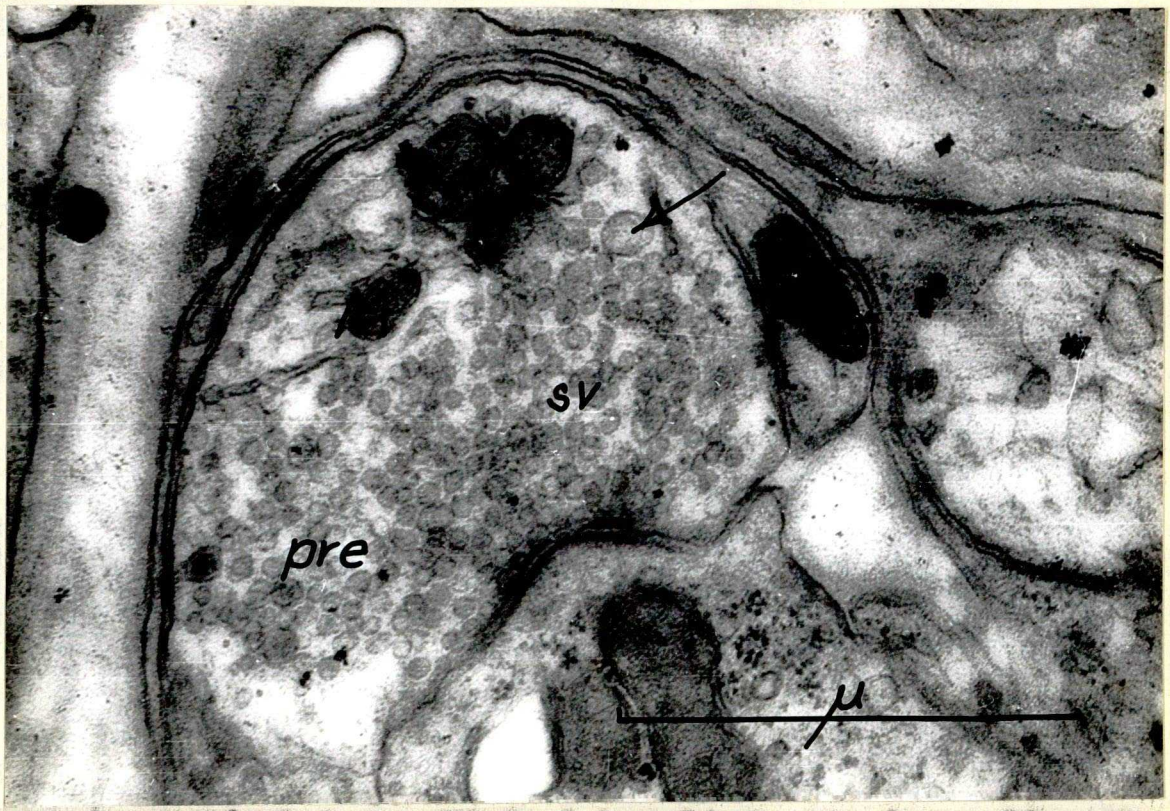
3. A HC-3-al végzett kisérletek eredményei.

Előző kisérleteinkben sikerült perfuzióval kombinált szupramaximális ingerekkel a ganglionáris ingerületátte-vődés blokkját előidéznünk. Ezt fiziológiai és elektro-fiziológiai módszerekkel igazolni is lehetett és a mor-fológiai kép is jellegzetes eltérést mutatott a normál állapottól. Érdemesnek látszott megvizsgálni azt, hogy olyan anyagok, mélyek a szinaptikus áttevődést gátolják, milyen változásokat hoznak létre a szinapszisok finom-szerkezeti elemeiben. Választásunk a HC-3-ra esett, amely irodalmi adatok szerint / MACINTOSH et. al. 1956 / pre-szinaptikusan fejti ki hatását, amennyiben az acetilko-lin szintézis gátlásával a ganglionáris ingerületáttevő-désben szereplő transzmitter anyagcseréjét zavarja meg.

Altatott macskáknak intravénásan adagoltunk lo mg/kg HC-3-t. A farmakon beadása után 15 perccel ingerelni kezd-tük az egyik oldali ganglionot, mig a másik olddali minden esetben a HC-3-al kezelt, ingerlés nélküli kontrollként szerepelt.

A HC-3-al kezelt és ingerlés nélküli állapotban rögzi-tett anyagot vizsgálva a vesiculumok számában lényeges csökkenést nem tapasztaltunk / 25o ± 7o /μ^2 /. A vesicu-lák heterogenitása itt is feltünő. / 21. és 22. ábra / A mitokondriumok a pre- és postszinaptikus oldalon és a Schwann-sejtekben is egyaránt ép szerkezetet mutatnak.

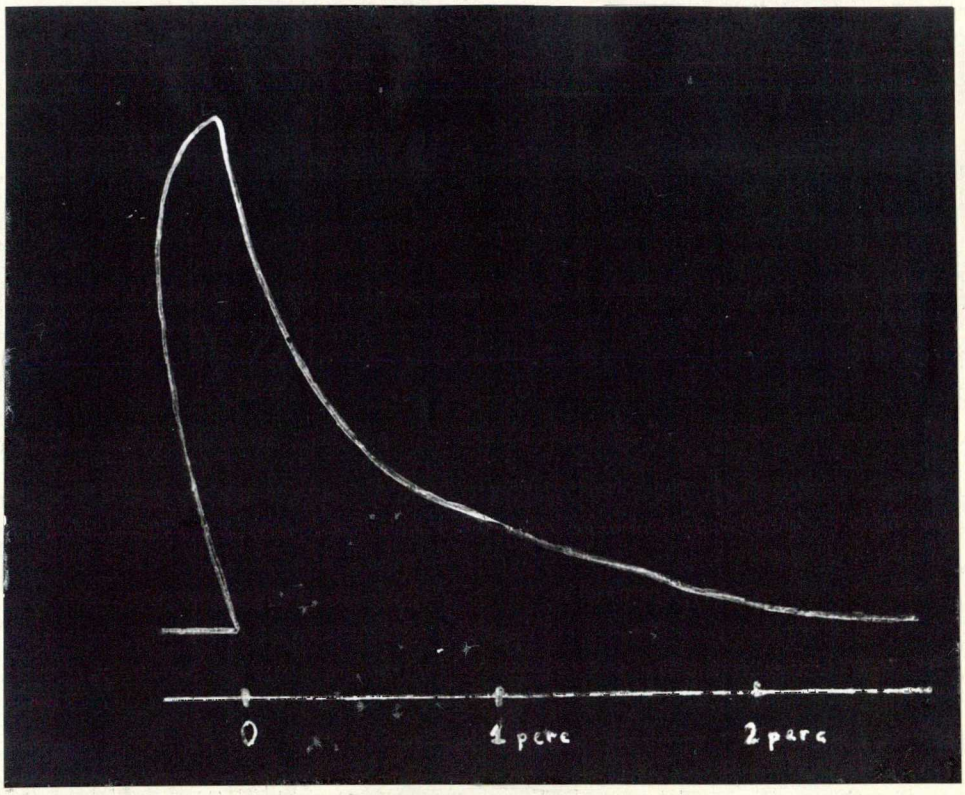
21. ábra. Ganglion cervicale superius szinapszisa /nyil/ 1o mg/kg HC-3 iv. adása után. A szinaptikus vesiculák /sv/ számában nincs változás, de több nagyságban és alakban különböző vesicula látható. A mitokondriumok /M/ épek. Ce: centriólum, coll: kollagén rostok



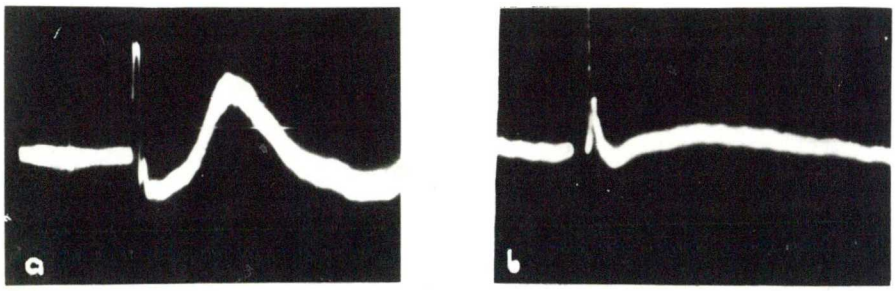
22. ábra. Részlet egy HC-3-al kezelt de nem ingerelt ganglionból. A presszinaptikus végződésben /pre/ több szabálytalan alaku vesicula található /nyil/. M: mitokondrium, sv: szinaptikus vesicula

A ganglionot ilyen állapotban a szokásos módon ingerelve a változás rendkivül dramatikus. Az ingerlés megindítása után 2 perccel a regisztrátumok adatai szerint az ingerületáttevődés gyakorlatilag megszünik. A 23. ábra a pislogóhártya összehuzódását, mig a 24. ábra az elvezetett akcióspotenciálokat mutatja. Az elektronmikroszkópos felvételeket tanulmányozva / 25.-27. ábra / jól látszik a szinaptikus vesiculák számcsökkenése / $23 \pm 9/\mu^2$ / és csoportosulása a szinaptikus kontaktus helyéhez.

Figyelemreméltónak találjuk, hogy abban az esetben, ha a HC-3 kezelést ingerléssel kombináljuk, a szinaptikus

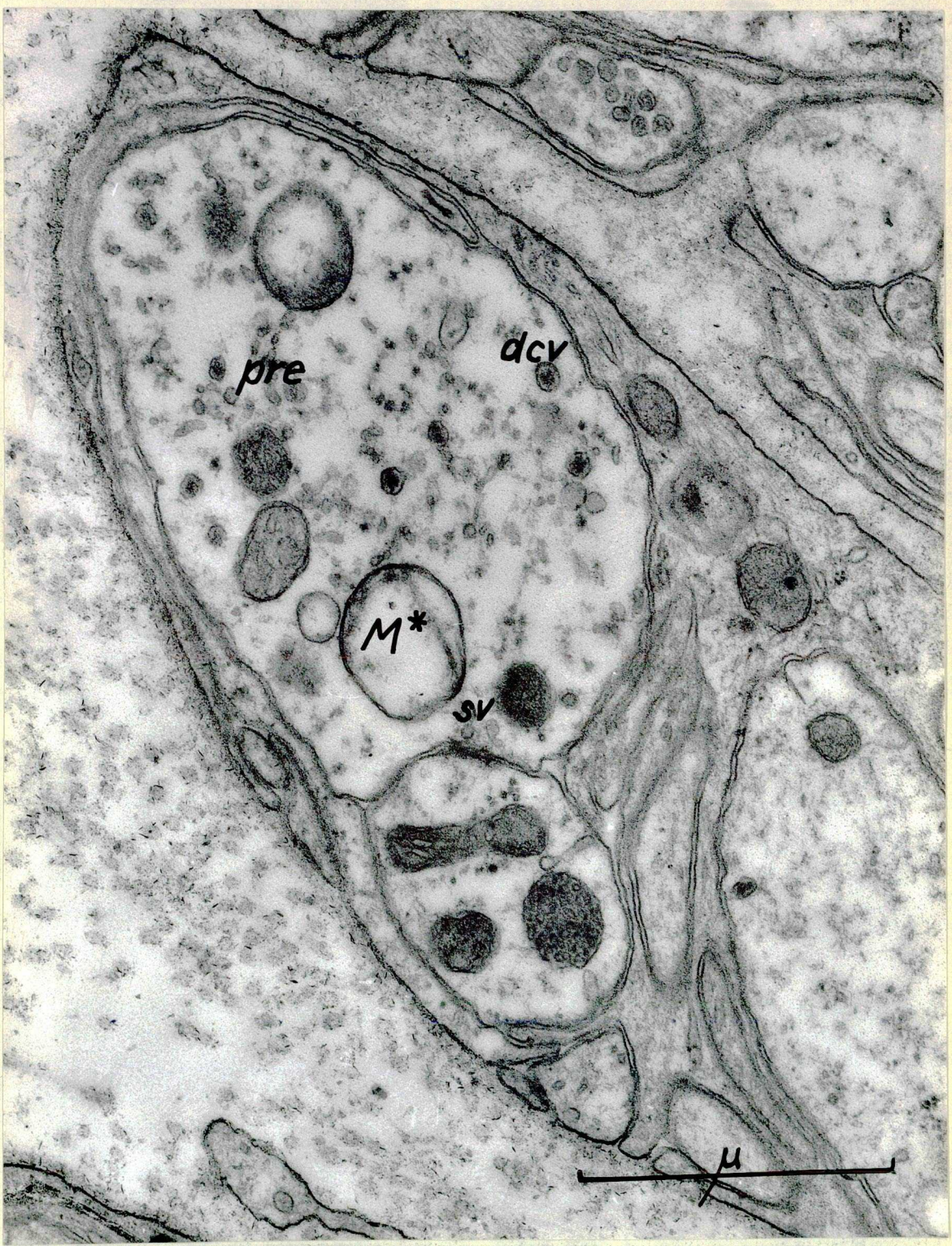


23. ábra. A pislogóhártya összehuzódása HC-3 kezelést / 1o mg/kg / követő ingerlés hatására. Az ingerület-áttevődés 2 perc alatt megszünt.

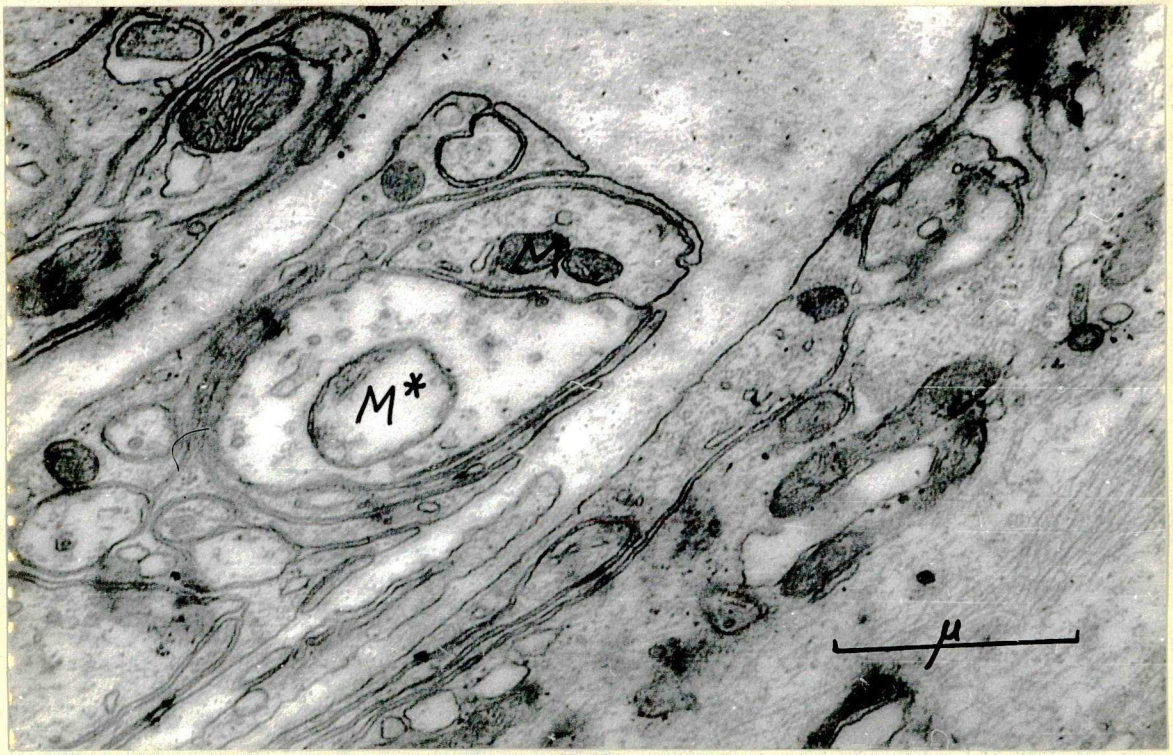


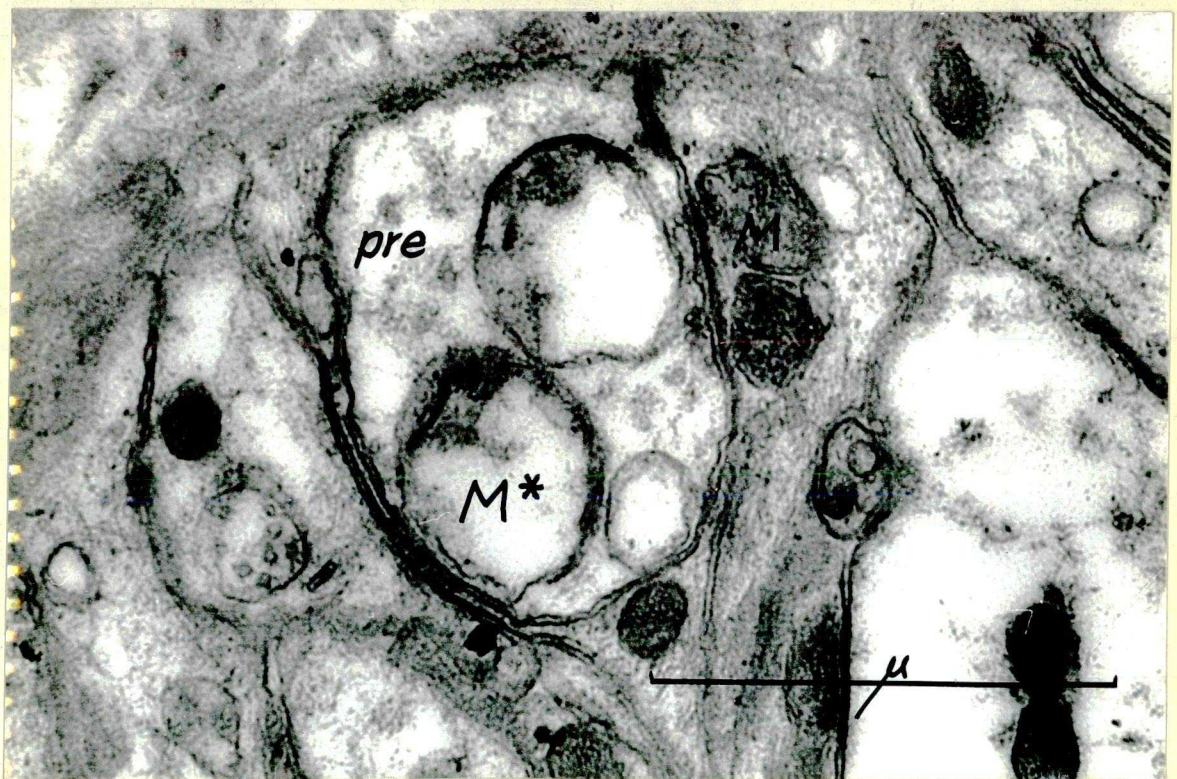
24. ábra. A HC-3-al kezelt ganglionról elvezetett akciós-potenciálok az ingerlés kezdetén /a/ és a második perc végén /b/. Két perc után áttevődés nincs.

vesiculák számcsökkenését - a Locke-oldattal perfundált és ingerelt ganglionokhoz hasonlóan - durva mitokondrium-



25. ábra. HC-3 kezelés után ingerléssel kimeritett ganglionáris szinapszis képe. A presszinaptikus oldalon /pre/ a vesiculák /sv/ száma erősen csökkent és a mitokondriumok is károsodottak /M*/. dcv: dense-core vesicula





26. és 27. ábra. Szinapszisok HC-3-al kezelt és ingerelt ganglionokból. 2 perces ingerlés hatására a preszinaptikus terminálból/pre/ a vesiculák majdnem teljesen eltűntek, csak a duzzadt mitokondriumok /M*/ láthatók. Egyéb elemekben a mitokondriumok /M/ ép szerkezetet mutatnak.

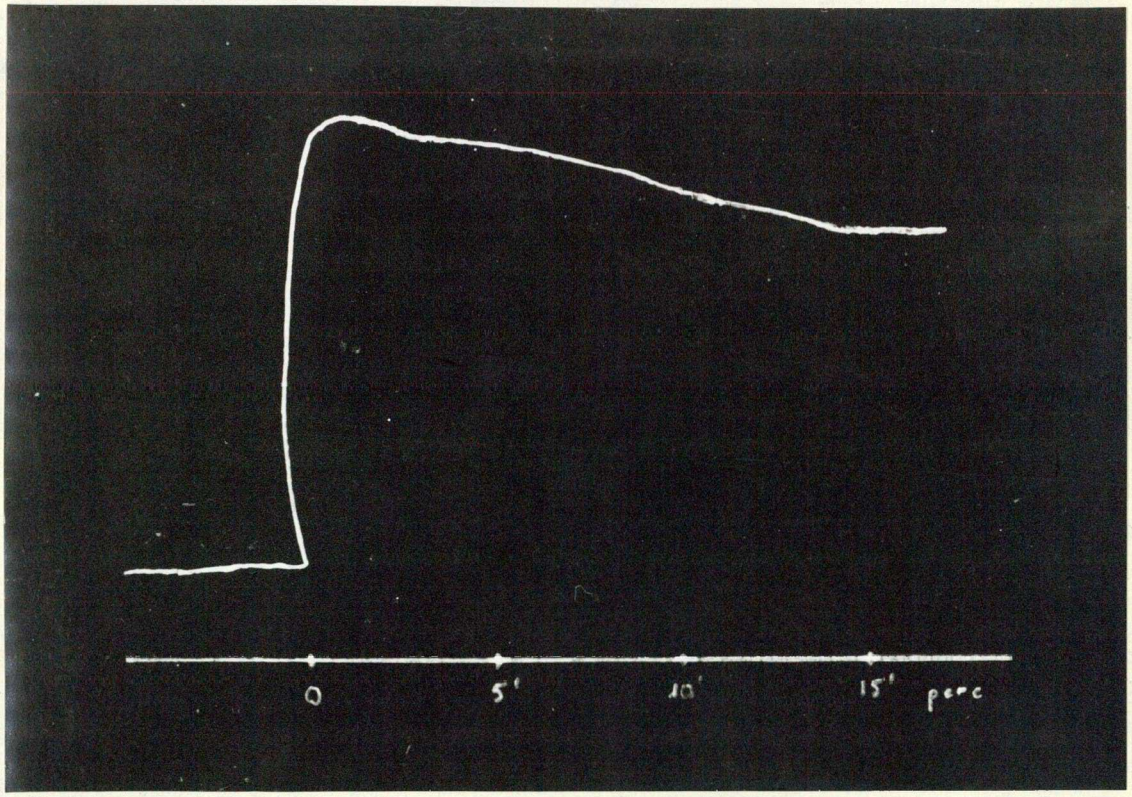
duzzadás kiséri. Az anyag preparálása során létrejövő esetleges artefactum itt is kizárható volt, mivel más nyulványokban egy esetben sem találtunk károsodást mutató mitokondriumot.

4. A kolin-tartalmu Locke-oldattal végzett perfuzióval kapott eredmények.

A Locke-perfuziós és a HC-3-al végzett ingerléses kisérletek tanulságai szerint az ingerületáttevődés megszünte jól körülhatárolt finomszerkezeti változásokkal jár együtt. Feltételeztük, hogy mindkét esetben a transzmitter szintézisében beálló zavar lehet a kiváltó ok, hiszen a Locke-oldatból az acetilkolin egyik prekurzora a kolin hiányzik, mig a HC-3-ról tudjuk, hogy az acetilkolin szintézis specifikus gátlószere / MACINTOSH et. al. 1956 /. Korábbi kisérletekből az is ismert, hogy a ganglion cervicale superius izoláltan perfundálva hosszu ideig képes acetilkolin szintézisére és felszabaditására, ha a kolin utánpótlását folyamatosan biztositjuk / BROWN és FELDBERG 1936 /. Ezért volt fontos megállapitani, hogy kolin-tartalmu Locke-oldattal perfundálva és egyidejüleg ingerelve a kimerülést kisérő morfológiai változások kivédhetők-e?

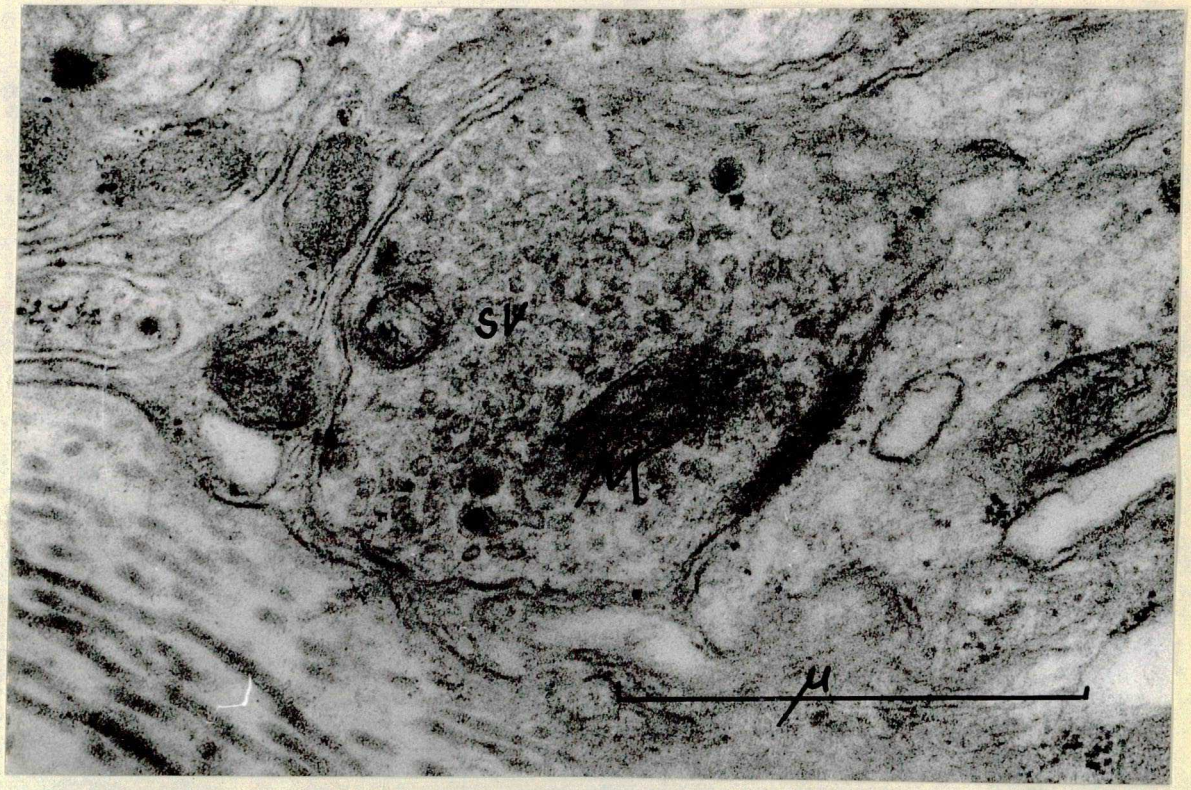
Kisérleteinkben az előzőleg már ismertetett módszert használtuk, azzal a különbséggel, hogy perfuziós oldatunkban 1o mg/l. kolinkloridot oldottunk. A kolin-tartalmu Locke-oldat ingerlés nélkül hosszu idő alatt / 1-2 óra / sem okozott szubmikroszkópos vátozást / vesiculaszám: 262 ± 61 /μ^2/ és természetesen az áttevőképesség is vál-

tozatlanul megmaradt. A szokásos paraméterekkel ingerelve a szinaptikus aktivitás, miként a pislogohártya összehuzódása jelzi, csökkent ugyan, de a kolin-mentes perfuzió esetén 15 perc után tapasztalt kimerülés nem következik be, az áttevődés mértéke az eredetinek 8o-9o %-a!



28. ábra. A pislogóhártya összehuzódása kolin-tartalmu Locke-oldattal perfundált ganglion elektromos ingerlése alatt. Az áttevődés szintje 15 perc alatt csupán 1o-2o %-al csökken.

Az elektronmikroszkópos felvételek tanulmányozása során a várakozásnak megfelelően csak kismértéku csökkenés mutatható ki a szinaptikus vesiculák számában / 227 ± 64 / és a korábban jellegzetesnek talált axonális mitokondrium-



29. és 3o. ábra. Szinapszisok kolin-tartalmu Locke-oldattal perfundált és elektromosan ingerelt ganglionból. A szinaptikus vesiculák /sv/ számában szembetünő változás nincs, a mitokondriumok is csak enyhén károsodtak /M/.

duzzadás is csak igen elvétve, esetlegesen fordult elő. / 29. és 3o. ábra /

Végül táblázatba foglalva közöljük a vesiculák számának különböző kisérleti körülmények közötti alakulására vonatkozó statisztikai kiértékelésünk eredményeit.

	vesiculaszám /μ^2	
	nyugalmi	ingerelt
Természetes vérellátás	273 ± 88	287 ± 7o
HC-3-s kezelés után	25o ± 7o	23 ± 9
Locke-perfuzió	253 ± 59	24 ± 6
Kolin tartalmu Locke-perfuzió	262 ± 61	227 ± 64

I. táblázat. A szinaptikus vesiculák számának alakulása különböző kisérleti körülmények között.

Az adatokból szemléletesen látszik, hogy a szinaptikus vesiculák számának szignifikáns csökkenése csak abban a két esetben következett be, amikor a szinaptikus áttevődés minimumra való csökkenését, a ganglion kifáradását egyéb fiziológiai módszerekkel is minden kétséget kizáróan megállapithattuk.

Magyar Tudományos Akadémia Központi Könyvtára SZEGED

Az eredmények megbeszélése

Az előző fejezetben ismertetett eredményeket értékelve megállapithatjuk, hogy természetes vérellátás mellett a megadott és az irodalmi adatok tanulságai szerint szupramaximálisnak tartott paraméterekkel ingerelva a macska ganglion cervicale superiusa gyakorlatilag kimerithetetlen. Ezt mutatta a pislogóhártya összehuzódását regisztráló görbe is, melynek lefutásában található kezdeti maximum BIRKS és MACINTOSH /1961/ kisérleti eredményeivel magyarázható. Ezek szerint ingerléskor a ganglionból felszabaduló acetilkolin mennyisége egy maximális szintről kezdetben gyorsan csökken, majd egy magas szinten, - mely szintet a megnövekedett aktivitással müködő kolin-acetiláz rendszer biztositja - állandó marad. Ezt a kezdeti magas és gyorsan egyensulyi állapotra beálló acetilkolin szintet képviseli a görbe maximuma.

A hosszantartó ingerlés után elektronmikroszkópos feldolgozás céljára rögzitett anyag vizsgálata során a vesiculák alakjában tapasztalt heterogenitást tartjuk emlitésre méltónak. A szinaptikus profilt kitöltő formák között kerek, ovoid és a normálistól erősen eltérő alaku és nagyságu vesiculát egyaránt találunk. A nem ingerelt és az ingerelt terminálok vesiculatartalma között nincs lényeges eltérés.

A 37 C°-os Locke-oldattal történő perfuzió önmegában, 1-2 óra alatt nem okozott szembetünő ultrastrukturális változásokat. Ez megfelel az irodalmi adatoknak és a további, perfuzióval végzendő kisérletek értékeléséhez nagy biztonságot nyujt. A morfológiai képnek megfelelően a ganglion müködése a preganglionáris elektromos ingerléskor szintén normális, a szinaptikus áttevőképességét egyes ingerekkel vizsgálva változatlannak találtuk.

A perfuzióval kombinált szupramaximális ingerlés során, a regisztrátumok tanulsága szerint a kezdeti maximális szinaptikus aktivitás fokozatosan csökken és 15 perc mulva gyakorlatilag megszünik. Ezt az állapotot a ganglion kimerülésének tekinthetjük.

BROWN és FELDBERG /1936/ valamint BIRKS és MACINTOSH /1961/ megállapitásai szerint a szimpatikus ganglion acetilkolin anyagcseréje hosszantartó ingerlés esetén is normális marad, ha gondoskodunk a kolin utánpótlásáról. Mivel ezen kisérletünkben használt Locke-oldat kolinmentes volt kézenfekvőnek tartottuk, hogy az ingerlésre felszabaduló acetilkolin mennyiségét a szintetizáló rendszer esetleg a kolin hiánya miatt nem tudja pótolni és az vezet az áttevődés megszünéséhez. Ezen feltevés szerint az acetilkolin depó azon részét távolitanánk el, amely ingerléssel hozzáférhető. Ez a ganglion össz-acetilkolin tartalmának megközelitőleg 85%-a, a már emlitett "depot-ACh" / BIRKS és MACINTOSH 1961 /.

Ennek a fiziológiai állapotnak megfelelő morfológiai kép rendkivül szemléletes. A normál állapotban vesiculákkal zsufoltan kitöltött terminálok a kolin-mentes Locke-oldattal történő perfuziót követő ingerlés után csaknem teljesen üresek. A vesiculaszámokat statisztikusan értékelve a csökkenés szignifikáns. Elektronmikroszkópos felvételeink alapján igazolva látjuk azon klasszikus feltevést, miszerint a transzmitter a vesiculák jelenlétéhez kötött, vagy legalábbis valamilyen - eddig ismeretlen, de szoros - kapcsolat tételezhető fel közöttük, hiszen a ganglion acetilkolin tartalmának nagy részét ingerléssel eltávolitva a vesiculaszám ezzel páhuzamosan szignifikánsan csökkent. Kisérleteink igazolni látszanak azon feltevést, hogy a "depot-ACh" a szinaptikus vesiculákhoz kötött.

Az is jól megfigyelhető volt, hogy az ingerelt ill. kimeritett ganglionok szinapszisaiban a még meglévő vesiculák valamennyi esetben a tulajdonképpeni szinaptikus kontaktus, a membránvastagodások felé csoportosulnak. Képeink mintegy pillanatfelvételként rögzitették ezt a folyamatot. meg kell viszont jegyezni, hogy egyetlen esetben sem találtunk olyan, az irodalomból különben ismert képet, ahol a vesiculáknak a szinaptikus résbe való kiürülését demonstrálhatnánk.

Kisérleti eredményeink szempontjából emlitésre méltónak tartjuk NICOLESCU és munkatársainak adatát /1966/, miszerint

patkány ganglion cervicale superiusa in vitro, a fiziológiás oldatban lévő glükóz megvonására szintén a szinaptikus ingerületátadás képességének elvesztésével válaszol és a megfigyelhető morfológiai változások szintén a preszinaptikus rostban jelentkeznek.

Vizsgálati eredményeinkből kiemelendőnek tartjuk a specifikus mitokondriális károsodást, mely minden esetben csak az ingerületáttétel megszünésekor volt kimutatható az axonterminálisokban. Az, hogy ez a duzzadás csak a preszinaptikus rostok mitokondriumait érinti és a postszinaptikus oldalon, valamint a ganglionsejtek és a Schwann-sejtek esetében ilyen eltérés nincs, teljes bizonyossággal kizárja az elváltozás műtermék / rögzitési hiba, izotóniás viszonyoktól való eltérés / jellegét. Hasonló jellegü, speciális, csak egyes idegi elemekre lokalizálódó mitokondriumduzzadást talált korábban egyes idegsejtek perikaryonjában GAMBETTI, GONATAS és FLEXNER /1968/ intracerebrálisan adott puromycin adása után és JOÓ, SZOLCSÁNYI és JANCSÓ-GÁBOR /1969/ capsaicinnel deszenzibilizált, érzészavarban szenvedő patkányok spinális úcának egyes sejtjeiben. Meglévő adataink jelenleg elégtelenek e speciális jelenség értelmezéséhez, igy most csak a lehetséges magyarázatokat vetjük fel. Kétségtelen, hogy az ingerlés és a vele szükségszerüen együttjáró anyagcsere intenzitás-növekedés hyperfunkcióval jár és kiváltó okként szerepelhet. Ennek ellntmond az,

hogy normális vérellátás esetén, mikor ez a lehetőség ugyancsak fennáll, soha nem figyeltük meg ezt a jelenséget. Feltételezhető még az is, hogy az acetilkolin szintézisben beálló zavar az eltérések oka, talán közvetve azáltal, hogy az energiatermelő folyamatról lekapcsolódik maga a szintézis. Ehhez a feltevéshez kapcsolódnak azon irodalmi adatok, mely szerint az oxidativ foszforiláció szétkapcsolása mitokondriális duzzadással jár. / ALTMANN 1955 / Nem lehet elvetni azt a magyarázatot sem, hogy a csökkenő kolinmennyiséget a szintetizáló rendszer szerkezeti anyagokból pótolja és ennek következménye a strukturális károsodás és talán a vesiculák számának csökkonése is.

A kolin-tartalmu Locke-oldattal végzett perfuziós kisérletek eredményei a szerkezeti elemek / vesicula, mitokondrium / és az acetilkolin szintézis között meglévő szoros összefüggést bizonyitják, valamint azt, hogy a transzmissziót kisérő szubmikroszkópos változások hiányállapotra, nevezetesen egyszerü kolin hiányra is visszavezethető károsodási jelnek is tekinthetők. Kolin jelenlétében ugyanis az ingerléssel felfokozott transzmitter szintézis zavartalanul lefolyhat és a képek tanulsága szerint a morfológiai károsodások is kivédhetők.

Feltevéseinket alátámasztani látszanak a HC-3-al kapott eredmények. A farmakológiai kisérletek, - melyeket csaknem kizárólag éppen macska ganglion cervicale superiusán végez-

tek - azt mutatják, hogy nem ingerelt állapotban eserinezett és HC-3 tartalmu vérplazmával perfundálva a ganglion acetilkolin tartalma kis ingadozással állandó szinten marad, mig a párhuzamosan alkalmazott ingerlés az acetilkolintartalom gyors csökkenéséhez vezet / BIRKS és MACINTOSH 1961 / Az eserinezett vérplazmával végzett perfuzió közeliti meg legjobban a természetes körülményeket, igy lehetőség nyilik az általunk kapott morfológiai képet nemcsak a fiziológiai hanem a farmakológiai eredményekkel is összevetni.

A HC-3-os nem ingerelt anyagban az ultrastrukturális elemek közül egyedül a szinaptikus vesiculákban figyelhető meg változás. Mennyiségileg ez nem jelentős, viszont gyakoribbak a szokásosnál nagyobb, szabálytalan alakok. Ilyen állapotban ingerelve az áttevődés 1-2 perc alatt irreverzibilisen megszünik. A folyamat gyorsabb lefolyása ellenére hasonlit a perfundált ganglion engerlésekor leirtakhoz és ez a hasonlóság a morfológiai képek elemzésekor még feltünőbb. A preszinaptikus terminálok kiürültek és mitokondriumai duzzadtak. A HC-3 hatását ismerve, mindkét esetben azt a következtetést kell levonnunk, hogy a szinaptikus vesiculák valamilyen kapcsolatban állnak a transzmitterrel, ugyanis a transzmitter kiürülésével párhuzamosan a vesiculák is eltünnek a szinapszis területéről. A kimerülés gyorsaságában fennálló különbség is magyarázható. Ismeretes ugyanis, hogy az acetilkolin szintézishez szükséges

kolin egy része az előzőleg felszabadult és az acetilkolineszteráz által azonnal elbontott acetilkolinból származik. A Locke-oldattal történő perfuzió esetén ez a kolinmennyiség rendelkezésre áll, míg a HC-3 éppen a kolintranszportáló mechanizmus gátlása révén a kolin ujrafelvételét akadályozza meg.

A feltűnő és rendkivül specifikus mitokondriális károsodás értelmezésénél itt is a perfuziós kisérletek elemzésénél elmondottakra hivatkozhatunk, hiszen ebben az esetben is az acetilkolin szintézis gátlásáról van szó, amit HC-3-al idéztünk elő. Minden esetre a károsodás csak ingerlésre következett be és az ismeretes, hogy az ingerlés normális viszonyok között fokozottabb acetilkolin szintézissel jár.

Tézisek

Vizsgálataink során célkitüzéseinknem megfelelően olyan összefüggéseket kerestünk, melyek a kolinerg mediációval müködő szinapszisok funkcionális állapota és szubmikroszkópos morfológiája között állnak fenn. Kisérleteinket macska felső nyaki szimpatikus ganglionjának szinapszisain végeztük, melyek müködése a pislogóhártya összehuzódás és az akciós potenciál regisztrálásával jól figyelemmel kisérhető. Megvizsgáltuk a preganglionáris elektromos ingerlés hatását természetes vérellátás, Locke-perfuzió, kolin-tartalmu Locke-perfuzió esetén és az acetilkolin szintézist gátló HC-3 intravénás adása után.

Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

1. Természetes vérellátás mellett az általunk használt paraméterekkel ingerelve a ganglion nem meríthető ki, aktivitása hosszabb ideig a maximális szinten marad; nincs változás a szinaptikus vesiculák számában, csupán a normálistól eltérő alaku és nagyságu vesiculák számának növekedése figyelhető meg.

2. Kolin-mentes Locke-oldattal perfundálva a ganglionok ingerléssel kimerithetők, szinapszisainak axonterminálisaiban pedig a szinaptikus vesiculák számcsökkenését és az itt található mitokondriumok specifikus duzzadását sikerült megfigyelni.

3. A HC-3 kezelés önmagában nem függesztette fel a ganglionáris transzmissziót, ingerléssel kombinálva azonban az áttevődés gyors megszünését és ezzel párhuzamosan szinaptikus vesicula számcsökkenést és mitokondriumduzzadást észleltünk az axonterminálisokban.

4. Kolin-tartalmu Locke-oldattal végzett perfuzió alkalmával nem sikerült ingerléssel kimeriteni a ganglion, a preszinaptikus axon kevés szinapszisában lehet elektronmikroszkóposan eltérést kimutatni.

5. Vizsgálatainkból megállapitható, hogy a ganglion szinapszisainak finomszerkezeti megjelenése jól mutatja azok müködési állapotát. Szoros összefüggést találtunk a szinaptikus vesiculák száma és a transzmisszió mértéke között, ami igazolja az átvivőanyagnak ezen vesiculákkal való szoros kapcsolatát.

6. A szinaptikus vesiculák számának csökkenésében és a mitokondriumok duzzadásában megnyilvánuló eltérések kolin adásával kivédhetők voltak, ami arra utal, hogy az általunk különböző kisérleti körülmények között talált finomszerkezeti eltérések a transzmitter-prekurzor kolin hiánya miatt kialakuló megzavart transzmitter-szintézist jelzik.

Köszönetnyivánitás

A szerző e helyen is köszönetét fejezi ki mindazoknak, akik a disszertáció témájának kiválasztásában, elkészitésében és összeállitásában segitségére voltak.

Igy elsősorban köszönettel tartozom Dr. Fehér Ottó egyetemi docens, tanszékvezetőnek, aki a dolgozat tematikájának kiválasztásában és a szükséges életteni kisérletek elvégzésében igen nagy segitséget nyujtott.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Csillik Bertalan egyetemi tanár Urnak az elektronmikroszkópos felvételek értékelésében nyutott hasznos segitségéért, valamint Dr. Joó Ferenc és Dr. Halász Norbert tudományos munkatársaknak, akiktől a munka különböző fázisaiban kaptam értékes tanácsokat.

Köszönöm Dr. Moldovay Frigyesnének a vizsgálatok nagyszámu fotokópiáinak szakszerü és gondos kidolgozását.

Végezetül köszönettel tartozom a MTA Biológiai Tudományok Osztályának, amely a JATE Elektronmikroszkóp Laboratóriumában munkám anyagi, személyi és elvi támogatását biztositotta.

I r o d a l o m

ALTMANN, H.W.: Handbuch der algemeinen Pathologie. Springer.Verlag / 1955 /

BIRKS, R.I. and MACINTOSH, F.C.: Acetylcholine metabolism at nerve endings. Brit. med. Bull., 13. 157-161 / 1957 /

BIRKS, R.I. and MACINTOSH, F.C.: Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. Can. J. Biochem. Physiol., 39. 787-827 / 1961 /

BRIGHTMAN, M.W., REESE, T.S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J. Cell Biol., 40. 648-677 / 1969 /

BROWN, G.L., FELDBERG, W.: The acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. J. Physiol., 88. 265-283 / 1936 /

COLLIER, B., LANG, C.: The metabolism of choline by a sympathetic ganglion. Can. J. Physiol. Pharmacol., 47. 119-126 /1969/

COLLIER, B., MACINTOSH, F.C.: The source of choline for acetylcholine synthesis in a symphatetic ganglion. Can. J. Physiol. Pharmacol., 47. 127-135 /1969/

CURTIS, D.R.: The identification of mammalian inhibitory transmitters. In: Nervous inhibition. Oxford, Pergamon Press. 342-349 / 1961 /

CSILLIK, B.: A synaptikus transmissio strukturális alapjai. Doktori értekezés. / 1967 /

CSILLIK, B., JOÓ, F.: Effect of hemicholinium on the number of synaptic vesicles. Nature, 213. 508-509 / 1967 /

De LORENZO, A.J.: Electron microscopy: tight junctions in synapses of the chick ciliary ganglion. Science, 152. 76-78 / 1966 /

De ROBERTIS, E., FRANCHI, C.M.: Electron microscopic observations on synaptic vesicles in synapses of the retinal rods and cones.
J. biophys. biochem. Cytol., 2. 307-318 /1956/

De ROBERTIS, E., FERREIRA, A.V.: Submicroscopic changes of the nerve endings in the adrenal medulla after stimulation of the splanchnic nerve.
J. biophys. biochem. Cytol., 3. 611-614 /1957/

De ROBERTIS, E., PELLEGRINO De IRALDI, A., RODRIGUEZ De ARNAIZ, G. and SALGANICOTT, L.: Electron microscope observations on nerve endings isolated from rat brain.
Anat. Rec., 139. 220-221 / 1961 /

De ROBERTIS, E., PELLEGRINO De IRALDI, A., RODRIGUEZ De ARNAIZ, G. and SALGANICOTT, L.: Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and acetylcholinesterase.
J. Neurochem., 9. 23-35 / 1962 /

DYACHKOWA, L.N., HÁMORI, J., FEDINA, L.: Ultrasztruktura szinapszov v ganglion ciliare ptyic pri orto- i antidrommoj elektricseszkoj sztimulácii.
Dokl. Akad. Nauk. U.S.S.R., 172. 957-959 /1967/

DYACHKOWA, L.N., BABMINDRA, V.P.: O szinapticseszkoj organizácii szimpaticseszkovo uzla.
Arch. anat., 54. 30-39 / 1968 /

ECCLES, J.C.: The physioligy of synapses.
Springer-Verlag, Berlin / 1964 /

ELFVIN, L.G.: The ultrastructure of the superior cervical symphatetic ganglion of the cat. I. The structure of the ganglion cell processes as studied by serial sections.
J. Ultrastruct. Research, 8. 403-440 / 1963a /

ELFVIN, L.G.: The ultrastructure of the superior cervical symphathetic ganglion of the cat. I. The structure of the preganglionic end fibers and the synapses as studied by serial sections.
J. Ultrastruct. Research, 8. 441-476 / 1963b /

FATT, P., KATZ, B.: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings.
J. Physiol., 117. 1o9-128 / 1952 /

FAWCETT, W.: An atlas of fine structure: The cell.
Philadelphia and London, / 1966 /

FEHÉR, O.: Az acetilkolin-kolineszteráz rendszer szerepe a ganglionáris ingerületáttevődésben.
Kandidátusi értekezés. / 1959 /

FRIESEN, A.J.D., KEMP, J.W., WOODBURY, D.W.: The chemical and physical identification of acetylcholine obtained from sympathetic ganglia.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 148. 312-319 /1965/

GAMBETTI, P., GONATAS, N.K. and FLEXNER, L.B.: The fine structure of puromycin-induced changes in mouse enthorhinal cortex.
J. Cell Biol., 36. 379-39o / 1968 /

HALÁSZ, N., CSILLIK, B.: Experimental electron microscopic studies on excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex of the rat.
Exp. Brain Res., 9. 73-82 / 1969 /

HINOJOSA, R., ROBERTSON, J.D.: Ultrastructure of the spoon type synaptic endings in the nucleus vestibularis tangentialis of the chick.
J. Cell Biol., 34. 421-43o / 1967 /

HÖKFELT, T.: Ultrastructural studies on adrenergic nerve terminals in the albino rat iris after pharmacological and experimental treatment.
Acta physiol. scand., 69. 125-126 / 1967a /

HÖKFELT, T.: On the ultrastructural localization of noradrenaline in the central nervous system of the rat.
Z. Zellforsch., 79. 110-117 / 1967b /

HUBBARD, J.I., KWANBUNBUMPEN, S.: Evidence for the vesicle hypothesis.
J. Physiol., 194. 407-420 / 1968 /

JOÓ, F., SZOLCSÁNYI, J. and JANCSÓ-GÁBOR, A.: Mitochondrial alterations in the spinal ganglion cells of the rat accompanying the long-lasting sensory disturbance induced by capsaicin.
Life Sciences, 8. 621-626 / 1969 /

KIBJAKOV, A.V.: Über humorale Übertragung der Erregung von einem Neuron auf das andere.
Arch. f. ges. Physiol., 232. 432-443 / 1933 /

KORKES, S., del CAMPILLO, A., KOREY, S.R., STERN, J.R., NACHMANSOHN, D., OCHOA, S.: Coupling of acetyl donor systems with choline acetylase.
J. Biol. Chem., 198. 215-220 / 1952 /

KOVÁCH, A.: A kisérleti orvostudomány vizsgáló módszerei.
Budapest, / 1954 /

LARRAMENDI, L.M.H., FICKENSCHER, L., LEMKEY-JOHNSTON, N.: Synaptic vesicles of inhibitory and excitatory terminals in the cerebellum.
Science, 156. 967-969 / 1967 /

LONG, J.P., SCHUELER, F.W.: A new series of cholinesterase inhibitors.
J. Amer. Pharm. Ass., 43. 79-86 / 1954 /

LOOS, H. van der: Similarities and dissimilarities in submicroscopical morphology of interneuronal contact sites of presumably different functional character.
III. Internat. Meeting of Neurobiologist, Kiel, 43-58 / 1962 /

MACINTOSH, F.C.: Effect of HC-3 on acetylcholine turnover.
Fed. Proc. 2o. 562-568 / 1961 /

MACINTOSH, F.C., BIRKS, R.I., SASTRY, P.B.: Mode of action of an inhibitor of acetylcholine synthesis.
Neurology, 8. 9o-91 / 1958 /

MACINTOSH, F.C., BIRKS, R.I., SASTRY, P.B.: Pharmacological inhibition of acetylcholine synthesis.
Nature, 178. 1181 / 1956 /

MARCHBANKS, R.M.: The uptake of /^{14}C/choline into synaptosomes in vitro.
Biochem. J., 11o. 533-541 / 1968 /

MARCHBANKS, R.M.: The conversion of /^{14}C/choline to /^{14}C/ acetylcholine in synaptosomes in vitro.
Biochem. Pharm., 18. 1763-1766 / 1969 /

McLENNAN, H.: Synaptic transmission.
Philadelphia, / 1963 /

MILLONIG, G.: Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation.
Fifth Internat. Congress for Electron Microscopy
Philadelphia, / 1962 /

NICOLESCU, P., DOLIVO, M., ROUILLER, C., FOROGLOU-KERAMEUS, C.: The effect of deprivation of glucose on the ultrastructure and function of the superior cervical ganglion of the rat in vitro.
J. Cell Biol., 29. 267-286 / 1966 /

PALADE, G.E.: Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses.
Anat. Record, 118. 335-336 / 1954 /

PALAY, S.L.: Synapses in the central nervous system.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 2. Suppl. 193-2o2 / 1956 /

PATON, W.D.M.: Central and synaptic transmission in the nervous system.
Ann. Rev. Physiol., 2o. 431-47o / 1958 /

PATON, W.D.M., PERRY, W.L.M.: The relationship between depolarisation and block in the cat's superior cervical ganglion.
J. Physiol., 119. 43-57 / 1953 /

PEASE, D.C.: Histological techniques for electron microscopy
New York and London, / 1964 /

QUARTON, G.C., MELNECHUK, T., SCHMITT, F.O.: The neurosciences.
New York, / 1967 /

RAMÓN Y CAJAL: Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres. Vol. 2.
Paris, Maloine, / 1911 /

REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol., 17. 2o8-212 / 1963 /

ROBERTSON, J.D.: The occurence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in Mauthner cell synapses in goldfish brains.
J. Cell Biol., 19. 2o1-221 / 1963 /

SHERRINGTON, C.S.: The central nervous system. Vol. 3.
In: A Text-Book of Physiology 7th ed.,
London: Macmillan, / 1897 /

SJÖSTRAND, F.S.: The ultrastructure of the retinal rod synapses of guinea pig eye.
J. Appl. Phys., 24. 1422 / 1953 /

UCHIZONO, K.: Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous systemof the cat.
Nature, 2o7. 642-643 / 1965 /

WHITTAKER, V.P., GRAY, E.G.: The synapse: biology and morphology.
Brit. med. Bull., 18. 223-228 / 1962 /