"Csakhogy nem ami rész szerint igaz,-
Olyan kell, mi egészben s mindig az."

/Arany János: Vojtina Ars Poétikája/

A neurokémiai transzmisszió modulációja; a preszinaptikus gátlás és a membrán ATPáz jelentősége

Irta:

Vizi E. Szilveszter

Doktori értekezés

1976.

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

Tartalomjegyzék

1.	A NEUROKÉMIAI INGERÜLET ÁTVITEL FELFEDEZÉSÉNEK TÖRTÉNETE	1
1.1.	Neuron és szinapszis	1
1.2.	A kémiai mediáció, a kolinerg transzmisszió	5
2.	AZ IDEGRENDSZER INTEGRÁLT MÜKÖDÉSÉT BIZTOSITÓ GÁTLÓ JELENSÉGEK	1o
2.1.	Posztszinaptikus gátlás jelensége	1o
2.2.	Preszinaptikus gátlás jelensége	13
3.	A TRANSZMITTER FELSZABADULÁS MECHANIZMUSAI, ELMÉLETEK.	17
3.1.	Nátrium-elmélet	17
3.2.	Depolarizáció	19
3.3.	Ca-elmélet	22
3.4.	Vezikula-elmélet. Quantális felszabadulás. Exocitózis.	25
3.5.	Ion cserélő mechanizmus	29
4.	KOLINERG-NORADRENERG IDEGRENDSZER KÖLCSÖNHATÁSA. A PRESZINAPTIKUS GÁTLÁS NEUROKÉMIAI BIZONYITÁSA.	31
4.1.	A noradrenalin gátló hatása az ACh felszabadulásra	33
4.1.1.	Vegetativ végkészülék	34
4.1.1.1.	Nyugalmi felszabadulás	34
4.1.1.2.	Axonális ingerlés. A gátlás frekvencia függése.	
4.1.1.3.	A ganglion nikotin receptorainak izgatásával kiváltott ACh felszabadulás	53
4.1.1.4.	Gastrinnal és cholecystokininnel kiváltott ACh felszabadulás	55
4.1.1.5.	Preganglionáris ingerléssel kiváltott kontrakciók gátlása	6o
4.1.2.	Ganglion	61
4.1.3.	Agykéreg. ACh felszabadulás patkány és humán izolált agykéreg szeletből	65
4.1.4.	Neuromusculáris junctio	68
4.2.	A dopamin ACh felszabadulást gátló hatása	69
4.3.	ACh gátló hatása a NA felszabadulásra	7o

4.4. A preszinaptikus gátlás fiziológiai jelentőségének bizonyitása 71
4.4.1. Vegetativ idegrendszer 72
4.4.1.1. Szimpatikus idegrendszer ingerlésének gátló hatása az ACh felszabadulásra 72
4.4.1.2. A szimpatikus tónus csökkentésének ACh felszabadulást fokozó hatása 76
4.4.2. Központi idegrendszer 78
4.4.2.1. Agykéreg 79
4.4.2.2. Bazalis ganglion 83
4.5. A kolinerg-noradrenerg idegrendszer közötti kölcsönhatás morfológiai bizonyitékai 83
4.6. ACh felszabadulás humán colon Auerbach plexusából Hirschprung-betegség. 86

5. ADENOZIN NUKLEOTIDOK ACh FELSZABADULÁST GÁTLÓ HATÁSA 9o

5.1. Vegetativ idegrendszer 93
5.2. Központi idegrendszer. Agykéreg 96

6. A Na^+-K^+-AKTIVÁLTA ATPáz ENZIM PRE- ÉS POSZTSZINAPTIKUS MODULÁLÓ HATÁSA A KOLINERG NEUROKÉMIAI TRANSZMISSZIÓRA. AZ ELEKTROGÉN Na PUMPA FELFEDEZÉSÉNEK TÖRTÉNETE. 1o1

6.1. A preszinaptikus membrán Na^+-K^+-aktiválta ATPáz 11o
6.1.1. Az ACh felszabadulás, mint a Na^+-K^+-aktiválta ATPáz aktivitás gátlásának eredménye. 11o
6.1.1.1. Depolarizáció 113
6.1.1.2. Intracelluláris Na^+ emelkedés 114
6.1.1.3. Fokozott Ca belépés 116
6.1.1.4. ACh felvételének gátlása 119
6.1.1.5. Axonális tüzelés fokozódása 12o
6.1.1.6. ACh és NA felszabadulás, mint a Na^+-K^+-aktiválta ATPáz és a hozzátartozó K-függő foszfatáz enzimek aktivitás gátlásának az eredménye 121
6.1.1.7. ACh felszabadulás humán izolált agykéreg szeletből membrán ATPáz gátlás hatására 125

6.1.2. Membrán ATPáz aktivitás fokozódása és az ACh felszabadulás gátlása 126
6.1.2.1. Hiperpolarizáció 133
6.1.2.2. Intracelluláris K emelkedése 133
6.1.2.3. Intracelluláris Na csökkenése 134
6.1.2.4. Változások a Ca permeabilitásban 138
6.1.2.5. Na^+-K^+-aktiválta ATPáz aktiválódása és az ACh és a NA felszabadulásának gátlása. A NA transzmitter felszabadulást gátló és a membrán ATPázt izgató hatása közötti összefüggés 14o
6.1.3. K-aktiválta ATPáz jelentősége a transzmitter felszabadulásban. A p-nitrofenilfoszfatáz /p-NPPáz/ jelentősége 146
6.2. A posztszinaptikus membrán Na^+-K^+-aktiválta ATPáz enzimjének szerepe a szinaptikus input recepciójában 15o
6.2.1. Neuro-neuronális szinapszis 151
6.2.2. Neuro-effektoriális szinapszis 152
6.2.2.1. Simaizom 152
6.2.2.2. Harántcsikolt izom 167

7. ÖSSZEFOGLALÁS 168
7.1. A NA ACh felszabadulást gátló hatása, a jelenség klinikai jelentősége. A preszinaptikus gátlás fiziológiai jelentősége 168
7.2. A membrán ATPáz szerepe a transzmitter felszabadulásban és a neurokémiai transzmisszió modulálásában 182

8. APPENDIX 192
8.1. Kolinerg neurokémiai ingerület átvitel mérése 192
8.1.1. Tengeri malac ileum izolált hosszanti simaizom--Auerbach plexus készitmény. ACh felszabadulás által kiváltott kontrakciók mérése 192
8.1.2. Tengeri malac vagus-gyomor preparátum 194
8.1.3. Tengeri malac caecum "taenia coli" preparátum 195
8.1.4. Emberi colon hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátum 195

8.2. Elektromos ingerlés 196
8.2.1. "Field"-ingerlés 197
8.2.2. Intermittáló ingerlés 197
8.3. ACh biológiai titrálása 198
8.4. Az acetylcholin gélkromatográfiás tisztitása és biológiai meghatározása 2o4
8.5. Emberi és állati szövetekből nyert ACh-nak titrált spasmogén anyag azonositása ismert ACh-al, illetőleg ^{14}C-Acetylcholin-al G-1o-es Sephadex segitségével 2o8
8.6. Simaizom sejtek elektromos és mechanikai aktivitásának párhuzamos mérése "sucrose-gap" módszer segitségével 2o9
8.7. C-rostok intracelluláris kation /Na^+,Ca^{2+},Mg^{2+}/ tartalmának mennyiségi meghatározása emissziós szinképelemzéssel 213

9. IRODALOM

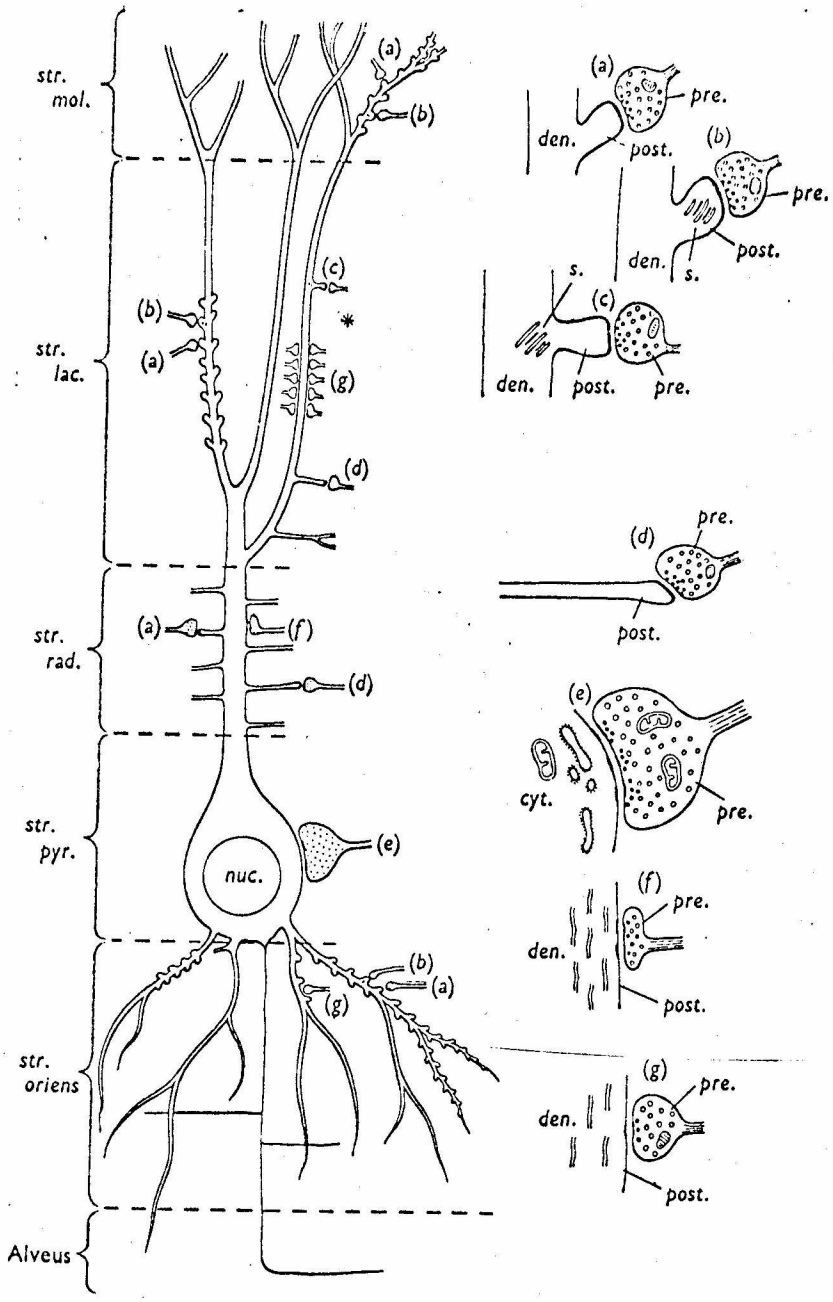
"If there exists any surface or separation at the nexus between neurone and neurone, much of what is characteristic of the conduction exhibited by the reflex-arc might be more easily explainable...In view, therefore, of the probable importance physiologically of this mode of nexus between neurone and neurone, it is convenient to have a term for it. The term introduced has been synapse."

Charles S.Sherrington,
The Integrative Action of
the Nervous System, 1906.

1. A NEUROKÉMIAI INGERÜLET ÁTVITEL FELFEDEZÉSÉNEK TÖRTÉNETE

1.1 Neuron és szinapszis

RAMON Y CAJAL, spanyol neuroanatomus mutatta ki elsőként, hogy az idegrendszert morfológiailag egymástól független anatómiai egységek, neuronok alkotják. Ez a felfedezés képezte a n e u r o n e l m é l e t alapját, melyet aztán számtalan támadás ért. Mivel a központi idegrendszer funkcionálisan egységet képez, jogosan merül fel a kérdés; hogyan válik a szinte végtelen számu neuronból /10^{10}/ egyetlen koordináltan müködő egység? Mi biztositja a neuronok között a kapcsolatot? SHERRINGTON szinapszisnak nevezte el /synapto görög szó, s azt jelenti: szorosan kapcsolódni/ azt a morfológiai és funkcionális egységet, ami a neuronok között a kapcsolatot biztositja. Az 1. ábra mutatja a szinaptikus végződések polimorfizmusát. A dendriteken és a sejttesten nagy mennyiségü szinapszist lehet találni. Ez biztositja az agy müködés szempontjából oly fontos konvergencia lehetőségét. Tehát, hogy az esetleg több ezer neurontól kapott ingert /információt/ csak egy neuron vezesse tovább, most már mint egy summácios ingert.



1. ábra. Különböző szinapszisok,

/Hamlyn,J.Anat.97:100,1963/

Az idegingerület áttevődése kémiai uton történik a szinapszisokban. Kivételt az ephapsis képez /FURSHPAN 1964/, ahol az akciós potenciál elektromos uton és csak igen kis

késedelemmel /1. táblázat/ terjed át a preszinaptikus lemezről a dendritre vagy a szomára.

1. táblázat

Szinaptikus késés a különböző szinapszisokban

	Áttevődés iránya	Szinaptikus késés/msec/
"Ephapsis" /elektromos szinapszis/	egyirányu	0,12 x
Interneuronális szinapszis /kémiai szinapszis/	egyirányu	0,5-0,8 xx
neuro-effektriális szinapszis /kémiai szinapszis/	egyirányu	0,6-35,o

x FURSHPAN és POTTER /1969/. Folyami rák motoros óriás szinapszisa

xx MILEDI és SLATER /1966/. Squid axon.

Az onto- és a filogenezis során a szinapszis specializáltan alakul ki /1. HÁMORI 1974/. Mivel csak a preszinaptikus végkészülék tartalmaz transzmitter /átvivő/ anyagot és posztszinaptikusan helyezkednek el a kémiai mediátor anyagra érzékeny receptorok, igy tulajdonképpen a szinapszis egyenirányitja az interneuronális kapcsolatot.

Transzmitter vagy mediátor anyagnak azt a kémiai vegyületet nevezzük, amely a preszinaptikus membránból akciós potenciál /AP/ hatására szabadul fel, és a szinaptikus résen keresztül eljutva a posztszinaptikus membránig, kifejti a hatását /ionok iránt megváltoztatja a membrán permeabilitását/ és tovaterjedő AP-t generalizál. A mediátor anyag preszinaptikusan képződik, raktározódik, ingerlésre felszabadul és a szinapszisban jelenlevő elbontó enzimjeinek hatására metabolizálódik,

1.2 A kémiai mediáció, a kolinerg transzmisszió

A neurokémiai transzmisszió elméletének első uttörői ELLIOT /19o4/ és DIXON /19o6/ voltak. ELLIOT már 19o4-ben feltételezte, hogy a szimpatikus idegek ingerlésekor olyan kémiai anyag szabadul fel, amely az adrenalin hatásával azonos. DIXON viszont kimutatta, hogy a paraszimpatikus idegek ingerlésekor muszkarinszerü anyag szabadul fel és ez okozhatja a bél összehuzódásait. Mindezt akkor állitották, amikor egyértelmüen azt vallotta a tudományos világ, hogy ideg ingerléskor elektromos áram keletkezik és ez vezetődik tova a szinapszison keresztül.

ADOLF VON BEYER az agy kémiáját tanulmányozva fedezte fel elsőként, hogy a korboncolásból származó emberi agy jelentős mennyiségben kolint tartalmaz és ő volt az első, 1867-ben, aki közölte az ACh szintézisnek kémiáját. A ma már

kolineszteráz bénitónak ismert ezerint FRASER irta le 1863-ban az Edinburg Medical Journal-ben. A muscarin receptoron izgató hatással rendelkező alkaloidot a pilokarpint HARDY /1875/ és GERRARD /1875/ fedezte fel. Kémiai szerkezetét JOWETT /19oo, a,b,/ irta le. LANGLEY már 1876-ban megállapitotta, hogy a pilokarpin nyál szekreciót okozó hatása nem ganglion izgatás eredménye, hanem a nyálmirigyekre kifejtett direkt hatás következménye: kisérleteiben az atropin meggátolta a hatást, nikotin hatástalannak bizonyult. WEBER 1876-ban a pilokarpint már mint miotikumot használja szemészeti célra. A muscarin hatásait SCHMIEDEBERG és KOPPE /1869/ irta le először egy monográfiában.

Henry DALE az 191o-es években egy véletlen felfedezés folytán kezdett el foglalkozni azzal a problémával, ami végülis a kolinerg transzmisszió felfedezéséhez vezetett. Mint a Wellcome Physiological Laboratory munkatársa ergot alkaloidok hatásmechanizmusával foglalkozott. Macska vérnyomásán a kivonat hatását vizsgálva megfigyelte, hogy a kivonat ahelyett, hogy emelné a tenziót, hirtelen rendkivül gyors vérnyomás süllyedést és sziv megállást okozott. A felfedezést DALE igy irja le: "At soma date in the autumn of 1913, while I was still holding my appointment at the Wellcome Laboratories, I had received for testing a particular extract of ergot which exhibited, quite anomalously and, so far as I know, uniquely, a

potent activity of the muscarin type" /DALE 1958/. A laboratórium vegyészével kideritették, hogy ez a hatékony vegyület ACh /DALE és EWINS 1914/. A bázis, amit izoláltak rendkivül nagy higitásban is hatékonynak bizonyult s a kisérleti eredmények felett átvirrasztott éjszakán egy hirtelen jött gondolat irányitotta DALE figyelmét arra, hogy a kitisztitott bázis, - amely egyébként alkáli szenzitivnek bizonyult - ACh. Következő nap reggel EWINS, DALE tanácsára kolint acetilálva ACh-t állitott elő, és ennek farmakológiai hatásai /DALE 1914/15 / teljesen azonosak voltak az ergot alkaloidokból nyert észterrel. DALE 1914-ben közölt, ma már klasszikusnak számitó alapvető dolgozatában, az ACh hatásait csoportositotta muszkarin-szerü és nikotin-szerü hatásokra; a meghatározás ma is igaz. LOEWI NAVRATIL-lal együtt /LOEWI és NAVRATIL 1926/ felfedezte a fizosztigmin kolineszteráz bénitó hatását. Az igazsághoz hozzátartozik azonban, hogy FÜHNER már 1918-ban /a,b/ megállapitotta, hogy pióca hátizmon az ACh hatását az eserin /fizosztigmin/ potencirozza; a hatás egy milliószor lett erősebb. FELDBERG /1968, cit. HOLMSTEDT, 1975/ tulajdonképpen FÜHNER módszerét használva határozta meg a felszabaduló ACh mennyiségét.

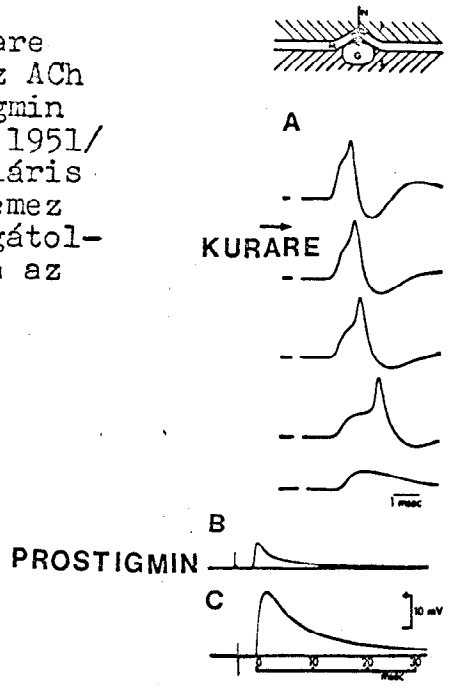
A neuro-kémiai áttevődés első direkt bizonyitéka 1921-ben született, amikor Otto LOEWI felfedezte, hogy a vagus ingerlésekor a békasziv oldata leállitja a másik szivet is.

Sir Henry DALE acetilkolinnal /ACh/ végzett farmakológiai kisérletei lehetővé tették, hogy a Vagusstoff-ot azonositsák az acetilkolinnal. A 3o-as években London egyik öreg kórházának laboratóriumában, Hamsteadben Sir Henry DALE és a köré csoportosult kutatók /GADDUM,BROWN,FELDBERG, VOGT/ igazolták, hogy az ACh mediátor anyag.

DALE és DUDLEY voltak az elsők, akik emlős állat szervéből, a lépből ACh-t izoláltak. DALE és mtsai most már LOEWI zseniális alapötletéből kiindulva a szervezet több feltételezett neuro-kémiai áttevődési helyén kimutatták a transzmitter anyagot, az ACh-t. Kimutatták, hogy a vagus gyomorban végződő végkészülékeiből /DALE és FELDBERG 1934 a/

2. ábra

Az ACh antagonista kurare /A,KUFFLER, 1942/ és az ACh elbomlást gátló prostigmin /B és C, FATT és KATZ, 1951/ hatása béka neuromusculáris junctiojában mért véglemez potenciálra. A kurare gátolta a prostigmin fokozta az EPP nagyságát.



szimpatikus postganglionáris izzadság mirigyekhez futó rostjaiból ACh szabadul fel /DALE és FELDBERG 1934 b/. Az ACh transzmitter szerepét többek között igazolták a neuro-muszkuláris junkcióban /DALE, FELDBERG és VOGT 1936/, a mellékveséhez vezető splanchnicus idegben /FELDBERG, MINZ és TSUTZIMURA, 1933/ és a szimpatikus ganglionban /FELDBERG és GADDUM, 1934/. Mindezek a bizonyitékok azonban még hosszu évtizedekig nem voltak elegendőek a kémiai mediáció tanának elfogadásához, mivel az elektrofiziológusok bizonyitékok ellenére sem fogadták el a gyors kémiai transzmisszió lehetőségét a szinapszisban.

LOEWI és DALE felfedezései, amelyek a neuro-kémiai mediáció alapvető bizonyitékai, idővel elfogadottakká váltak és bebizonyosodott, hogy azok a központi idegrendszer területén is érvényesek.

DALE és mtsai igazolták, hogy a vegetativ és szomatikus idegek ingerlésekor ACh szabadul fel. Farmakológiai, továbbá elektrofiziológiai módszerekkel egyértelmüen igazolták, igy többek között KUFFLER /1942, 2. ábra/ is, hogy ACh antagonisták /Kurare, nikotin/ alkalmazása esetén az endogén, ill. exogén ACh iránt a posztszinaptikus membrán érzékenysége megszünik és gátolt a neurotranszmisszió is. Ezen bizonyitékok ellenére sem fogadták el az elektrofiziológusok /SHERRINGTON, ADRIAN, GASSER, HODGKIN, HUXLEY, ECCLES/, hogy a neuronok között a szi-

napszisban kémiai mediátor anyag közvetiti az ingerületet. A világ tudományos közvéleménye a minden kétséget kizáró bizonyitékok ellenére sem volt hajlandó elfogadni a kémiai mediáció jelenségét. 3o évnek kellett eltelnie, hogy a tekintély-elven alapuló tudományos meggyőződés megváltozzon és elfogadják a neurokémiai mediáció tanát. De jellemző módon ehhez is az kellett, hogy a zseniális SHERRINGTON tanitvány, ECCLES, aki az elektromos áttevődés egyik pápájának számitott, saját maga is beismerje tévedését és elektrofiziológiai bizonyitékokat szolgáltatva a kémiai mediáció tanához, elfogadja azt. Az ötvenes évek elején ECCLES, majd KATZ és munkatársainak munkája nyomán vált csak általánosan elfogadottá a szinapszis kémiai mediációja.

2. AZ IDEGRENDSZER INTEGRÁLT MÜKÖDÉSÉT BIZTOSITÓ GÁTLÓ JELENSÉGEK

2.1 Postszinaptikus gátlás jelensége

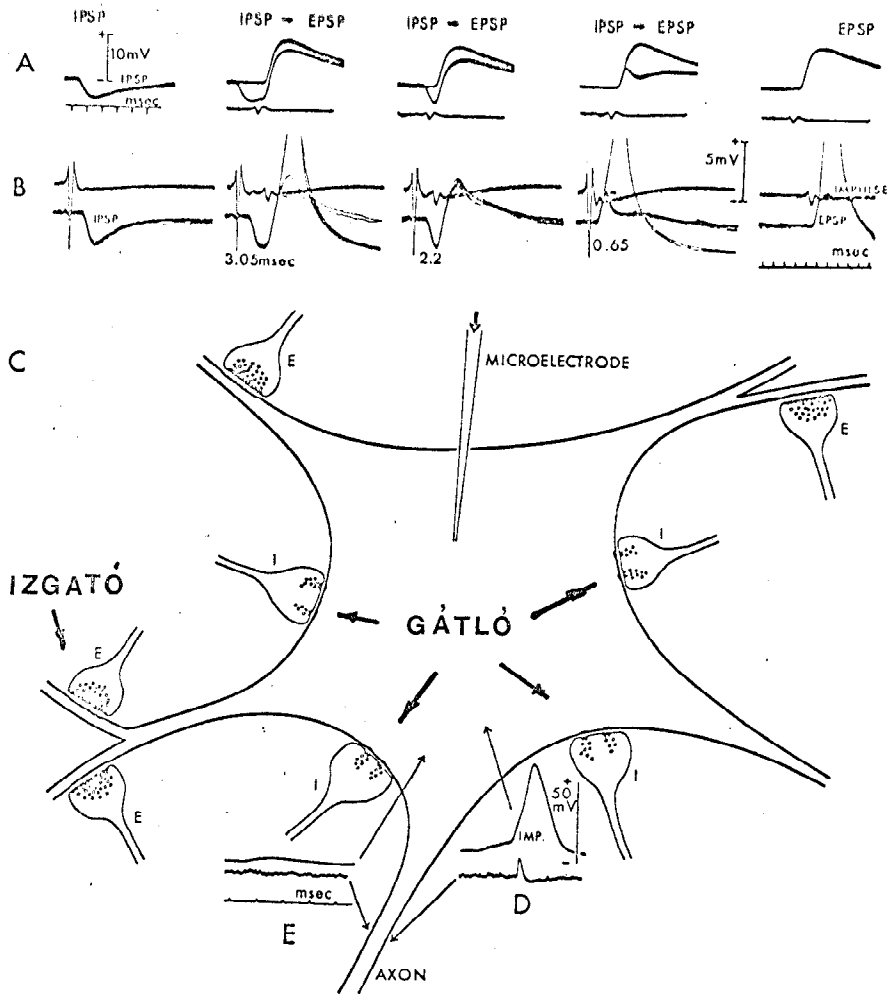
A neurokémiai transzmisszió gátolhatósága teszi lehetővé, a neuron hálózatok müködésének plaszticitását. A preszinaptikus membránból felszabaduló transzmitter anyag a posztszinaptikus membrán ionok iránti permeabilitását megváltoztatja és izgató posztszinaptikus potenciált /EPSP, Excitatory Post Synaptic Potential/ vált ki. Ez a hatás főleg a Na permeabilitás fokozásával van összefüggésben. Ugyanakkor néhány transzmiiter anyag hatására szelektiven a K és Cl iránti permeabilitás növekszik

meg s ebben az esetben gátló posztszinaptikus potenciál /IPSP, Inhibitory Post Synaptic Potential/ jön létre. Az IPSP a posztszinaptikus membránon gátolja az EPSP-t. 3. ábra mutatja, hogy az IPSP hatására, amelyet valószinüleg glicin vagy GABA vált ki, gátlódik az izgató transzmitter, az ACh hatására létrejövő EPSP. ECCLES és mtsai szerint /1. ECCLES 1964/ a központi idegrendszerben a neuronok vagy izgató vagy gátló transzmittert tartalmaznak - sohasem mindkettőt -. Ezt az elgondolást sokan támadták. Tulajdonképpen a DALE elven alapszik: egy neuron - egy transzmitter.

A posztszinaptikus gátlásnak két alapvető formája müködik.

A "recurrent" gátlás és "afferent collateral" gátlás /4. ábra/. Mindkét esetben egy gátló sejt izgatásának eredményeképpen vagy a dendriten vagy a szómán lévő szinapszisban ingerület áttevődés játszódik le, IPSP keletkezik.

Ma már általánosan elfogadott, hogy supraspinálisan a gátló transzmitter anyag a GABA, spinálisan a glicin /ECCLES, 1973/.

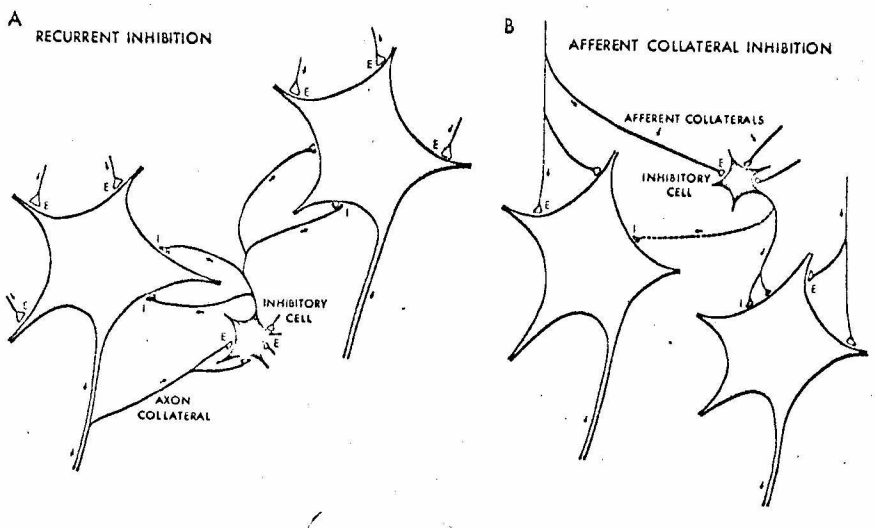


3. ábra

Izgató és gátló szinapszisok. ECCLES /1973/.

E, excitatory, izgató

I, inhibitory, gátló.

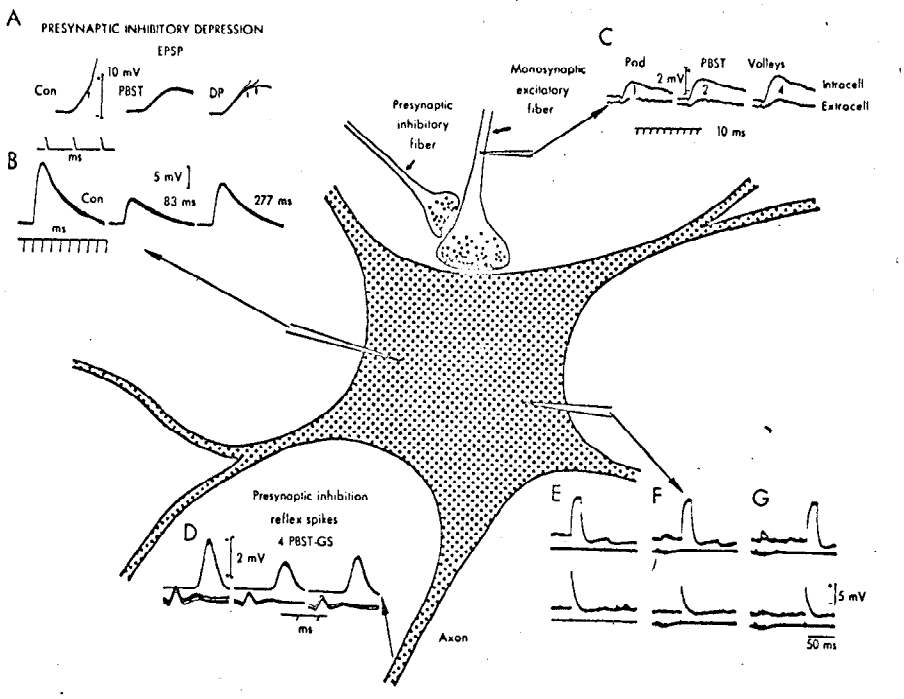


4. ábra

Rekurrens gátlás /A/: axon kollaterális segitségével gátolja saját magát. Afferens kollaterális gátlás /B/.

2.2 Preszinaptikus gátlás jelensége

A posztszinaptikus gátlásban a gátló hatás az effektor sejten érvényesül: hyperpolarizáció jön létre. Igy az izgató transzmitter depolarizáló hatása /Na^+ belépést fokozó hatása/ kevésbé vagy egyáltalán nem érvényesül. A preszinaptikus gátlásnál viszont a posztszinaptikus membrán érzékenysége változatlan marad, de a preszinaptikus membránból felszabaduló transzmitter



5. ábra

A preszinaptikus gátlás elektrofiziológiai bizonyitékai /A-G: ECCLES, Prog.Brain Res.12:65,1965; E-G: EIDE, JURNA és LUNDBERG, "Conduction Measurements from Motoneurones during presynaptic inhibition" in C.von EULER, S.SKOGLUND és V.SÖDERBERG /eds/, Structure and Function of Inhibitory Neuronal Mechanism, Pergamon,New York,1968, p.215/.

mennyisége lecsökken. DUDAL és KUFFLER /1961/ folyami rák neuromuszkuláris junkcióján észlelte először, hogy a kvantal kontent csökken le GABA hatására. Kisérleteikben indirekte következtettek a transzmitter felszabadulás csökkenésére elektrofiziológiai módszert alkalmazva ! ECCLES, ECCLES és MAGNI /1961/ a szemitendinozus idegének ingerlésekor gastrocnemiussoleus motoneuronján az EPSP gátlását észlelte, anélkül, hogy a hozzátartozó idegsejten nyugalmi potenciál változás fellépett volna. A gátlás kb. 2oo msec-ig tartott. ECCLES szerint /1973/ "presynaptic inhibition is explained by the following sequence of events. Impulses on the presynaptic inhibitory fiber depolarize the presynaptic terminal, as can be seen in the intracellular recordings from it in Fig. 3-12C/ A disszertációban 5. ábra/, for one, two or four stimuli to the presynaptic inhibitory input. As a consequence of this depolarization, the action potential of impulses in the presynaptic terminal is diminished in size, which entails a depression of output of transmitter".
Véleménye szerint a GABA a preszinaptikus gátló transzmitter, hatása szelektive gátolható bicuculline-val és pikrotoxinnal /CURTIS és FELIX, 1971/, GABA depolarizálja a preszinaptikus membránt, amely hatása a Na permeabilitás fokozásával van összefüggésben. A preszinaptikus gátlás jelenségét emlősökön csak a "primary afferent" szintjén mutatták ki, az agy magasabb szintjein még nem.

A noradrenalin preszinaptikus gátló hatását, tehát hogy gátolni képes az ideg ingerlésre felszabaduló izgató transzmitter, az ACh felszabadulását, először VIZI /1968/ és PATON és VIZI /1969/ mutatták ki axonálisan ingerelt Auerbach'plexuson. Ez volt a preszinaptikus gátlás első direkt neurokémiai bizonyitéka. NISHI és NORTH 1973-ban elektrofiziológiailag is bizonyitotta Auerbach plexuson a NA preszinaptikus gátló hatását. Később kimutatták /VIZI és KNOLL, 1971/, hogy a bél szimpatikus idegének ingerlése gátolja a felszabaduló ACh mennyiségét, bizonyitva a jelenség fiziológiai jelentőségét. HIRST és McKIRDY /1974/ elektrofiziológiai kisérletekben azt találta, hogy a perartériális, szimpatikus ideg ingerlésekor az Auerbach plexusban az axonalis ingerléssel kiváltott EPSP-k száma lecsökken. Bebizonyosodott, hogy a NA izolált patkány egy cortex kolinerg végkészülékéből is gátolja az ACh felszabadulását /VIZI, 1972/, ezzel neurokémiailag is igazolódott, hogy supraspinálisan is van preszinaptikus gátlás. Későbbiekben STARKE /1971/, FARNEBO és HAMBERGER /1971/, LANGER és mtsai /1971/ STJARNE /1973/ továbbá VIZI és mtsai /1973/ kimutatták, hogy a NA gátolja a preszinaptikus membránból a NA felszabadulását. Ez a felismerés a preszinaptikus gátlás jelenségének további neurokémiai igazolását jelenti.

3. A TRANSZMITTER FELSZABADULÁS MECHANIZMUSA. ELMÉLETEK

Az idegsejtben generalizálódott akciós potenciál végigfut az axonon, s ha eléri a végkészüléket, helyi depolarizációt okoz. Az AP, illetőleg a helyi depolarizáció alatt Ca^{2+} lép be, amelyet bizonyos késéssel követ a kémiai mediátor anyag felszabadulása.

3.1. Nátrium-elmélet

FATT és KATZ /1952/ voltak talán az elsők, akik arra gondoltak, hogy a Na^{+} belépése lenne felelős az ACh felszabadulásáért. Elképzelésüket arra a kisérleti tényre alapozták, hogy neuromuscularis junctioban e.p.p.-t /end plate potential/ mérve alacsony nátrium koncentrációnál az e.p.p. gátolva volt. DEL CASTILLO és KATZ /1955/ néhány évvel később kimutatták, hogy nem a transzmitter felszabadulás gátlása miatt volt gátolva a posztszinaptikusan intracelluláris technikával mért potenciál, hanem a posztszinaptikus membrán vesztette el az érzékenységét az ACh iránt az alacsony külső Na^{+} koncentráció mellett Igy FATT és KATZ /1952/ előbb emlitett elképzelése nem nyert bizonyitást. BIRKS /1963/ szerint a felszabaduló ACh mennyisége arányos az intraterminalis Na^{+} koncentrációval. Tehát ingerlés során azért van transzmitter-felszabadulás, mert az AP alatt Na^{+} lép be az intraterminális térbe. KATZ és MILEDI /1967/ viszont bebizonyitotta, hogy nátrium ion nem okvetlenül szükséges a transzmitter felszaba-

duláshoz. TTX jelenlétében, tehát a Na belépés teljes gátlásánál is észleltek transzmitter felszabadulást, ha depolarizálták a preszinaptikus membránt /KATZ és MILEDI 1969/. Az extracelluláris Na^+ Ca^{2+}-al való helyettesitésénél is szabadul fel ACh. Ezek az adatok is cáfolják BIRKS /1963/ elképzelését.

RAHAMIMOFF /197o/ azt találta, hogy ha az extracelluláris Na-t kálciummal cserélte fel, a végkészülék depolarizációja még mindig képes volt ACh-t felszabaditani. PATON és mtsai /1971/, VIZI /1972/ kimutatták, hogy a nátrium teljes megvonása fokozott ACh felszabaduláshoz vezet. GARCIA és KIRPEKAR /1973/ ugyanezt észlelte noradrenalin felszabadulást vizsgálva. Li^+, amely az intracelluláris Na^+ koncentráció csökkenéséhez vezet, szintén emelte az ACh felszabadulását /VIZI és mtsai 1972/. Ezekben a kisérletekben az intracelluláris Na^+ koncentráció lecsökkent és mégis fokozott ACh felszabadulás volt észlelhető, igy BIRKS elmélete nem fogadható el. BIRKS később módositotta elméletét /BIRKS és COHEN 1968/ és eszerint már az AP során belépő Na-nak az volna a feladata, hogy egy következményes Ca^{2+} belépést okozzon, és ez idézné elő, az ACh felszabadulását. Ez az elmélet tulajdonképpen csak egy változata a klasszikus kálcium elméletnek: megmagyarázza a kálcium belépés okát.

3.2. Depolarizáció

Az AP végigfut az axonon, és a végkészüléket elérve ott depolarizációt okoz. Figyelembe véve a Nernst-egyenletet a külső K^+ koncentráció emelésével csökkenteni lehet a nyugalmi potenciált és fokozni a felszabaduló transzmitter mennyiségét. BROWN és FELDBERG már 1936-ban ganglionban ezt találta.

Ha a kolinerg végkészülék ugy müködik, mint egy K-elektróda és követi a Nernst egyenletet, akkor a membrán potenciál /V_m/

$$V_m - E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{K_o^+}{K_i^+},$$

ahol V_m = membrán potenciál,

E_K = K equilibrium potenciál,

R = 8.314 joule/fok,

T = 273 + t, t = kisérleti hőmérséklet: 35°C,

z = 1 /K^+ oxidációs száma/,

F = 96500 Cb /Faraday féle állandó/,

K_o^+ = extracelluláris K^+ koncentráció,

K_i^+ = intracelluláris K^+ koncentráció.

Kimutatták, hogy a patkány agyból preparált szinaptoszóma ugy müködik, mint egy tökéletes K-elektróda /BLAUSTEIN és GOLDRING, 1975/. Igy jogos feltételezni, hogy a végkészülék funkcionális egységben is hasonlóan viselkedik. A végkészülék intracelluláris K^+ koncentrációját RANG és RITCHIE

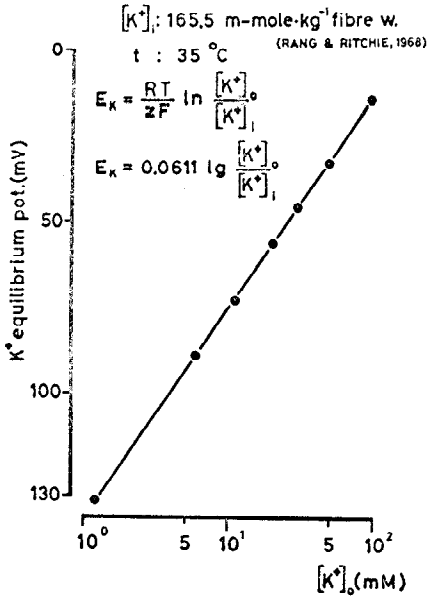
/1968/ vagus C-roston nyert adatait véve figyelembe 165.5 mM-nak vettük. Az egyenletbe behelyettesitve

$$E_K = 0.0611 \log \frac{K_o^+}{K_i^+}$$

$$E_K = 0.0611 \log \frac{165.5}{5.9}$$

$$E_K = 0.0885 \text{ V}$$

$$E_K = 88.5 \text{ mV}$$

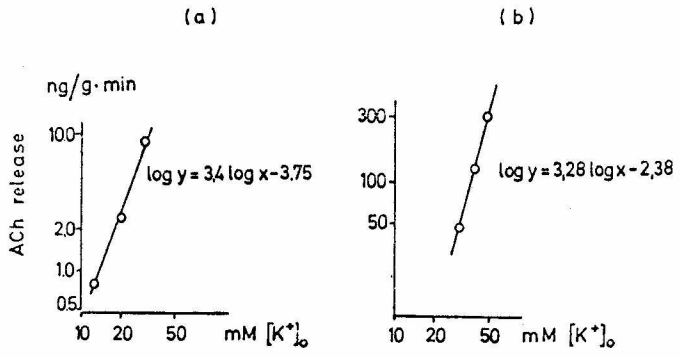


Tehát 5.9 mM $/K^+/_o$ mellett elméletileg 88.5 mV a nyugalmi potenciál.

Ez az érték 24.7 illetőleg 47.3 mM $/K^+/_o$ mellett elméletileg 5o.5, illetőleg 33.2 mV. Mivel a nyugalmi potenciál változása is csak akkör követi a Nernst egyenletet, ha $/K^+/_o$ 2o mM, igy igen valószinü, hogy a $/K^+/_o$ koncentráció emeléssel együttjáró nyugalmi potenciál változás okozza az ACh felszabadulást.

LILEY /1956/ a neuromuscularis junctioban a miniatür potenciálok frekvenciája és a külső K koncentráció között 4-ed foku összefüggést talált. PATON és mtsai /1971/ Auerbach-plexusból kálium hatására felszabaduló ACh menynyiségét mérték direkt módon és szintén 3-4 foku össze-

függést találtak. Patkány izolált cortex-szeletéből felszabaduló ACh mennyiségére vonatkozóan hasonló összefüggést találtak /VIZI és mtsai 1972/ /6. ábra/. Ezekből a kisérletekből azt a következtetést lehetne levonni, hogy a végkészülék depolarizációja lenne az egyedüli felelős a transzmitter felszabadulásért. Azonban KATZ és MILEDI /1967/ kimutatták, hogy kálciumnak kell az oldatban lenni



6. ábra

Az acetilkolin /ACh/ felszabadulás függése a külső K^+ koncentrációtól. /a/ patkányagykéreg. /b/ Auerbach--plexus tengerimalac ileumból. Az adatok PATON és mtsai /1971/ és VIZI és mtsai /1972/ dolgozatából

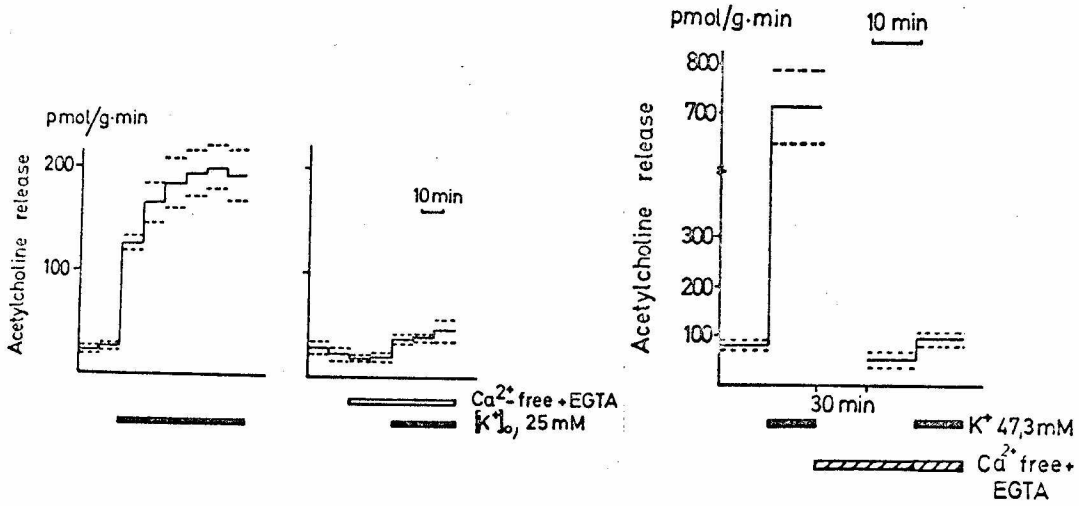
ahhoz, hogy a depolarizáló pulzus transzmittert szabaditson fel. Így tulajdonképpen a végkészülék átmeneti depolarizációja kálcium belépést eredményez, amely felelős a

"stimulus-secretion coupling"-ért, a transzmitter felszabadulásért.

Van olyan elképzelés is, hogy a preszinaptikus membrán polarizációja szerepet játszana a pozitiv töltéssel rendelkező vezikula mozgatásában és a membránnal való átmeneti egyesülésében /BASS és MORE 1966/. DEL CASTILLO és KATZ /1957/ szerint viszont a depolarizáció fokozza azoknak a helyeknek a számát, amelyek a receptorral kombinációba lépnek és létrejön az exocitózis. HUBBARD és mtsai /1967/ véleménye szerint a depolarizáció fokozza a kálcium komplex, CaX, /DEL CASTILLO és KATZ 1954; COOKE és mtsai 1973/ belépését, amely viszont a membránt teszi alkalmassá, hogy a vezikula kiüritse rajta keresztül a tartalmát.

3.3. Ca elmélet

Általánosan ismert, hogy ha az extracelluláris térből megvonjuk a Ca^{2+}-t a kémiai szinapszis nem müködik, az impulzus nem jut át a preszinaptikus membránról a posztszinaptikus membránra. KATZ és MILEDI /1965; 1969/ kimutatták, hogy Ca^{2+} hiányában habár az idegi impulzus depolarizálja a végkészüléket, transzmitter nem szabadul fel.



7. ábra

A végkészülék depolarizációja által kiváltott ACh felszabadulás /Ca/$_o$ függősége. Krebs oldat, 37°C, 95% O_2+ 5% CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml.

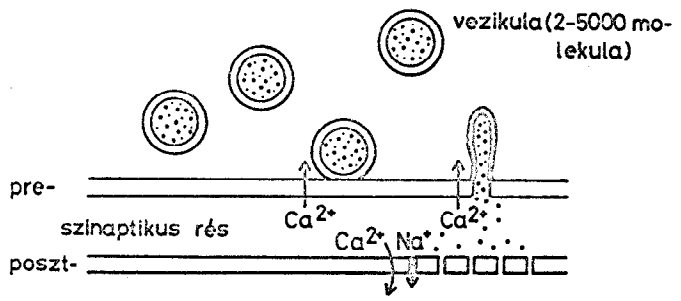
/A/ Patkány izolált agykéreg szelet.
/B/ Tengeri malac ileum izolált preparátum.

EGTA jelenléte nagyon fontos, mert különben valószinüleg az intracelluláris eredetü Ca jelenléte miatt a magas K_o ACh felszabaditó hatása Ca_o független tünik ! Ca-mentes Krebs oldatban 0.009 mM-nak találtuk a Ca koncentrációját. Figyelembe véve, hogy a stabilitási konstans 7.6 x 10^6 /pH 7.3/ EGTA jelenlétében a kiszámitott Ca koncentráció 1.2 x 10^{-9} M.

A 7.a és b ábrák mutatják, hogy magas K^+ koncentráció /47.3 mM/ okozta depolarizáció ACh-t felszabaditó hatása is Ca^{2+} függő. KATZ és MILEDI /1967; 1969/ igazolta,

hogy a Ca^{2+} influx a legfontosabb az ACh felszabadulásban. BIRKS és COHEN /1968/ tovább fejlesztve BIRKS /1963/ elméletét, a transzmitter felszabadulást most már nem az intracelluláris Na^{+} felszaporodásával, hanem az ezt követő Ca^{2+} belépéssel magyarázta. Ez az elmélet nagyon jó összhangban áll azzal a megfigyeléssel, hogy a Ca^{2+} influx fokozódik ouabain kezelésnél /BAKER és mtsai, 1969; STAHL és SWANSON, 1969/, akciópotenciálnál /KATZ és MILEDI, 1965; 1967; MILEDI és SLATER, 1966/, valamint tartós depolarizációnál /HODGKIN és KEYNES, 1957/. Valamennyi kisérleti feltételről ugyanakkor ismert, hogy fokozott ACh felszabadulást eredményez.

BAKER, BLAUSTEIN, HODGKIN és STEINHARDT /1967/ és BAKER és BLAUSTEIN /1968/ tintahal óriás axonján és tengeri rák idegén kimutatták, hogy az intracelluláris Na^{+} koncentráció emelkedésével párhuzamosan emelkedik a Ca^{2+} belépés.



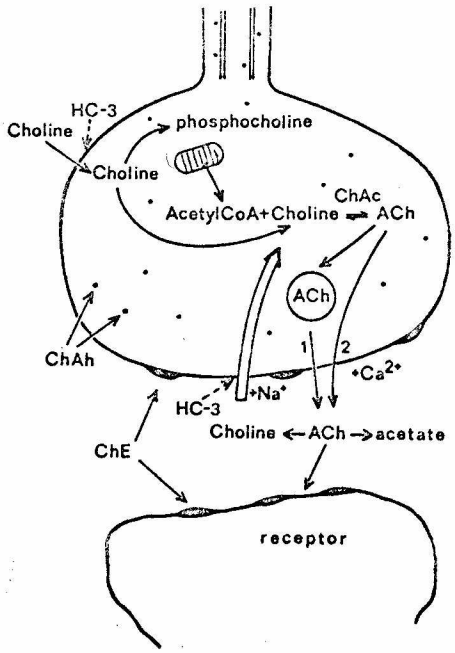
8. ábra

A szinapszis vázlatos szerkezete, az exocitózis. /ECCLES, 1973 ábrája nyomán/.

9. ábra

Kolinerg végkészülék vázlatos sémája.

Az ACH felszabadulás Ca-függő: 1. exocitózis, 2. citoplazmából való felszabadulás. A ChE pre- és posztszinaptikusan egyaránt előfordul.



3.4. Vezikula-elmélet. Quantalis felszabadulás. Exocitózis.

A szinaptikus vezikula morfológiai felfedezése 3 évvel később történt, mint ahogy FATT és KATZ /1950/ leirta elektrofiziológiai kisérleteik alapján a miniatür végkészülék potenciált /m.e.e.p./. FATT és KATZ arra a konkluzióra jutottak, hogy a neuromuscularis junctióban a transzmitter anyag /ACh/ sok molekulát tartalmazó csomagokban szabadul fel. Ezeknek a csomagocskáknak a tartalma megközelitően azonosnak bizonyult /néhány ezer ACh molekula/. KATZ /1958/ szerint a lényegesen nagyobb szinaptikus potenciál ugy keletkezik, hogy e kis csomagocs-

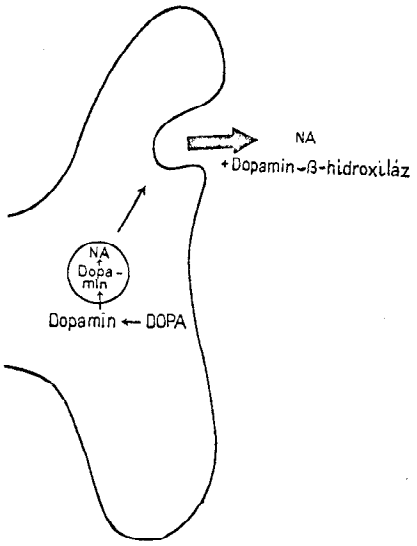
kák szinkron szabadulnak fel, és az egy időben történő felszabadulás a posztszinaptikus membránon nagyobb hatást fejt ki.

DE ROBERTIS és BENNETT 1954-ben a kémiai szinapszisban 5oo Å nagyságu vezikulákat talált. DE ROBERTIS-ék leirták /l. DE ROBERTIS 1972/, hogy a vezikula szám denerválás után, ingerlés és magas K^+ jelenlétében lecsökken.

Idegingerlés hatására a végkészülék vezikuláinak átrendeződését észlelték /HUBBARD és KWANBUNBUMPEN 1968, JONES és KWANBUNBUMPEN 1968, CSILLIK és BENSE 1971/. A vezikula-elméletet támogatnák, CSILLIK és BENSE /1971/ kisérleti adatai. Kisérleteikben az ingerlés hatására a vezikulák főleg a preszinaptikus membrán közelében halmozódtak fel. Az ACh szintézisét gátló hemikolin jelenlétében ez a sajátos megoszlás nem jött létre, és a vezikulaszám is csökkent /CSILLIK 1974/. Ingerlés hatására nem észleltek vezikulaszámcsökkenést a ganglion cervicale superiorban, ha azt vérrel áramoltatták át /PÁRDUCZ és FEHÉR 197o/. BIRKS /1971/ ugyanakkor jelentős csökkenés észlelt. PÁRDUCZ és mtsai /1971, 1974/ ugyanebben a szervben a funkció vizsgálata mellett elektronmikroszkóposan tanulmányozták a vezikulaszám alakulását. Megállapitották, hogy kolin-mentes Locke-oldat jelenlétében a transzmisszió gátolt, és a vezikulaszám is alacsony. Ezek az adatok is a vezikulaexocitózis

elméletet látszanak alátámasztani, bár nem szolgáltatnak direkt bizonyitékot, hogy a szinaptikus résben felszabadult ACh egyenesen a vezikulából származik. Elképzelhető, hogy a vezikula csak raktározna, és a citoplazmában levő ACh szabadulna fel. Igy a vezikulaszám és a felszabadult ACh mennyisége között csak másodlagos összefüggés lenne. Azt az elképzelést látszik bizonyitani FEHÉR és PÁRDUCZ /személyes közlés/ kisérlete is. Nagyfrekvenciás ingerlésnél a lecsökkent vezikulaszámot az infuziós oldatba adott kolin nem tudta felemelni, bár az elektrofiziológiailag ellenőrzött transzmisszió helyreállt. SOMOGYI és mtsai /1974/ arra a következtetésre jutottak, hogy a citoplazmában frissen szintetizált ACh kerül felszabadulásra, ezzel az Auerbach-plexusban is bizonyitást nyert, hogy a frissen szintetizált ACh szabadul fel elsősorban /COLLIER és MacINTOSH 1969, COLLIER 1969/. BIRKS és FITCH /1974/ a szimpatikus ganglionon azt tapasztalták, hogy a citplazmatikus ACh szabadul fel. A 8. ábra mutatja a szinapszis és a vezikulából való direkt felszabadulás /exocitózis/ vázlatát. A 9. ábra már az ACh képződés, felszabadulás és elbomlás vázlatos rajzát mutatja. Somogyival /SOMOGYI, VIZI és KNOLL, közlés alatt/ arra a következtetésre jutottunk, hogy az Auerbach plexus végkészülékeiből is inkább a citoplazmatikus felszabadulás, amely valószinüleg fiziológiás szerepet játszik.

1957-ben DE ROBERTIS és FERREIRA leirták, hogy a NA is vezikulákban található, de ezeknek nagysága 7-8oo Å között van. A varicositásokban találhatók a 4oo-5oo Å nagyságu vezikulák, amelyek szintén NA-t tartalmaznak /l. SMITH és WINKLER 1972/. Spontán szinaptikus potenciált is találtak intracelluláris technikával vas deferensen /l. HOLMAN 197o/. Ez bizonyiték a NA quantális felszabadulására.



lo. ábra Noradrenalint /NA/ tartalmazó végkészülék. A dopamin-β-hidroxiláz protein NA-el való együtt ürülése bizonyiték az exocitózisra

A lo. ábra mutatja, hogy a NA-t tartalmazó nagy vezikula nemcsak NA tartalmát üriti ki a szinaptikus résbe, hanem a vezikulában jelenlévő proteint is, a dopamin- -hidroxilazt is. Tulajdonképpen ez biokémiai bizonyitéka az

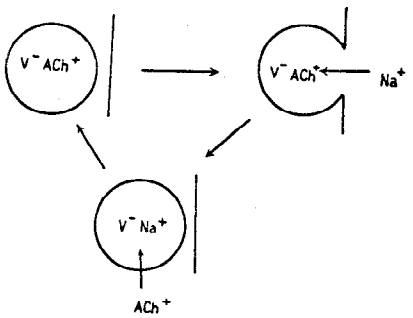
exocitózisnak. A probléma az, hogy a varicositásban levő kis vezikulákban, amelyek tulajdonképpen részt vesznek a neuro-kémiai transzmisszióban, még nem mutattak ki sem dopamin-β-hidroxilázt, sem kromogranin A-t /l. SMITH és WINKLER 1972/. Igy ezeknek NA-val való együttes felszabadulását sem észlelték. Igy nem lehet teljesen bizonyitottnak venni az exocitózis elméletét. Az is igaz viszont, hogy a citoplazmából a NA nem ürül ki idegingerlésre /VAN ORDEN és mtsai 1967; POTTER 1967/, ugyanakkor a nyugalmi felszabadulás nagyon magas. HAGGENDAL és MALMFORS /1969/ azt tapasztalták, hogy reserpinnel és MAO-bénitóval kezelt irisből, amely bár akkumulálni volt képes a NA-t, a kiürülés idegingerlésre gátolt volt.

Igy könnyen elképzelhető, hogy amig az ACh citoplazmából ürülne, addig a NA esetében a vezikulából, exocitózis mechanizmussal. Az ACh esetében azonban akkor bizonyitani kellene, hogy hogyan jön létre a quantális felszabadulás - ami viszont elektrofiziológiai tény. Az exocitózis--elmélet nagy hiányossága, hogy nem ad magyarázatot arra vonatkozóan, hogy a membrán hogyan válik alkalmassá arra, hogy a transzmitter molekulák átmenjenek rajta.

3.5. Ion cserélő mechanizmus.

WHITTAKER /1972/ szerint az ACh pozitiv töltését a vezikulában jelenlevő kb. lo ooo molekula sulya savanyu

karakterü protein /vezikulin/ ellensulyozza. Az exocitózis alatt az extracelluláris térből valószinüleg a Na^+ helyet cserél az ACh-val /11. ábra/. A most már Na^+-al töltött vezikula a citoplazmából ACh-t cserél Na^+-ért és az ismételten ACh-telitett vezikula részt vehet megint az exocitózisban. Ezen elmélet, amelyet WHITTAKER a cephalopodákhoz tartozó Octopuson végzett kisérletek.



11. ábra

WHITTAKER /1972/ elképzelése az acetilkolinnak a vezikulából való ürülésére. Egyébként lásd a szöveget.
V = vezikulin

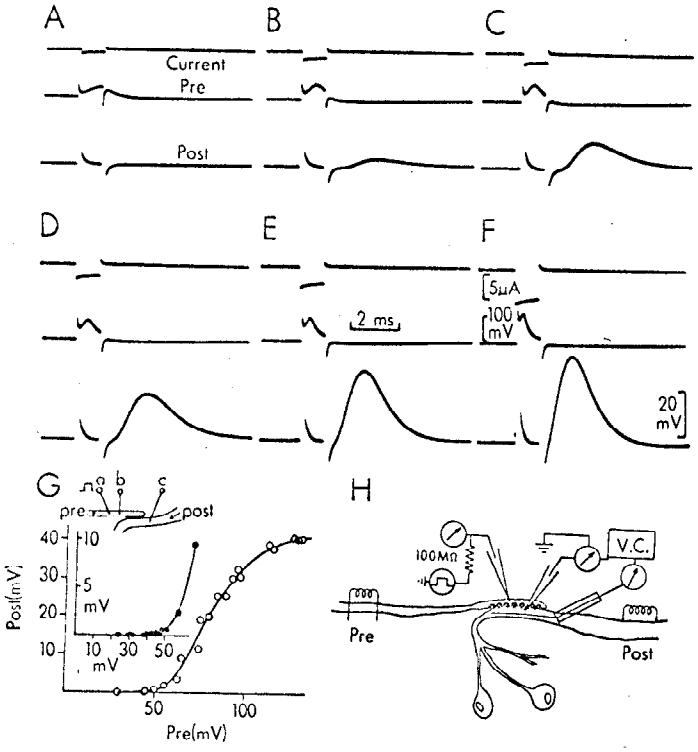
alapján állitott fel, továbbra sem ad választ arra, hogy mi játszik szerepet abban, hogy a membrán, pontosabban kifejezve a membránnak egy specializált területe hogyan válik arra alkalmassá, hogy az ACh-t áteressze. A vezikulában talált ATP-nek valószinüleg az a szerepe, hogy a vezikulinnal képez komplexet és részt vesz a tárolásban.

Az ACh/ATP arányt 11,1-nek találta a Torpedo marmorata elektromos szervében /WHITTAKER 1972/. POTTER és mtsai /197o/ a NA/ATP arányt hasonlónak találták ép-idegben, 7,5-12. WHITTAKER szerint azonban nem lehet teljes biztonsággal azt állitani, hogy az ATP és az ACh egy és ugyanazon végkészülékből származik, ez pedig döntő annak megitélésében, hogy az ATP az ACh raktározásában felszabadulásban/játszik szerepet, vagy esetleg egy purinerg idegrost végkészülékéből származik, amelyet a szinaptoszóma preparálása során nem lehetett elkülöniteni.

4. A KOLINERG ÉS NORADRENERG IDEGRENDSZER KÖLCSÖNHATÁSA. A PRESZINAPTIKUS GÁTLÁS NEURO-KÉMIAI BIZONYITÁSA.

A neuro-kémiai transzmisszió fiziológiai és farmakológiai vizsgálata a központi idegrendszer területén mindmáig megoldatlan probléma. Ennek az oka valószinüleg az, hogy nagyon nehéz a központi idegrendszerben olyan funkcionális egységeket izolálni, melyekben a rendelkezésre álló módszerekkel homogén természetü transzmissziós funkciókat mérhetünk. Mérőmódszereink durvasága, a központi idegrendszer komplexitása olyan akadályok, amelyeket ma még nehéz legyőzni. Kisérleteinkben mi is a perifériás vegetativ idegrendszer transzmisszióján tanulmányoztuk először a jelenségeket. Sajnos az ma még csak álom, hogy egyetlen szinapszisból mérjük a felszabaduló transzmitter mennyiségét. Ez lehetetlen a szinapszis nagysága és a

felszabaduló transzmitter anyag mennyiségét mérő módszerek relativ érzéketlensége miatt. Az elektrofiziológia legmodernebb eszközei - gondolok itt a pre- és posztszinaptikus membrán jelenségeinek egyidejü intracelluláris regisztrálására - már lehetővé tették a mediáció minőségi elemzését egyetlen szinapszisban is, sőt indirekte a felszabaduló transzmitter anyag mennyiségére történő következtetéseket /12. ábra/. Azonban ezen módszerek mellett és fontos kiegészitésük képpen a transzmitter anyagok mennyiségének direkt mérése is fontos feladat, amelynek segitségével direkt módon megismerhetjük a mediátor anyag felszabadulásának törvényszerüségeit.



12. ábra

Szinaptikus kémiai átvitel igazolása egyetlen szinapszisban a pre- és posztszinaptikus membrán intracelluláris elektromos jelenségeinek intracelluláris regisztrálásával /KATZ és MILEDI, 1966/. Input-output viszony. a, ingerlés; b, preszinaptikus, c, posztszinaptikus regisztrálás. Abcissza, preszinaptikus depolarizáció maximuma; ordináta, posztszinaptikus membrán válasza.

4.1. A noradrenalin gátló hatása az ACh felszabadulásra

Általánosan elfogadott az a nézet, hogy az emlősök gastrointestinális traktusában a praszimpatikus kolinerg idegrendszer motoros, izgató, a szimpatikus noradrenerg idegrendszer pedig gátló funkciót tölt be. A fiziológusoknak már évtizedek óta kedvelt területe a gastrointestinális traktus neuro-kémiai transzmisszió jának vizsgálata, - éppen egyszerüsége miatt. BAYLISS a századforduló táján kimutatta, hogy a thoraco-lumbális szimpatikus ideg ingerlése gátolja a bél motilitását. FINKLEMAN /1930/ klasszikus munkájában bizonyitotta, hogy a bélhez vezető szimpatikus ideg ingerlésekor egy adrenalin szerü anyag szabadul fel - ma már tudjuk, hogy a noradrenalin -, s ez gátolja a bél ritmikus aktivitását. McDOUGAL és WEST /1952, 1954/ azt találta, hogy az adrenalin és a noradrenalin már alacsony koncentrációban gátolja a tengerimalac ileum perisztaltikus reflexét. Miután kimutatták, hogy az adrenalin és a noradrenalin gátolja a bél simaizom sejtek elektromos aktivitását /BOZLER, 1940; BÜLBRING, 1954 és BÜLBRING és KURIYAMA, 1963/ általánosan elfogadottá vált, hogy a kettős beidegzésü szerveknél az egyik transzmitter anyag hatását a másik ugy ellensulyozza, hogy az effektor sejteken ellenkező hatást vált ki. Igy a gastrointestinális traktus területén az ACh depolarizációt, kontrakciót okozó hatását a szimpatikus idegből felszabaduló noradrenalin hiperpolarizációt és

elernyedést okozva antagonizálja.

4.1.1. Vegetativ végkészülék.

4.1.1.1. Nyugalmi felszabadulás.

A kérdést felülvizsgálandó, tengerimalac ileumból izolált hosszanti simaizom-Auerbach'plexus preparátumot /PATON és VIZI, 1969/ használtunk. Noradrenalin és adrenalin az ACh nyugalmi felszabadulását gátolta /VIZI 1968; PATON és VIZI 1969/ /2.táblázat/. Az adrenalin molárisan számolva kb. háromszor hatékonyabbnak bizonyult, mint a noradrenalin. Dopamin csak lényegesen nagyobb koncentrációban gátolta az ACh felszabadulást. Az α-receptor-gátló Phentolamin - bár önmaga nem befolyásolta az ACh nyugalmi felszabadulását - gátolta a noradrenalin, az adrenalin, valamint dopamin ACh felszabadulást csökkentő hatását. Igy arra a következtetésre juthatunk, hogy a katekolaminok gátló hatása α-receptoron érvényesül. Ezt bizonyitja az a tény is, hogy a β-receptor izgató izoproterenol /10^{-5} M/ hatástalannak bizonyult és a tiszta α-receptor izgató tulajdonságokkal rendelkező BAY-1470 /KRONEBERG és mtsai, 1967/ már 10^{-7} M koncentrációban 68.1 ± 3.1 %-kal csökkentette az ACh nyugalmi felszabadulását. Felmerül a kérdés, hogy a noradrenalin vajon a spontán felszabadulást, amely az elektrofiziológiában a neuromuszkuláris junkcióban észlelt m.e.p.p.-nak analógja - hogyan befolyásolja. A kérdést eldöntendő az Auerbach' plexus axonális vezetését teljesen felfüggesztő tetrodotoxin jelenlétében vizsgáltuk a problémát. Tetrodotoxin

önmagában maximálisan 58.1 ± 3.8 %-kal /S.E.M., n=6/ csökkentette az ACh felszabadulását.
A nyugalmi felszabadulás 6o %-a tehát az Auerbach'plexus firing-jától származott, 4o.o %-a pedig a végkészülékből spontán felszabaduló ACh. Adrenalint és tetrodotoxint együtt adva az ACh felszabadulás 128.4 ± 1o.6 pmol/g.min-ről 24.8 ± 3.1 pmol/g.min.-re csökkent /n=4/, ami 8o.o %-os csökkenést jelent. Az adrenalin tehát nemcsak a tüzelés okozta felszabadulást gátolta, hanem részben csökkentette a spontán felszabaduló ACh mennyiségét. Ez pedig azt is jelenti, hogy az adrenalin és noradrenalin hatásnak valahol a kolinerg végkészüléken kell lennie.

4.1.1.2. Axonális ingerlés. A gátlás frekvencia függése.

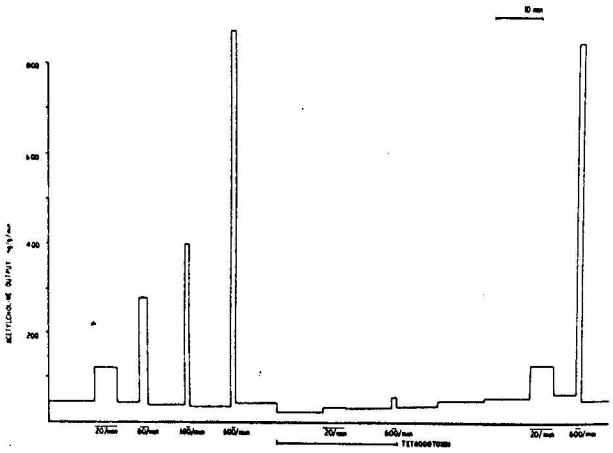
További kisérletekben azt vizsgáltuk, hogy az adrenalin és noradrenalin hogyan befolyásolja az ACh felszabadulását, amikor azt a kolinerg rostok ingerlésével hozzuk létre. A Krebs oldatban felfüggesztett izolált hosszanti simaizom-Auerbach'plexus preparátum "field" ingerlése erre kitünő lehetőséget ad.
Maga az a tény, hogy tetrodotoxin teljesen felfüggeszti a "field" ingerléssel kiváltott ACh felszabadulást, bizonyitékul szolgált arra vonatkozóan, hogy a trnaszmitter felszabadulás, amelyet mérünk, valóban axonális ingerlés eredménye /13. ábra/. Tetrodotoxin egyébként nem befolyásolja a végkészülék direkt depolarizációjával kiváltott

2. táblázat

Katekolaminok gátló hatása az ACh nyugalmi felszabadulására tengeri malac ileum hosszanti simaizom-Auerbach plexus kolinerg végkészülékeiből. VIZI /1968/, PATON és VIZI /1969/ adatai. Krebs oldat, 95 % O_2 + 5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. ACh meghatározás PATON és VIZI /1969/ módszerével.

	n	Concentráció x 10^{-6}M	Expoziciós idő /perc/	ACh felszabadulás csökkenése %-ban /S.E.M./	P
/-/-noradrenalin	1	0.3	20	3.0	
-"-	5	0.6	20	16.7±4.0	< 0.05
-"-	6	3.0	20	56.8±2.5	< 0.01
-"-	5	9.0	20	68.5±4.6	< 0.01
-"-	3	27.0	20	69.1±8.3	
/±/-adrenalin	6	0.3	20	29.4±3.7	< 0.01
-"-	5	1.48	20	65.1±7.0	< 0.01
-"-	6	3.0	20	71.2±5.7	< 0.01
-"-	3	9.0	20	70.6±3.8	< 0.01
/±/-isoproterenol	3	6	20	10.4±6.8	> 0.5
dopamine	3	10	20	12.0±3.0	> 0.5
-"-	3	100	20	41.0±3.3	< 0.02
phentolamine	3	2.64	25	-12.4±4.3	> 0.05
phentolamine +/-/noradrenaline	3	2.64 9.0	25 20	3.6±1.4	> 0.5
phentolamine +/-/-adrenaline	3	2.64 3.0	25 20	1.8±0.6	> 0.5
BAY-1470	5	0.1	20	68.1±3.1	< 0.01

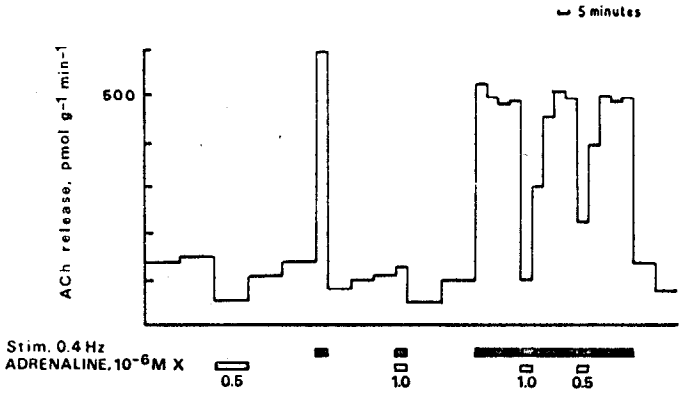
transzmitter felszabadulást /VIZI és mtsai,1973/.



13. ábra

Tetrodotoxin gátló hatása a "field" ingerléssel kiváltott ACh felszabadulásra. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom-Auerbach'plexus preparátum. Ezerin szulfát, 2 ug/ml, Krebs oldat. 37°C. 95 % O_2+ + 5 % CO_2. Field ingerlés; szupramaximális inger /lo V cm^{-1}; 1 ms/.

Kimutattuk, hogy noradrenalin illetve az adrenalin /A/ koncentrációtól függően gátolja az ingerlésre felszabaduló ACh mennyiségét /VIZI 1968; PATON és VIZI 1969/. A 14. ábrán látható, hogy A lo^{-6} g/ml /3xlo^{-6}M/ koncentrációban illetőleg 5xlo^{-7} /1.5xlo^{-6}M/ koncentrációban csökkenti a nyugalmi ACh felszabadulást illetőleg a 0.4 Hz ingerlés hatására felszabaduló ACh mennyiségét.



14. ábra

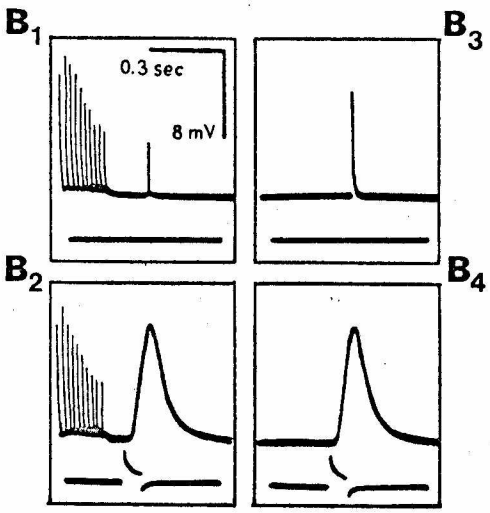
Adrenalin ACh felszabadulást gátló hatása Auerbach plexusból. Tengeri malac hosszanti simaizom preparátum. Krebs oldat, 37°C. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. Field ingerlés, lo V/cm, 1 ms, 0.4 Hz.

Elektrofiziológiai módszerekkel azt tapasztalták, hogy a preszinaptikus rost ingerlésénél a posztszinaptikus membránon mért válasz a legelső ingerre vagy ingersorozatra a legnagyobb. A további ingerekre a válasz, azaz a posztszinaptikus membránon mért transzmitter hatás fokozatosan kisebb és kisebb, mig el nem ér egy állandó szintet. ESPLIN és mtsai /1973/ kisérleteiben is hasonló jelenséget észlelt: az első preszinaptikus ingerekre legnagyobb a válasz. Itt felmerül annak a lehetősége, hogy a posztszinaptikus membrán érzékenysége változik meg, például deszenzibilizáció lép fel. OTSUKA és mtsai /1962/ valamint THIES /1965/ kisérleteiben ez a lehetőség is ki volt zárva,

mivel kivülről adott ACh-al ellenőrizték a posztszinaptikus membrán érzékenységét. A 15. ábrán látható, hogy béka sartorius véglemez-, illetőleg ACh-potenciálját regisztrálva az első ingerre adott posztszinaptikus válasz a legnagyobb és gyorsan csökken. Mivel a posztszinaptikus membrán érzékenysége nem változott, az ACh potenciál ugyanis változatlan maradt, igy bár indirekte, de arra lehet következtetni, hogy a preszinaptikus membránból felszabaduló transzmitter mennyisége csökken le. A csökkenés sebességét nehéz megmondani, mivel a neuromuscularis junctioban a "biztonsági faktor" /safety margin/ 6 és Io között van. Ez azt jelenti, hogy 6-Io-szer több ACh szabadul fel, mint amennyi a neuro-kémiai átviteléhez tulajdonképpen szükséges. Tehát feltételezve, hogy a biztonsági faktor Io, a felszabaduló ACh mennyiségének az I/Io-re kell csökkenie, hogy a neuro-kémiai transzmisszióban, a posztszinaptikus membránon mért válaszban változás legyen mérhető. Ez azt jelenti, hogy nemcsak a vegetativ idegrendszer, hanem a szomatikus idegrendszer végkészülékeiben is ilyen jelenséggel kell számolnunk. Hogy ez a jelenség a felszabadítható ACh mennyiségének kimerülésére /ESPLIN és mtsai, 1973/ vagy az ingerlés hatására a membrán ATPáz aktivitás fokozódásra /VIZI 1974, 1975/ vezethető vissza, azt majd a későbbiekben részletesen tárgyaljuk.

Amikor elektrofiziológiailag regisztráljuk a posztszinaptikus választ és ebből következtetést vonunk le a felszabaduló transzmitter mennyiségére vonatkozóan, természetszerüleg mindig fenyeget a deszenzibilizáció veszélye /KATZ és THESLEFF, 1957/. OTSUKA és mtsai /1962/ exogén ACh-t iontoforézissel adva és igy mérve a posztszinaptikus membrán érzékenységének változását ezt kizárták /15. ábra/. Béka diaphragma véglemez potenciálja 5o Hz-es ingerlésnél 8 inger adásánál is fokozatosan lecsökken. Ilyen ellenőrzés mellett elfogadott, hogy a posztszinaptikus potenciál amplitudójából következtetni nem lehet a felszabadult transzmitter mennyiségére. Bár sokan ugy tartják, hogy a posztszinaptikus membrán érzékenysége az aktivitás alatt nem változik /OTSUKA, ENDO és NONOMURA, 1962; ELMQVIST és QUASTEL, 1965a/, ELMQVIST és QUASTEL /1965 a,b/ emlős motoros véglemezen azt tapasztalta, hogy a véglemez potenciál amplitudója már a legelső impulzustól kezdve elkezd csökkenni.

BENNETT és McLACHLAN /1972 a,b/ hasonló következtetésre jutott szintén elektrofiziológiai módszerrel: tengeri malac cervicalis ganglion sejtjének intracelluláris regisztrálásánál 1o Hz ingerlés esetén a regisztrált potenciál amplitudója egy impulzusra eső ACh mennyisége exponenciálisan csökkent, elérve egy steady-state-lt. Hasonló



15. ábra

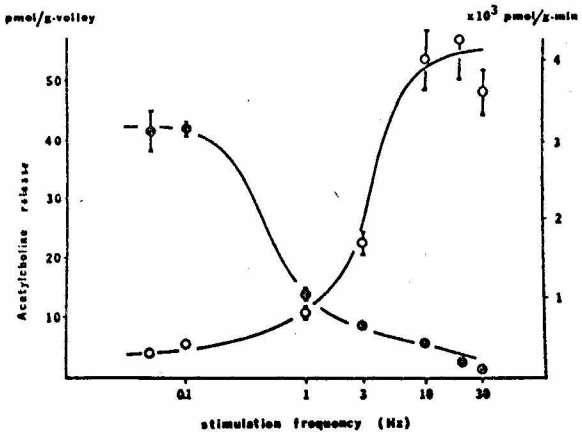
Indirekt bizonyiték a transzmitter felszabadulás csökkenéséről béka sartorius preparátumán.
OTSUKA és mtsai /1962/ kisérleti adatai.
5o Hz, 1o inger, a B_1 és B_2 ábrán. Teszt-ingerlés: elektromos a B_1, iontoforetikusan adott ACh a B_2 ábrán. A B_3 és B_4: 2s-al késöbb teszt-ingerlés.
Figyeld meg a posztszinaptikus membránban regisztrált válaszok csökkenő jellegét anélkül /B_1 és B_2/, hogy deszenzibilizáció lépne fel /B_2/.

jelenséget észleltek és direkt bizonyitékokat szolgáltattak mások /BROWN and FELDBERG, 1936; PERRY, 1953; BIRKS és MacINTOSH, 1961/ mérve a felszabaduló ACh mennyiségét ganglionból. Egyébként KOPIN és mtsai /1968/ a lép szimpatikus idegjéből felszabaduló NA mennyiséget mérve hasonló jelenséget észlelt.

A kérdést megvizsgáltuk tengeri malac ileum hosszanti simaizom preparátumán, ahol az aránylag magas ACh felszabadulás miatt lehetőség volt a shockszám összefüggése mellett a frekvencia függést is tanulmányozni.

Az Auerbach'plexus végkészülékeiből egy időegység alatt felszabaduló ACh mennyisége egyenes arányban volt a frekvenciával. Magasabb frekvenciánál több ACh szabadult fel 1 perc alatt /16. ábra/. Ha azonban kiszámitottuk az egy ingerre eső ACh mennyiségét /volley output/, akkor az egy ingerre felszabaduló ACh mennyisége a frekvencia fokozásával csökkent /16. ábra/, kivéve az 0.o5 és 0.1 Hz-es ingerlést, ahol 6o ingert adtunk összesen, 12oo ingert adtunk, mivel az egy ingerre jutó ACh mennyisége függ a chockszámtól is /KNOLL és VIZI, 197o; 1971/.

Felmerül a kérdés, miért csökken le az egy ingerre jutó ACh mennyisége, ha megemelem a frekvenciát. A legegyszerübb válasz - kiürül a felszabaditható raktárból az ACh. Ezt nagyon egyszerü megcáfolni. Az Auerbach'plexusban 7o-9o.ooo pmol/g ACh van, 81.65o $\pm$ 36o pmol g^{-1}/S.E.M., n=14/. Ha nem volna szintézis, akkor 1o Hz-es ingerlésnél 12oo ingernél összesen 12oo x 6.4 pmol ACh szabadul fel, az összesen 168o pmol. Ez még mindig csak az össz mennyiség 2 %-a. Tehát az ACh raktár kiürüléséről nem lehet beszélni. Ez a gondolat még inkább cáfolva volt azokkal a kisérletekkel, ahol igazoltuk, hogy magasabb frekvenciák-



16. ábra

Az egy időegységre és az egy ingerre jutó ACh frekvencia függősége VIZI /1975/ ábrája.

Auerbach'plexus preparátum.

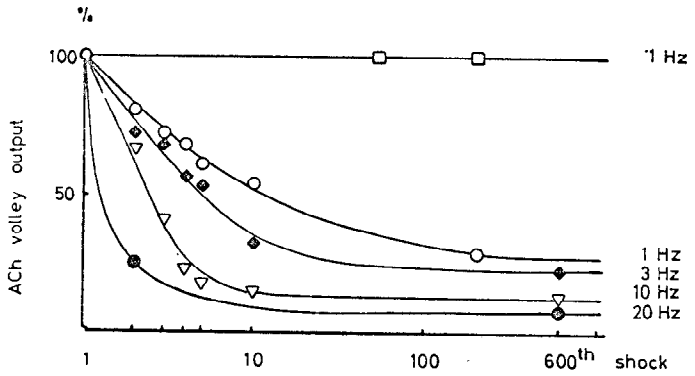
● --- ● egy ingerre jutó ACh felszabadulás,

o --- o egy időegységre jutó ACh felszabadulás.

Abszcisszán az ingerlés frekvenciája logaritmikusan ábrázolva. 0.1 és 0.05 Hz-nél 60 ingert, 1, 3, 10, 20, és 30 Hz-nél 1200 ingert alkalmaztunk.

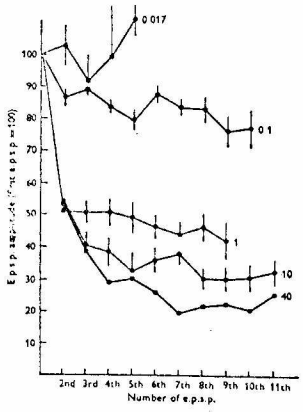
nál már a második ingernél csökken a felszabaduló ACh mennyisége /17. ábra/, amikor az össz ACh mennyiségének /80.000 pmol/ csak a 0.053 %-a ürül ki /80.000 : 100 = = 42.6 : x, x = 0,025/ az első ingerrel /42.6 pmol/.

A 17. ábra mutatja azokat a kisérleteket, amikor intermittáló ingerlési technikával /KNOLL és VIZI, 197o; 1971; I. Függelék/ ki tudtuk számitani különböző frekvenciáknál az első, második, harmadik, negyedik, ötödik, ...n-ik ingerre jutó felszabaduló ACh mennyiségét. 0.1 Hz-nél nem csökken az egy ingerre jutó ACh mennyisége az idő vagy ingerszám függvényében. Magasabb frekvenciáknál azonban rohamosan csökken: minél magasabb a frekvencia, annál gyorsabban csökken és bizonyos ingerszám után állandóvá válik /steady state/. KNOLLlal 197o- és 1971-ben közöltük ezt a jelenséget, - tehát, hogy az ingerszám növelésével az ingerlés során az idő, azaz az ingerszám függvényében csökken az egy ingerre felszabaduló ACh mennyisége.



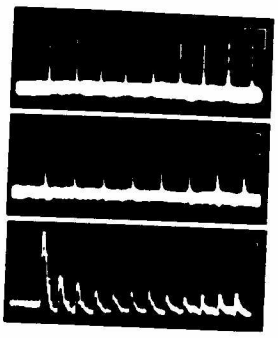
17. ábra

Az egy ingerre jutó ACh felszabadulás ingerszám függése különböző frekvenciáknál. Auerbach'plexus preparátum. Az első inger által felszabaditott ACh mennyisége: 42.6 mplo/g volley.



18. ábra

Tengeri malac ileum Auerbach'plexuson mért e.p.s.p.-k amplitudójának frekvencia és shock szám függősége. NISHI és NORTH /1973/ kisérlete. Abszcisszán a shock-ok száma; ordinátán az e.p.s.p.-k amplitudója az első e.p.s.p.-t loo %-nak véve.



19. ábra

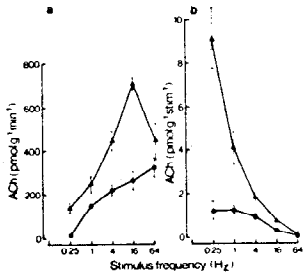
Tengeri malac ileum Auerbach'plexuson mért e.p.s.p.-k amplitudója. NISHI és NORTH /1973/ kisérlete.

Jól látható, hogy 1 Hz-nél vagy magasabb ingerlési frekvenciánál már a második ingernél csökken az ACh felszabadulása. Ez pedig egyértelmüen kizárja azt, hogy az ACh tartalom kiürülése lenne az oka a csökkenésnek.

NISHI és NORTH /1973/ ugyanezen a preparátumon elektrofiziológiai módszerrel kimutatta, hogy az e.p.s.p-ék amplitudója az ingerszám növekedésével csökken /18., 19. ábra/.

Az eredmények teljesen azonosak az általunk kapottakkal: pl. 10 Hz-es ingerlésnél az ötödik inger által felszabaditott ACh mennyisége mindkét módszer esetén az első inger által felszabaditott mennyiség 35 %-a volt.

Természetesen felmerül a kérdés megint, - mi van a központi idegrendszerben? SZERB és SOMOGYI /1973/ izotóp módszerrel, SOMOGYI és SZERB /1973/ patkány agykéreg izolált szeleten kimutatták, hogy az egy ingerre felszabaduló ACh mennyisége frekvencia-függő: minél magasabb a frekvencia, annál alacsonyabb a volley output. A 2o. ábra mutatja kisérleti eredményeinket. Látható egyébként, hogy az atropin fokozza a felszabaduló ACh mennyiségét, ami arra utal, hogy az ACh felszabadulásnál is lenne egy negativ feedback. Ez a gátlás azonban farmakológiai jelentőségü, mivel csak a cholinesterase gátlásnál, ezerin jelenlétében, mutatható ki. Minden valószinüség szerint ezerin távollétében - tehát fiziológiás körülmények között - a preszinaptikusan elhelyezkedő ChE enzim megvédi a preszinaptikus membránt az



Az egy időegységre /a/ és az egy ingerre /b/ felszabaduló ACh frekvencia függősége, patkány agykéreg szelet.

● - ○ kontroll;

▲ - △ + atropin /SZERB és SOMOGYI, 1973 ábrája/

2o. ábra

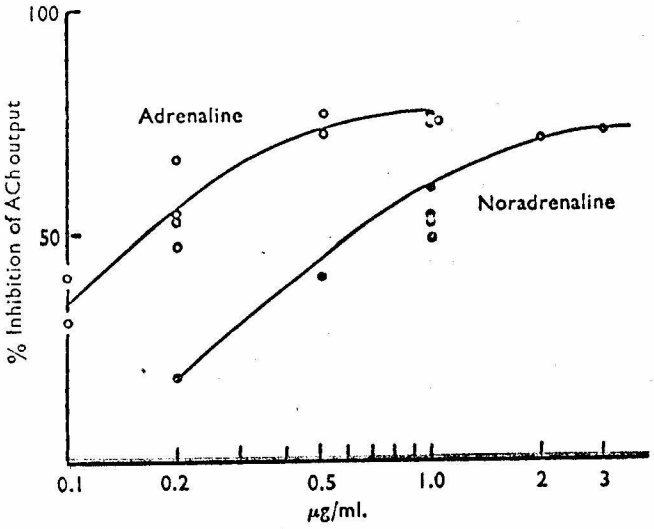
ACh gátló hatásától, amit muscarin-receptorokon keresztül fejt ki, miven atropinnal a gátlást fel lehet függeszteni.

Ahogy azt már korábban megállapitottuk /l. 16 ábra/, az egyetlen ingerrel felszabaduló ACh mennyisége /volley output/ a frekvenciával forditott arányban áll: minél nagyobb az ingerlés frekvenciája, annál kisebb az egyetlen inger által felszabaditott ACh mennyisége. A noradrenalin gátló hatása is forditott arányban áll az ingerlés frekvenciájával /VIZI, 1968; PATON és VIZI, 1969; KOSTERLITZ és mtsai, 197o/. Amig a noradrenalin $3x10^{-6}$M koncentrációban 0.1 Hz-es ingerlésnél 84 %-kal gátolta az egy ingerre jutó ACh mennyiségét, 10 Hz-es tartós ingerlésnél noradrenalin a már egyébként is lecsökkent volley output-ot nem tudta tovább csökkenteni. A noradrenalin és az adrenalin hatása egy adott frekvencián koncentráció-függőnek bizonyult. A 21. ábra mutatja, hogy az adrenalin kb. négyszer hatékonyabb, mint a noradrenalin. Érdekes megfigyelés, hogy a noradrenalin vagy az adrenalin gátló hatása oly mértékben érvényesül, hogy a különböző frekvenciával kiváltott /< 10 Hz/ ACh felszabadulást a 10 Hz-es tartós ingerlés által okozott ACh felszabadulás szintjére csökkenti le, az egy ingerre jutó felszabaduló ACh mennyiségét /6.4 pmol/g volley/.
Ez a jelenség látható tulajdonképpen a 3. táblázaton, valamint a 21. ábrán.

3. táblázat

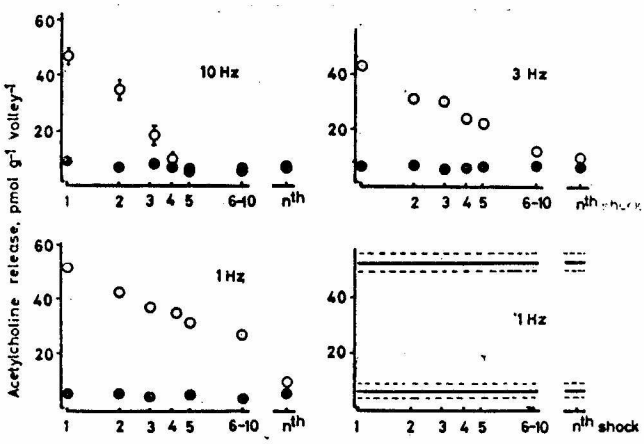
Noradrenalin gátló hatása az axonális ingerléssel kiváltott ACh felszabadulásra. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátum /PATON és VIZI, 1969/. Krebs oldat, 95 % O_2 + + 5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml.

Ingerlés frekvencia	Shock szám	Ingerlés időtartama	Össz ACh felszabadulás pmol/g.min /S.E.M./	Volley output pmol/g volley	Volley output pmol/g volley /-/-Noradrenalin $3x10^{-6}$M	% gátlás
0.05 Hz	60	20 min	305,9±31,6	42,5±6,2	6,78±0,37	84.0
0.1 Hz	60	10 min	401,5±23,8	42,9±1,8	7,33±0,44	83.0
1.0 Hz	1200	20 min	840,7±67,8	10,9±0,7	6,41±0,33	41,7
3.0 Hz	1200	6,6 min	1724,5±209,5	8,9±0,4	6,96±0,40	22,5
10,0 Hz	1200	2,0 min	4051,3±358,9	6,4±0,4	6,78±0,44	-10,5
20,0 Hz	1200	1,0 min	4285,7±515,0	3,4±0,3	3,22±0,26	5,4
30,0 Hz	1200	40 s	358[illegible],7±238,1	1,9±0,1	2,10±0,11	-11,5



21. ábra

Adrenalin és noradrenalin ACh felszabadulást gátló hatásának koncentráció függősége, 0.3 Hz ingerlésnél. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2+ 5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. Field ingerlés. Shock szám: loo.



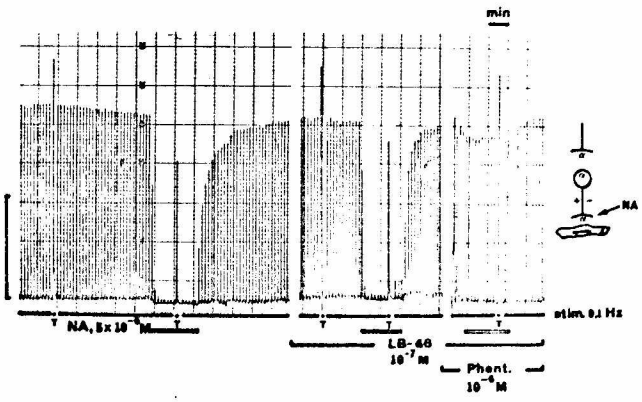
22. ábra

NA ACh felszabadulást gátló hatásának ingerszám és frekvencia függősége. Auerbach'plexus. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2.

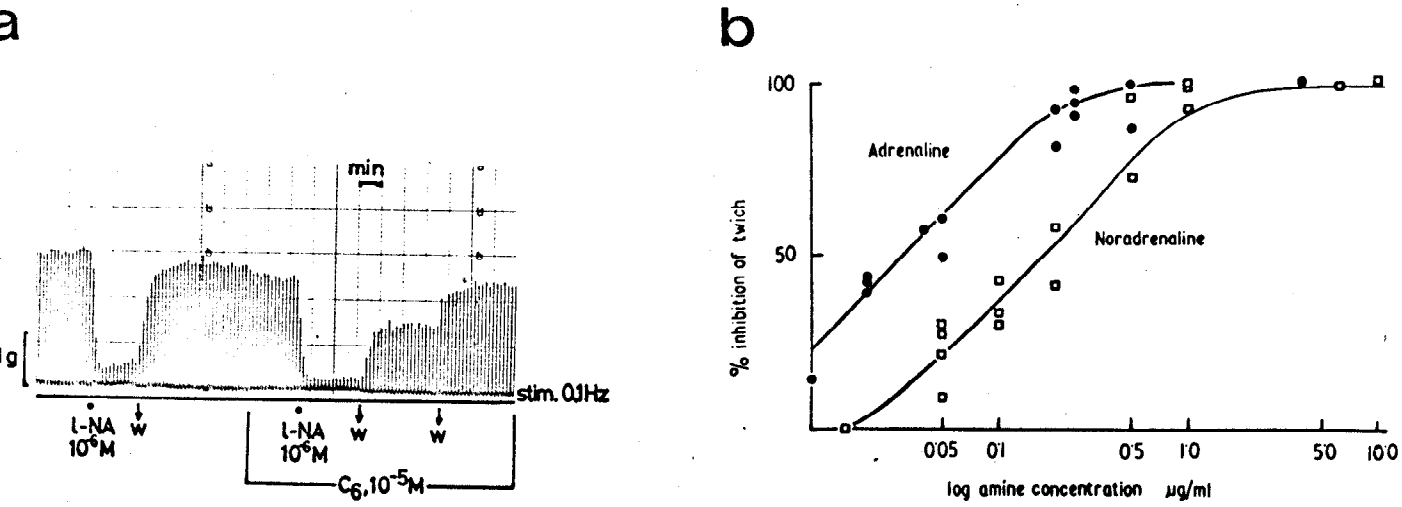
A NA csak a 10 Hz-es állandó ingerlés kiváltotta ACh felszabadulás szintjére tudja lecsökkenteni az egy ingerre jutó ACh mennyiségét. Ez persze azt is jelenti, hogy a NA magas frekvenciáju ingerlésnél is hatékony, csak éppen a legelső ingerek által felszabaditott ACh-t tudja gátolni /22. ábra/, amely magasabb, mint az állandó ingerléssel kiváltott ACh felszabadulás. A NA tehát gátolja a magas frekvenciával, de rövid ingervonattal kiváltott ACh felszabadulást. Ez látható a 22. ábrán.

Ha a cholinesteraset nem gátoljuk meg ezerinnel, akkor a field ingerléssel felszabaditott ACh-ra a tengeri malac ileum hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátum kontrakcióval válaszol. A kontrakciók atropinnal, tetrodotoxinnal teljesen felfüggeszthetők, amely arra utal, hogy idegi eredetü ACh okozza a kontrakciókat. Hexamethonium a kontrakciókat nem befolyásolja, ami viszont azt bizonyitja, hogy posztganglionáris ingerlést alkalmazunk /24. ábra/. Amig az 0.1 Hz-es ingerléssel kiváltott kontrakciókat /23. ábra/ a NA $5x10^{-6}$M koncentrációban teljesen gátolja, a 10 Hz és 10 ingerrel kiváltott kontrakciót csak 30 %-ban csökkenti. A hatás α-receptoron érvényesül, mivel phentolamin e hatást teljesen felfüggeszti és a β -receptor gátló LB-46 nem befolyásolja. NA e gátló hatása a preeffektoriális végkészüléken érvényesül /23. ábra/, mivel hatását hexamethonium /C_6/ se befolyásolja /24.a ábra/.

23. ábra NA field ingerléssel kiváltott kontrakciókat gátló hatása. Tengeri malac hosszanti simaizom--Auerbach plexus preparátum. Krebs oldat, 37°C, 3.5 ml szervfürdő. Field ingerlés: 1 ms;
10 V/cm: T = 10 Hz és 10 inger.
Izometriás regisztrálás.
Phent.= phentolamine



A NA-nak ez a hatása koncentráció függőnek bizonyult: 10^{-7}M-ban már 15 %-ban gátolja az 0.1 Hz-es ingerléssel kiváltott kontrakciókat. Az adrenalin molárisan számolva 3-szor hatékonyabb /24 b ábra és a 4. táblázat/. NA kontrakciót gátló hatása függ az ingerlés frekvenciájától és az alkalmazott ingerszámtól is.



24. ábra

Noradrenalin és adrenalin gátló hatása kolinerg neurokémiai transzmisszióra. Ingerelt, izolált tengeri malac hosszanti simaizom preparátum.
0.1 Hz, 1 ms, 10 V/cm/szupramaximális/, filed ingerlés.
Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2.

/a/ Hexamthonium, C_6, nem befolyásolja a NA gátló hatását.
/b/ Adrenalin és Noradrenalin kontrakciót gátló hatásának koncentráció függősége. Abszcissza, aminok koncentrációinak logaritmusa; ordináta, kontrakció százalékos gátlása

4. táblázat

Katecholaminok 5o %-os gátlást okozó koncentrációi /ID50/ 0.1 Hz-el ingerelt hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátumon.

	ID50 /M/	relativ hatékonyság
noradrenaline	$1o^{-6}$	1
adrenaline	$3x1o^{-7}$	3.3
dopamine	$6x1o^{-5}$	0.o17

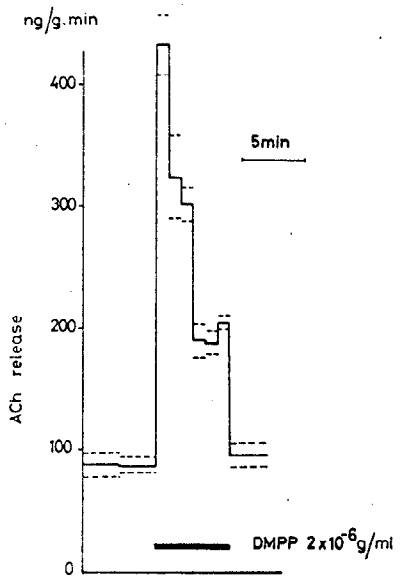
A kisérletekhez noradrenalin hydrogentartarátot /msuly: 337,3/, adrenalin HCl /msuly: 219,7/ és dopamin HCl-t /msuly: 2o3,7/ használtunk.
Az ID50 értéket 1o-15 pontból adódó dózis-hatás görbéből interpolálással számitottuk ki.

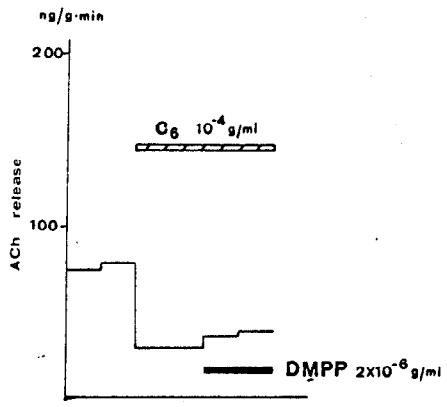
Az α-receptor bénitó phentolamine egyértelmüen gátolta a katecholaminok gátló hatását. Az antagnizmus azonban nem bizonyult kompetitivnek.

4.1.1.3. A ganglion nikotin receptorainak izgatásával kiváltott ACh felszabadulás.

Indirekt bizonyitékok vannak arra vonatkozóan, hogy nikotin-szerü ganglion izgatók stimulálják az Auerbach'plexus ganglion sejtjeit. Atropin, hexamethonium, tetrodotoxin és a hütés gátolja a simaizom kontrakciót okozó hatását /AMBACHE, 1951; McDOUGAL és WEST, 1954; DAY és VANE, 1963; GERSHON, 1967/. Feltételezték, hogy ACh szabadul fel és ez okozza a simaizom muszkarin receptorain keresztül a kontrakciót. Kisérleteinkben direkt bizonyitékokat igyekeztünk szerezni ACh felszabaditó hatásukról, továbbá arról, hogy a NA hogyan befolyásolja ACh felszabadulást ha azt ganglion izgatók váltják ki /VIZI, 1973/.

Kisérleteinket tengeri malac izolált hosszanti simaizom--Auerbach'plexus preparátumán végeztük ezerin szulfát jelenlétében. a 25 a és b ábra mutatja, hogy a DMPP jelentősen fokozza az ACh felszabadulást, hatása hexamethoniummal felfüggeszthető. Hexamethonium /loo ug/ml, 2.8×10^{-4} M/ már önmagában is csökkentette az ACh nyugalmi felszabadulását /25. ábra/. Adrenalin /0.5 ug/ml, 2.3×10^{-6}M/ teljesen felfüggesztette a DMPP ACh felszabaditó hatását. Kimosás után a DMPP hatása azonnal visszatér igazolva, hogy





25. ábra

ACh felszabadulás, mint az Auerbach plexus ganglion sejtjeinek nikotin receptorai izgatásának az eredménye. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom-Auerbach plexus. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 100 ng/g.min=366.3 pmol/g.min ACh.

a/ DMPP ACh felszabadító hatása

b/ Hexamethonium /C_6/ gátló hatása. C_6 10^{-4}g/ml= 2.76×10^{-4}M.

nem egy esetleges tachyphylaxia volt az oka, hogy adrenalin jelenlétében a DMPP nem emelte meg jelentősen az ACh felszabadulást. Phentolamin /10^{-6} M/ teljesen felfüggesztette az adrenalin gátló hatását: négy kisérletben phentolamin és adrenalin jelenlétében a DMPP /2 ug/ml / az ACh felszabadu-

lást 1156.o ± 72.5 pmol/g.min-ra emelte, 298.5±37.7 pmol/ /g. min -ről. Ez az érték alig tér el attól, amit akkor kaptunk, ha DMPP-t önmagában adtuk: 13o6.6 ± 126.7 pmol/ /g.min /n=4/.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a ganglion sejtek ingerlésével kapott axonális tüzelés eredményeképpen felszabaduló ACh α-receptor izgatásával teljesen felfüggeszthető.

4.1.1.4. Gastrinnal és cholecystokininnel kiváltott ACh felszabadulás

1961-ben BLAIR és mtsai azt az érdekes megfigyelést tették, hogy a hisztamin mentes antrum kivonat nemcsak a gyomor szekréciót, hanem a bél és a simaizom kontrakciót is fokozta. Miután GREGORY és TRACY /1964/ valamint GREGORY és mtsai /1964/ izolálták, kémiailag identifikálták, valamint szintetizálták a tiszta gastrint, sikerült kimutatni, hogy a gastrin a gyomorsav szekréció mellett a gyomor és vékonybél mozgását is fokozza. GREGORY és TRACY /1964/ azt találta, hogy az atropin a gastrin által kiváltott bélmotilitás fokozódást gátolta. Később a gastrinhoz hasonló szerkezetü cholecystokininre /RUBIN és mtsai, 1969; HEDNER és RORSCHMAN, 1968/ valamint a caeruleinre /BERTACCINI és mtsai, 1968; DEL TACCA és mtsai, 197o/ kimutatták, hogy fokozzák a bél perisztaltikáját és ez a hatás minden valószinüség szerint kolinerg rendszeren keresztül történik. BENNETT /1965/ és LIPSHUTZ és mtsai /1971/ minden kétséget kizáróan kimutatták, hogy az atropin

és a tetrodotoxin gátolja a gastrin szerü polipeptidek által kiváltott kontrakciókat. Ez az adat bizonyitja, hogy a polipeptidek hatása a kolinerg idegrendszeren keresztül történik. Érdekes módon a tankönyvek és kézikönyvek mindmáig a polipeptidek direkt simaizom hatását emlitik, mint a gastrin szerü anyagok jellegzetes hatásmódját.

Ilyen irodalmi előzmények mellett kezdtük el tanulmányozni a gastrin és cholecystokinin szerü polipeptidek hatását az ACh felszabadulásra. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom - Auerbach'plexus preparátumból az ACh felszabadulás szignifikánsan fokozódott az alkalmazott polipeptidek hatására /5. táblázat/. Noradrenalin a polipeptidek ACh felszabaditó hatását teljes mértékben meggátolja /5.táblázat/. Noradrenalinnak ez a hatása az α-receptoron keresztül érvényesül, hiszen phentolamin $3x10^{-6}$M koncentrációban felfüggesztette a noradrenalin gátló hatását /26. ábra/. Kimutattuk /VIZI és mtsai, 1973; VIZI, 1973/, hogy a gastrin szerü polipeptidek ACh felszabaditó hatása TTX-szel gátolható és hexamethonium nem befolyásolja ezt a hatást. Ha a ganglion sejteket $4x10^{-6}$M nikotinnal depolarizáltuk, a cholecystokinin ACh felszabaditó hatása nem jelentkezik /VIZI, 1973/. Ez arra utal, hogy a cholecystokinin és a hozzá hasonló strukturáju polipeptidek hatásukat az Auerbach'plexus ganglion sejtjein a polipeptidekre érzékeny receptorokon keresztül fejtik ki.

5. táblázat

Gastrin és cholecystokinin szerü polipeptidek ACh felszabaditó hatása. Tengeri malac ileum hosszanti simaizompreparátum.

	Acetilkolin felszabadulás pmol/g. min /S.E.M./		
	control	+peptid	+ NA /3x10^{-6}M/ + peptid
Cholecystokinin oktapeptid 10^{-8}M	419.8±99.4 /3/	1151.1±458.8^{a} /3/	376.4±50.0^{c} /3/
Cholecystokinin 10^{-8}M	341.5±28.6 /5/	1251.7±152.0^{a} /4/	285.5±19.8^{c} /5/
Gastrin 10^{-8}M	357.7±52.7 /5/	739.0±73.6^{b} /5/	385.7 /1/

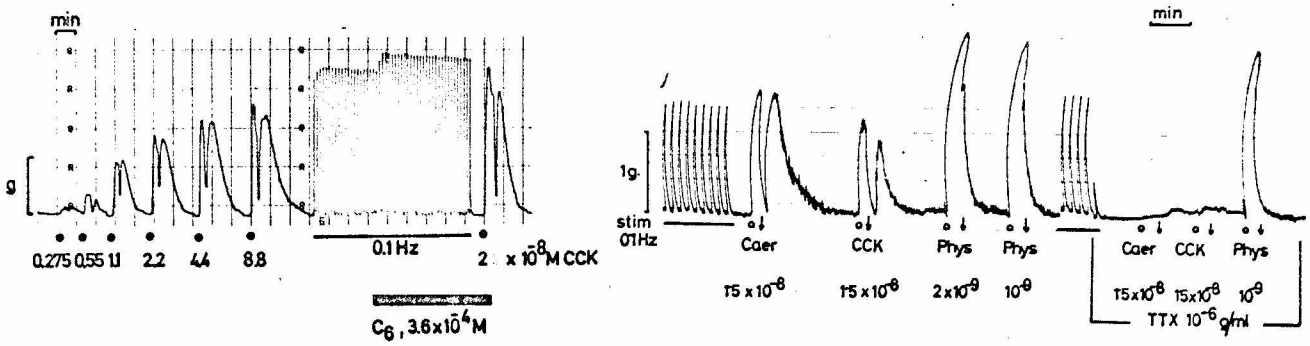
A kisérletek száma zárójelben. Krebs oldat. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 95 % O_2 + 5 % CO_2. Szervfürdő, 3.5 ml. 37°C. 1 perces gyüjtési periódusok.
a, $p < 0,01$ a kontrollhoz viszonyitva; b, $p < 0.05$ a kontrollhoz viszonyitva; c, $p < 0.01$ a peptid jelenlétében mérthez viszonyitva.

Továbbiakban azt igazoltuk, hogy a gastrin szerü polipeptidek hatását hogyan lehet befolyásolni a hosszanti simaizom neuroeffektoriális transzmisszióján. A 27. ábra mutatja, hogy a cholecystokinin koncentrációtól függően a simaizom kontrakcióját okozza és ezt a hatását a hexamethonium nem gátolja, hanem fokozza. Hogy a cholecystokininnek a hatása indirekt és az előbbiekben kimutatott ACh felszabaditó hatással van összefüggésben, azt az is bizonyitja, hogy a cholecystokinin

teljesen hatástalan. Megjegyzendő, hogy a TTX a simaizom kontraktilitását és ACh iránti érzékenységét nem befolyásolja.

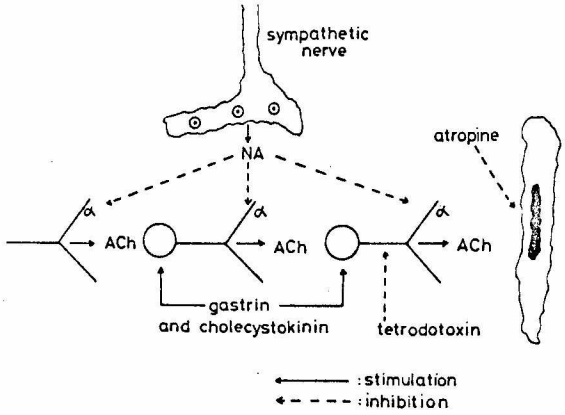
Finkelman preparátumon /FINKELMAN, 193o/ kimutattuk /VIZI és mtsai, 1973/, hogy a szimpatikus ideg ingerlése teljes mértékben felfüggesztette a gastrin II-hexapeptid kontrakciót okozó hatását. Az endogén noradrenalinnak a gátló hatását propranolol /5x1o^{-6}M/ nem befolyásolta, phentolamin /5x1o^{-6}M/ viszont felfüggesztette. Ez arra utal, hogy a noradrenalin ACh felszabadulást gátló hatása α-receptoron keresztül érvényesül.

Kisérleteink alapján feltételezzük, hogy a gastrin, illetőleg a cholecystokinin fiziológiás körülmények között fontos szerepet játszik a bél motilitásának fenntartásában, éppen az ACh felszabadiót hatás révén. A szimpatikus idegrendszer fokozottabb aktivitása viszont az ACh felszabadulás csökkenéséhez vezet és igy válik PETRI és munkatársainak /1971/ eredménye ebből a szempontból is értelmezhetővé. PETRI és mtsai /1971/ kimutatták, hogy a paralytikus ileusban az α-receptor gátló hatásu vegyületek kitünő hatásuak. Ha a szimpatikus idegből felszabaduló noradrenalin hatását felfüggesztem α-receptor bénító hatásu vegyületekkel, akkor az ACh felszabadulás és igy a bél motilitás fokozódik. A 28. ábra sematikusan mutatja elképzeléseinket. Az ábrából érthetővé válik, hogy miért gátolható a gastrointestinális



27. ábra

Cholecystokinin /CCK/ kontrakciót okozó hatása tengeri malac hosszanti simaizom preparátumon. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + + 5 % CO_2. 0.1 Hz, 1 ms, 10V/cm field ingerlés. /a/ Hexamethonium, C_6, nem gátolja a CCK hatását. /b/Tetrodotoxin, TTX, teljesen meggátolja a CCK illetőleg a hasonló hatásu caerulein /Caer/ kontrakciót okozó hatását. A simaizom direkt hatással rendelkező physalamin által kiváltott kontrakciót a TTX nem befolyásolta, bizonyitva, hogy a CCK indirekt uton, fejti ki hatását.



28. ábra

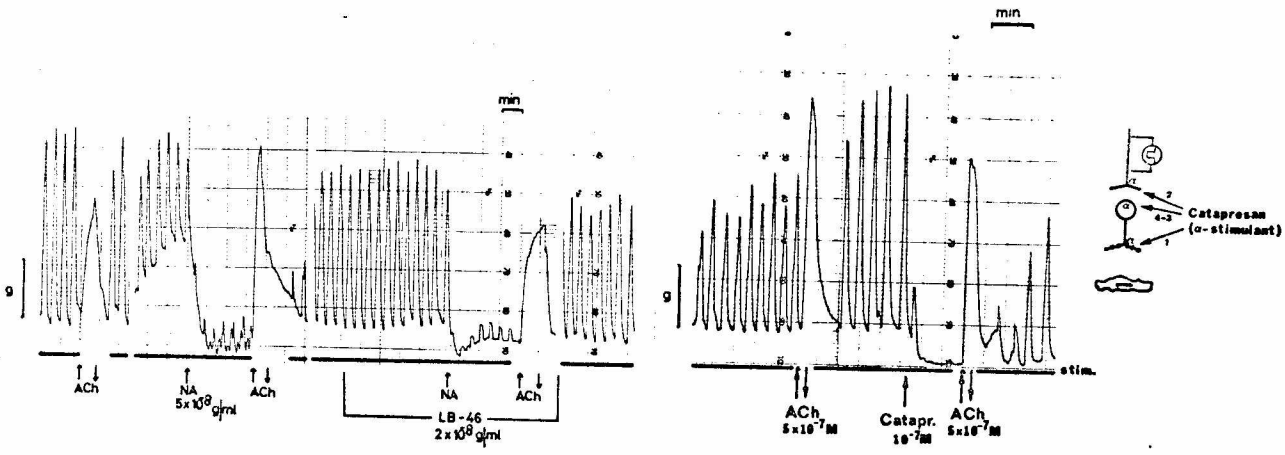
Gastrin és a cholecystokinin hatásmódjának sémás ábrázolása. NA, noradrenalin. A gasztrointesztinális hormonok izgatják az Auerbach plexus ganglion sejtjeit, amely fokozva a posztganglionáris idegek aktivitását ACh felszabadulást eredménye. A hormonok hatása gátolható atropinnal,NA-al és tetrodotoxinnal.

hormonoknak a hatása atropinnal, TTX-szel, illetőleg miért fokozható α-receptor bénitóval. Igy válik érthetővé az a régóta ismert klinikai adat, hogy az α-receptor bénitók adása esetén miért jelentkezik a hasmenés, mint mellékhatás /lásd GOODMAN és GILMANN/.

4.1.1.5. Preganglionáris ingerléssel kiváltott kontrakciók gátlása

A PATON és VANE /1963/ módszere szerint preparált izolált vagus-gyomor készitmény érdekes kisérletre ad lehetőséget. A vagus ingerlésre létrejövő simaizom kontrakció olyan ideg impulzus eredménye, amely egy ganglionban egyszer már áttevődött. Ezt igazolja az a tény, hogy hexamethonium meggátolja a kontrakciókat /3 kisérlet/. Itt tehát a fiziológiáshoz nagyon közel álló ingerléssel van dolgunk, hiszen a posztganglionáris /preeffektoriális/ axont ACh ingerli ! Érdekes megfigyelés volt, hogy ilyen ingerlési mód mellett a NA és A gátló hatása frekvencia és shock-szám függetlenné vált. 29. ábra mutatja, NA-nak illetőleg az α-receptor izgató catapresan preszinaptikus gátló hatását. Az exogén, szervfürdőhöz adott ACh hatását NA /5x10^{-8}g/ml / illetőleg catapresan /10^{-7}M/ nem befolyásolta az ingerléssel kiváltott kontrakciókra kifejtett gátló hatását a β-receptor bénitó LB-46 nem befolyásolta. További 3 kisérletben azt találtuk, hogy phentolamin /10^{-6}M/ felfüggesztette a NA gátló hatását.

Ez az adat arra utal, hogy a NA gátló hatása α-receptoron keresztül érvényesül. NA vagy A gátló hatása akkor is érvényeülst, ha 2o Hz 2o shockkal ingereltük a preganglionáris rostot /2 kisérlet/, Ez azt is jelenti, hogy minden valószinüség szerint az axonális ingerlést jelentő "field" ingerlés más mechanizmussal vált ki ACh felszabadulást, mint a preganglionáris rostból felszabaduló ACh hatására az idegsejt depolarizálódásának következtében generalizálódott AP a posztganglionáris rost végkészülékéből. Gastrinnal, cholecystokininnel, illetőleg nikotinnal, DMPP-vel kiváltott ACh felszabadulás illetőleg simaizom kontrakciók hasonlóképpen, azaz teljesen gátolhatók NA-al.



29. ábra

Noradrenalin /NA/ és Catapresan /Clonidin/ gátló hatása a neurokémiai transzmisszióra izolált, preganglionárisan ingerelt vagus-gyomor preparátumon. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2+ + 5% CO_2. Vagus ingerlése: 4Hz, lo inger minden 3o.mp-ben, 5 V, 0.2 ms. /a/ ACh, acetlychlin jodid, 10^{-7}M; LB-46, szelektiv β-receptor gátló. /b/ Catapresan, szelektiv α-receptor izgató. Az α-receptor izgatása által okozott gátlás feltételezett támadáspontja: 1-2, a preganglionáris és preeffektoriális neuron végkészülékén, 4-3, az idegsejten. Hogy a gátlás nem az effektor, simaizom sejten keresztül érvényesül azt az bizonyitja, hogy az exogén ACh hatását sem a NA sem a Catapresan nem befolyásolta.

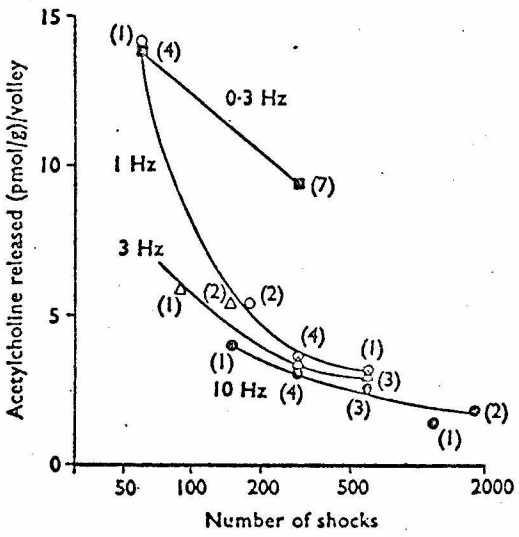
4.1.2. Ganglion

Az ACh felszabadulás mérésére az irodalomban főleg perfundált ganglion Kibjakov módszerével végzett kisérletek eredményeit találhatjuk /FELDBERG és GADDUM 1934; McINTOSH, 1938; PERRY, 1953; BIRKS és McINTOSH, 1961/.

A Kibjakov módszer ellen tulajdonképpen az a tény szól, hogy a ganglion vérellátása döntő módon befolyásolja a felszabaduló ACh mennyiségét. Igy olyan anyagok, amelyek vaso-konstrikciót vagy vasodilatációt okoznak, nem specifikus módon is befolyásolhatják a felszabaduló ACh mennyiségét. Kisérleteinkhez nyul izolált ganglion cervicale superiort használtunk. Az irodalomban ezt a módszert nem használták eddig / DAWES és VIZI, 1973/. Izolált készitményünk, amelynek preganglionáris rostjait az ingerlés céljára megtartottunk, de a mérés előtt levágtunk, 8-12 mg sulyu volt. A ganglion ACh tartalma 35.5 ± 3.4 nmol/g /S.E.M.; n = 9 / volt, a jobb és bal oldali ganglion között nem volt szignifikáns különbség. 1 ml-es szervfürdőben ezerin jelenlétében gyüjtöttük a Krebs oldatban megjelenő ACh-t, amelyet a szokásos módon mértünk meg.

A nyugalmi ACh felszabadulás 13o.o ± 1o.1 pmol/g.min volt. Ez 2ug/ml ezerin szulfát jelenlétében 2-3 h hosszat állandónak bizonyult, és cholin klorid / 7 uM / adása nem befolyásolta sem a nyugalmi, sem az ingerléssel kiváltott ACh mennyiségét. Ez arra utal, hogy aránylag rövid ingerlés alatt /1-5 perc/ nem merült ki a szövet ACh tartalma, és az ingerlések közötti 1o-2o perces szünetek,

elegendőnek bizonyultak a ganglion ACh tartalmának restituciójához. A cholin valószinüleg endogén raktárakból pótlódott. A 3o. ábra mutatja az egy ingerre jutó felszabaduló ACh mennyiségét. Két jelenség volt megfigyelhető: 1. a frekvencia növelésével csökkent az egy ingerre jutó felszabaduló ACh mennyisége; 2. egy adott frekvenciánál a felszabaduló ACh mennyisége a shock-szám növekedésével csökkent, mindaddig, amig el nem ért egy konstans felszabadulást. BIRKS és McINTOSH /1961/ ez utóbbival azonos



3o. ábra

Az egy ingerre jutó ACh mennyiségének frekvencia és shock-szám függősége. Izolált nyul ganglion cervicale superion. DAWES és VIZI /1973/ módszerével, Krebs oldat, 37°C, Ezerin szulfát, 2 ug/ml. A zárójelben levő számok a kisérletek számát jelentik.

6. táblázat

Adrenalin ACh felszabadulást gátló hatása izolált cervical ganglion cervicale superiorban. DAWES és VIZI /1973/ módszere. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. Preganglionáris ingerlés: szupramaximális /5 V , 0.1 ms. Ingerlés után még 7 percig hagytuk a ganglionT a Krebs fürdőben és csak utána cseréltük le a fürdő oldatát meghatározáshoz. 37°C, 95 % O_2 és 5 % CO_2

	Gyüjtési periódus	A C h felszabadulás, pmol/g.volley	P
1. resting	2o perc	0.13 ± 0.o1 /5/	
2. resting + adrenalin, $1,5x10^{-6}M$ ingerlés	2o perc	0.11 ± 0.o12/4/	1:2 > 0.5
3. 0.3 Hz	3o perc	17.1 ± 2.o /3/	1:3 < 0.o1
4. 0.3 Hz +phentolamine	3o perc $3x10^{-6}M$	18.o ± 2.1 /3/	3:4 > 0.5
5. 0.3 Hz + adrenalin, $1,5x10^{-6}M$	3o perc	3.o ± 1.1 /3/	3:5 < 0.oo1
6. 0.3 Hz + phentolamine, $3x10^{-6}M$ + adrenalin, $1.5x10^{-6}M$	3o perc	17.o5 ± 3.1 /3/	3:6 > 0.5
7. 1o Hz	0.5 perc	2.7 ± 0.26 /3/	1:7 < 0.o1
8. 1o Hz + adrenalin, $1.5x10^{-6}M$	0.5 perc	2.6 ± 0.3 /3/	8:7 > 0.5

eredményekhez jutott. Kisérleteinkben azonban az egy ingerre jutó ACh mennyisége nem bizonyult frekvencia-függőnek. Meg kell azonban jegyezni, hogy kisérleteikben a legalacsonyabb frekvencia amit használtak 1 Hz volt. A mi kisérleteinkben is csak az 1 és 0.3 Hz közötti ACh felszabadulásnál volt szignifikáns különbség.

A $15x10^{-6}$M koncentrációban szignifikánsan csökkentette a felszabaduló ACh mennyiségét /6. táblázat/, 0.3 Hz ingerlésnél, 10 Hz-nél viszont teljesen hatástalannak bizonyult. Phentolamin /3.10^{-6}M/ felfüggesztette az A hatását /6. táblázat/.

A catecholaminok ganglionáris transzmissziót gátló hatását már sokan kimutatták elektrofiziológiai módszerrel /MARAZZI, 1939; LUNDBERG, 1952; McISAAC, 1966; De GROAT és VOLLE, 1966; CRIST és NISHI, 1969/. CHIRST és NISHI /1971/ a catecholaminok e hatását preszinaptikusnak jelölte. Elképzelhető, hogy fiziológiailag az interneuronokból /JOÓ és mtsai,1971/ felszabaduló adrenalin vagy NA preszinaptikusan gátolja az ACh felszabadulást. CSILLIK és mtsai /1967/ nagymennyiségü adrenerg végkészüléket talált macska ganglion cervicale superiorában. ECCLES és LIBET /1961/ szerint a chromattin sejtekből felszabaduló A posztszinaptikusan befolyásolja a transzmissziót a ganglionban. Preganglionáris ingerlésre ACh mellett A/NA is felszabadul ahogy ezt LISSÁK /1939/ kimutatta.

Kisérleteinkben igazoltuk, hogy a catecholaminok α-receptoron keresztül csökkenteni, gátolni tudják a felszabaduló ACh mennyiségét, igy elképzelhető, hogy a catecholaminok preszinaptikusan a ganglionban is moduláljják a kolinerg transzmissziót.

4.1.3. Agykéreg

ACh felszabadulás patkány és humán agykéreg szeletből

A kolinerg és noradrenerg idegrendszer kölcsönhatása a központi idegrendszerben

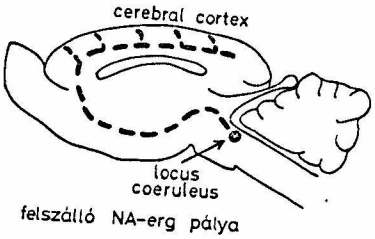
Kisérleteinkben a központi idegrendszer területén izolált agykéreg és bazalis ganglion szeleten vizsgáltuk az ACh felszabadulás gátolhatóságát noradrenalinnal illetőleg a neuronokon elhelyezkedő α-receptorok izgatásával. Kimutattuk, hogy mind az agykéregből, mind a bazalis ganglionból membrán ATPáz gátlásával felfokozott ACh felszabadulás noradrenalinnal, clopaminnal illetőleg α-receptor izgatásával csökkenthető.

Noradrenalin kolinerg transzmissziót gátló hatásának fiziológiás jelentősége az agykéreg területén. Morfológiailag FUXE, HAMBERGER és HÖKFELD /1968/ igazolta, hogy az agykéregben jelentős számu noradrenalint tartalmazó axon található. A locus ceruleus-ból kiinduló noradrenalint tartalmazó neuronok az agykéreg kolinerg rostjainál végződnek /31. ábra/, bár tudomásunk szerint axo-axonális szinapszist nem

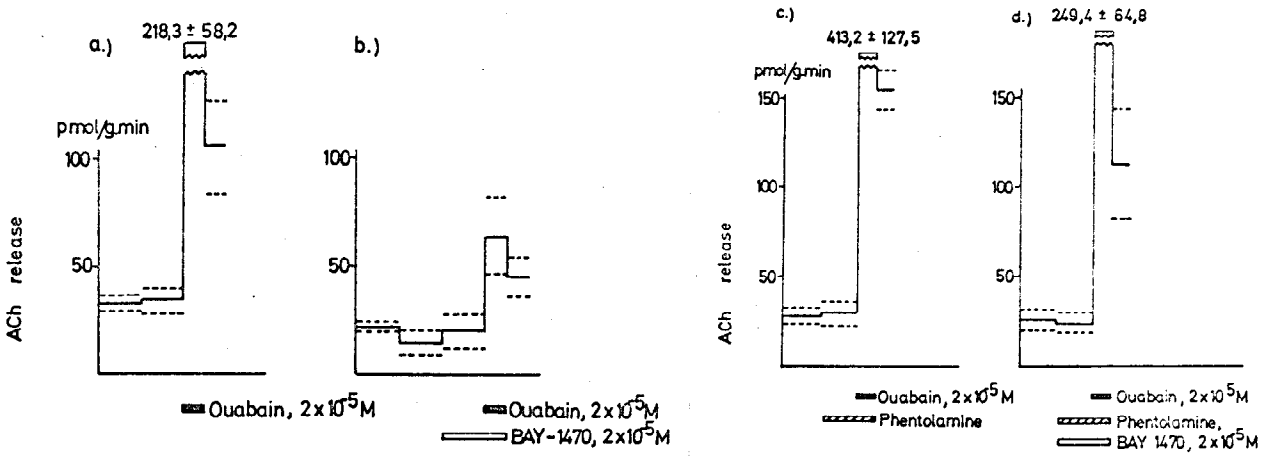
képeznek, ami egyébként a preszinaptikus gátlás morfológiai jeleként fogható fel. Kimutattuk, hogy patkány agykéreg izolált szeletéből ouabainnal kiváltott ACh felszabadulást a NA részben meggátolja /VIZI,1972/. A 32. ábrán látható, hogy az agykéreg kolinerg neuronjaiból felszabaduló ACh felszabadulás α-receptor izgatásával csökkenthető. A BAY-147o egy szelektiv α-receptor izgató. Phentolamine 10^{-6}M koncentrációban önmagában is fokozta az ouabainnal kiváltott ACh felszabadulását: a release 218.3 pmol/g.min-ről 413.2 pmol/g.min-re emelkedett. Ez arra utal, hogy valószinüleg endogén NA is modulálja az ACh felszabadulását. /l. 4.4.2.1. fejezet/.

31. ábra

Locus ceruleusból kiinduló kéregbe futó noradrenerg pályák.



Kisérleti céljainkra ép humán agyszövetet mütétek során kaptunk a tumor megközelitése céljából kivágott agyszövetből. A mütét alatt kivett szövet darabokat /4o-1oo mg/ azonnal szobahőmérsékletü /2o-25°C/ oxigenizált Krebs oldatba tettük és



32. ábra

-receptor izgatásának ACh felszabadulást gátló hatása patkány izolált agykéreg szeleten. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2; 2 ml.2o és lo perces gyüjtési periódus. 4 kisérlet átlaga, S.E.M. Ezerin szulfát, 2 ug/ml.

3o percen belül a kisérletet megkedztük. 10 kisérletben az agykéreg szeletből a nyugalmi ACh felszabadulás 9.44 ± 1.8 pmol/g.min volt. Ez a felszabadulás a külső K^+ concentráció emelésével 70.2±13.1 pmol/g.min-re emelkedett / $p < 0.ool$; n=3/. Ez az adat arra utal, hogy a human speciesen is az ACh felszabadulás a végkészülék depolarizálásával fokozható. Az ACh tartalom a szürke állományban 63o pmol/g-nak bizonyult.

Felmerül és jogosan a kérdés, hogy mi a biztositék, hogy amit mértünk az biztosan ACh és nem valamilyen esetleg a humán speciesre jellemző más kolinészter, amely a biológiai

titrálás során ACh-nak identifikálunk. A spazmogén anyagot amit a szövetből felszabadult illetőleg kivontunk /l. PATON és VIZI, 1969/ ÁDÁM-mal kidolgozott gélkromatográfiás módszerünk segitségével /l. Appendix/ ACh-nak identifikáltuk.

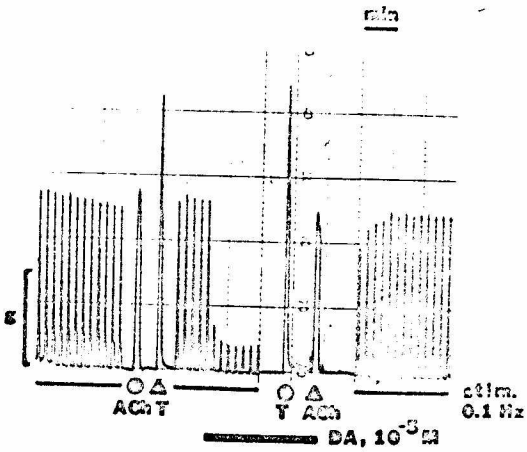
4.1.4. Neuromuscularis junctio.

DALE, FELDBERG és VOGT /1936/ ma már klasszikusnak számitó munkájában igazolta, hogy az ACh a transzmitter a neuromusculáris junctioban. EMMELIN és McINTOSH /1956/ megerősitette DALE-ék eredményeit. KRNJEVIC és MITCHELL /1961/ valamint BOWMAN és HEMSWORTH /1965/ megállapitották az ACh felszabadulás direkt mérésével, hogy a felszabaduló ACh mennyisége az idő függvényében állandóan csökkenő tendenciát mutat. A "safety margin" itt meglehetősen nagy, 6-lo, azaz 6-szor, lo-szer nagyobb mennyiségben szabadul fel az ACh, mint amennyi szükséges a neurokémiai transzmisszióhoz /WAUD és PATON/. KUBA /197o/ kimutatta, hogy NA-nak itt nincs preszinaptikus gátló hatása, tehát a felszabaduló ACh mennyiségét nem befolyásolja. Kisérleteiben a véglemez potenciáló okát mérte. Továbbá kimutatták, hogy a végkészülék α-receptorainak izgalma az ACh quantalis növekedéséhez vezet /BOWMAN és RAPER, 1967/.

4.2. A dopamin ACh felszabadulást gátló hatása.

Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a dopamin, 1 ug/ml koncentrációban szignifikánsan nem befolyásolja a nyugalmi és a 0.3 Hz ingerléssel kiváltott ACh felszabadulását /PATON és VIZI, 1969/. Későbbi vizsgálatainkban azonban világossá vált, hogy a dopamin is gátolni tudja az ACh felszabadulását az Auerbach plexusból, csak éppen lényegesen nagyobb koncentráció szükséges hozzá. 5o ug/ml /2.oxlo^{-4}M/ koncentrációban a nyugalmi felszabadulást lecsökkentette 134.5±16.7 pmol/g.min-ről 65.4±6.o pmol/g.min re /n=5, p < 0.ol/. Izolált patkány ganglion szeletből felszabaduló ACh felszabadulását nem befolyásolja lo^{-4}M koncentrációban, de ouabainnal /2xlo^{-5}M/ 6-OH-dopaminnal /2xloo ug intraventriculárisan/ előkezelt állat bazalis ganglionban kifejezett a hatása: 815.2±16o.9 pmol/g.min-ről 61.9±4.6 pmol/g.min-re csökkenti a felszabadulást /n=3, p < 0.ol/.

ChE-bénító hiányában is megvizsgáltuk a dopamin hatását izolált ingerelt tengeri malac hosszanti simaizom készitményen. A 33. ábra mutatja a dopamin hatását az ingerléssel kiváltott kontrakciókra. A NA-hoz hasonlóan csak az alacsony frekvenciával kiváltott kontrakciókat gátolta. A hatás preszinaptikus: nagy frekvenciával és exogén ACh-al kiváltott kontrakciókat nem befolyásolja. E gátlás phentolaminnal nem kompetitive felfüggeszthető.



33. ábra

Dopamin /DA/ kolinerg neurokémiai transzmisszió gátló hatása ingerelt tengeri malac hosszanti simaizom preparátumon.
Krebs oldat, 37°C. Field ingerlés. Izometriás regisztrálás. T= 10 Hz, 20 shock.

4.3. ACh gátló hatása NA felszabadulásra.

LINDMAR, LÖFFELHOLZ és MUSCHOLL /1968/ kimutatta, hogy az ACh magas koncentrációban /2.1x10^{-4}M/ csak kis mértékben fokozza a noradrenalin felszabadulását perfundált nyul izolált sziv preparátumán; atropin jelenléte viszont megtizszerezte a noradrenalin felszabadulását. Mivel az atropin nem befolyásolta a nikotin receptoron ható DMPP hatását /3.1x x10^{-5}M/, igy felmerült az az elgondolása, hogy a noradrenalin felszabadulása nikotin receptorokon keresztül fokozható, muszakrin receptoron keresztül gátolható. MUSCHOLL és mtsai /LÖFFELHOLZ és MUSCHOLL, 1969; FOZARD és MUSCHOLL, 1972/ kimutatták, hogy az ACh, dózistól függően /5.5x10^{-8} - 5.5x10^{6}M/ gátolja a perfundált nyulszivhez vezető szimpatikus ideg posztganglionáris rostjainak ingerlése által /10 Hz / kiváltott noradrenalin felszabadulást. KIRPEKAR és mtsai /1972/ igazolták, hogy a karbakol gátolja a noradrenalin felszabadulást. Nyul fül artériából ^{3}H-noradrenalin felszabadulását az ACh gátolta /ALLEN és mtsai, 1972; STEINELAND és mtsai, 1973/. VANHOUTTE /1976/ egyértelmüen igazolta, hogy az ACh-nak

a vascularis simaizomra kifejtett hatásában komoly szerepet játszik az ACh-nak noradrenerg végkészüléken kifejtett preszinaptikus gátló hatása is. Eltérően a NA ACh felszabadulást gátló hatásától a magas K koncentrációval kiváltott noradrenalin felszabadulást is gátolni tudja a muszakrin receptorok izgalma. /DUBEY és MUSCHOLL, 1973/.

4.4. A preszinaptikus gátlás fiziológiai jelentőségének bizonyitása

Azt a megállapitásunkat /VIZI, 1968/, hogy az exogén NA gátolni tudja az Auerbach'plexusból az ACh felszabadulását, mások is megerősitették. BEANI és mtsai /1969/ izolált tengeri malac colonon, TACCA és mtsai /197o/ izolált emberi taenia colin, KOSTERLITZ és mtsai /197o/ tengeri malac ileum hosszanti simaizmán, KAZIC /1971/ egész ileumon is azt találta, hogy a catecholaminok /NA, A/ gátolják az ACh felszabadulását a végkészülékből.

Eddigi kisérleteinkben viszont csak azt bizonyitottuk, hogy az exogén, a kivülről a szervfürdőhöz hozzáadott, noradrenalin hogyan befolyásolja a gazdag neuronhálózattal rendelkező Auerbach'plexus ACh felszabadulását. Hogy a NA-nak ez a gátló hatása valóban fiziológiás jelentőségü, bizonyitani kell. Tehát azt, hogy az endogén - a noradrenerg rostokból származó NA - felszabadulva olyan helyi koncentrációt tud elérni, amely gátolni képes az ACh felszabadulást.

További kisérleteinkben azt igazoltuk, hogy az ACh felszabadulás, igy a kolinerg neuro-kémiai transzmisszió állandó szimpatikus, tehát noradrenerg ellenőrzés alatt áll: a felszabaduló NA modulálja a kolinerg transzmissziót.

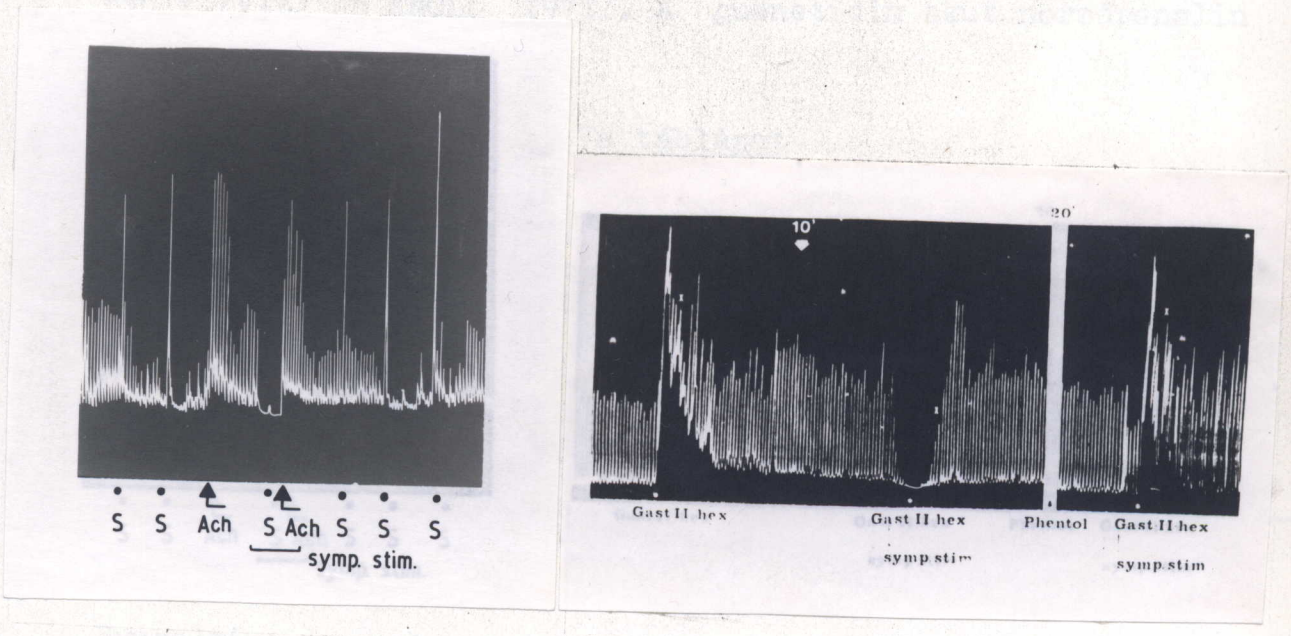
4.4.1. Vegetativ idegrendszer

4.4.1.1. Szimpatikus idegrendszer ingerlésének gátló hatása az ACh felszabadulásra.

Kisérleteinkhez FINKELMAN /193o/ módszerét használtuk azzal a módositással, hogy a Krebs oldathoz 2 ug/ml ezerinszulfátot adtunk, az ACh elbontásának megakadályozására. Ilyen körülmények között - ezerin jelenlétében - természetesen nem volt mód a funkció regisztrálására. Az izolált bélkacshoz futó, az artériát kisérő szimpatikus ideget ingerelve a felszabaduló ACh mennyisége szignifikánsan lecsökkent, a nyugalmi ACh felszabadulás 32,o ± 4,o pmol/g.min-ről 18,6 ± 1,46 pmol/g.min-re /n = 4; $p < 0.01$/. A csökkenés 42 %-os. Ez a kisérleti adat arra utal, hogy a szimpatikus ideg ingerlésének hatására felszabaduló noradrenalin gátolni képes az ACh felszabadulását.

Finkelman preparátumon megvizsgáltuk, hogy a szimpatikus ideg ingerlés hogyan befolyásolja az indirekt ható gasztrointesztinalis hormonok által, továbbá a field ingerléssel kiváltott kontrakciókat. A 34. ábra mutatja a kisérleti eredményeket. A szimpatikus ideg ingerlése teljesen meggátolta a field ingerléssel, valamint gasztrin-II-hexapeptid által

kiváltotta kontrakciókat. α-receptor bénitóval, phentolaminnal ez a gátlás felfüggeszthető volt /34. ábra/. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a szimpatikus ideg ingerlésére felszabaduló transzmitter anyag a NA elegendő magas koncentrációt ér el a kolinerg végkészülék közelében, hogy ott az ACh felszabadulását gátolni tudja anélkül, hogy az ACh hatását a simaizom befolyásolná.



34. ábra

A szimpatikus ideg ingerlésének gátló hatása axonális illetőleg ganglion sejt ingerléssel kiváltott kolinerg neurokémiai transzmisszióra. Izolált nyul szimpatikus ideg-jejunum preparátum /FINKELMAN, 1930/. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2.
a/ szimpatikus ideg ingerlés /symp.stim/: 10 Hz, 0.3 ms, 5 V; kolinerg ideg ingerlés /S/: 1 shock, 1 ms, 8V/cm. ACh, acetylkolin jodid, 30 ng/ml, 10^{-7} M.
b/ szimpatikus ingerlés /symp.stim./: 20 Hz, 0.5 ms, 10V; gastrin-II-hexapeptid/gast-II-hex/, 30 ng/ml, 10^{-8} M; phentolamin /phentol/ $2x10^{-6}$ g/ml. VIZI és KNOLL /1971/ illetve VIZI és mtsai, /1973/ dolgozatából.

A guanetidin, amely a szimpatikus ideg végkészülékéből noradrenalint szabadit fel, akut kisérletben mintegy utánozni tudja a szimpatikus ingerlés hatását. Kisérleteinkben /VIZI és KNOLL, 1971/ guanetidin $4x10^{-5}$M koncentrációban gátolta az ACh felszabadulását, ezerinezett nyul jejunumból /7a táblázat/ és tengeri malac ileum hosszanti simaizom - Auerbach'plexus preparátumból /7b táblázat/. Hogy a guanetidin hatása noradrenalin felszabadulással van összefüggésben igazolja az a tény is, hogy olyan preparátumon, amelyet guanetidin előkezelt állatból vettünk ki /15 mg/kg sc, 6 óra/, hatástalannak bizonyult /VIZI és KNOLL, 1971/. A guanetidin akut noradrenalin

7a táblázat

Szimpatikus ingerlés gátló hatása az ACh felszabadulásra. Nyul izolált jejunum /FINKELMAN,1930/. Krebs oldat, 95 % O_2+ + 5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 10 ml-es szerv fürdő. Szimpatikus ingerlés: arteriát kisérő ideg ingerlése, 10 V, 0.3 ms, 10 Hz.

	Gyüjtési periódus	Acetilkolin felszabadulás pmol/g.min	P
Nyugalmi /4/	5 min	32.0 ± 4.0	
Nyugalmi + szimpatikus ingerlés /4/	5 min	18.6 ± 1.46	< 0.01
Nyugalmi /3/	10 min	15,75± 2,2	
Nyugalmi + Guanethidine $4x10^{-5}$M /3/	10 min	6,52±0,88	< 0.01

Önkontrollos kisérlet. Zárójelben a kisérletek számát tüntettük fel.

7b. táblázat

Szimpatikus idegből felszabaditott noradrenalin acetilkolin felszabadulást gátló hatása. Tengeri malac hosszanti simaizom--Auerbach plexus preparátum /PATON és VIZI, 1969/. Krebs oldat. 95 % O_2 + 5 %CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. Szervfürdő, 3.5 ml. /VIZI és KNOLL, 1971; és KNOLL és VIZI, 1971. adatai/. Field ingerlés: 0.1 vagy 1.o Hz, 1 ms, 1o V/cm.

Készitmény	Gyüjtési periódus	Acetilkolin felszabadulás pmol/g.min	P
Nyugalmi /25/	15 min	15o,92±7,33	
+/-/-NA, $2x10^{-6}$M /5/	15 min	39,19 ±7,69	< 0,o1
+ guanethidine, $4x10^{-5}$M /5/	15 min	68,5o ±15,o2	< 0,o1
Ingerelt 0.1 Hz /15/	1o min	417,58±2o,51	
+ amphetamine, $5x10^{-4}$M /3/	1o min	148,72±7,69	< 0,o1
+ guanethidine $4x10^{-5}$M /3/	1o min	185,71±26,oo	< 0,o1
Ingerelt 1o Hz /3/	1 min	3865.o ±214.o	
+ guanethidine /3/ $4x10^{-5}$M	1 min	38o8.5 ±165,o	> 0,5

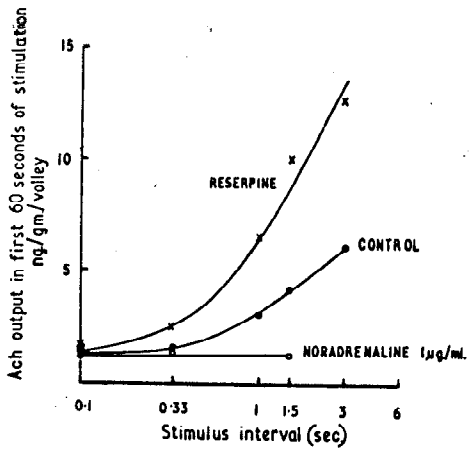
Zárójelben a kisérletek száma. Önkontrollos kisérlet.

felszabaditó hatását más szerzők is felhasználták a szimpatikus ideg ingerlésének pótlására: GARRETT és SOUSA /1973/, HARRISON és mtsai /1963/ azt találták, hogy guanetidin pozitiv

inotrop és kronotrop hatásu izolált pitvar készitményen, és ez a hatása a felszabaditható noradrenalin mennyiségétől függ. Magyarázatunkkal szemben felhozható olyan érv, hogy a guanetidin gátolja az idegi vezetést és ezért csökkenti a felszabaduló ACh mennyiségét. Ez viszont kizárható azzal a kisérleti ténnyel, hogy a guanetidin a nagy frekvenciás ingerléssel /lo Hz; 7b táblázat/ kiváltott ACh felszabadulást nem gátolta. A guanetidinnek ez a noradrenalinnal teljesen azonos jellegü hatása látható a 35. ábrán is, ahol az ezerin távollétében nem az ACh felszabadulását, hanem az azt indirekte jellemző kontrakciókat regisztráltuk.

4.4.1.2. Szimpatikus tónus csökkentésének ACh felszabadulását fokozó hatása.

Amennyiben igaz az a feltételezésünk, hogy az Auerbach'plexus, tehát egy kolinerg transzmisszióju neuron hálózat állandó jelleggel a szimpatikus noradrenerg idegrendszer befolyása alatt áll, akkor a noradrenerg dominancia csökkenésével a kolinerg transzmissziónak fokozódnia kell s fokozott Ach felszabadulást kell észlelni. E feltevés igazolására rezerpinnal kezeltük elő a tengeri malacokat. A 36. ábra mutatja, hogy az egy ingerre jutó felszabaduló ACh mennyiség a rezerpin kezelt állatokból vett hosszanti simaizom - Auerbach'plexus preparátumból lényegesen magasabb, mint a kontroll kisérletben. Egyébként az a tény, hogy lo Hz-es ingerlésnél a rezerpin előkezelés nem emeli meg a felszabadit-



36. ábra

Az Auerbach plexus NA tartalmának csökkentésének illetőleg a NA tulsulynak hatása a különböző frekvenicával felszabaditott ACh mennyiségére. Noradrenalin, bitartarát, 1 ug/ml, rezerpin előkezelés: 15, mg/kg s.c. két egymást követő nap. Kisérlet 6-8 órával az utolsó adás után. Stimulus interval= Hz^{-1}.

ható ACh mennyiségét, arra utal, hogy a nagyfrekvenciás ingerlésnél az endogén szimpatikus kontroll nem játszik szerepet az ACh felszabadulás modulálásában. A rezerpin kezelt preparátumon noradrenalin 10^{-6}M koncentrációban a 0.3 Hz-es ingerléssel felszabaditott ACh mennyiségét 164.4 $\pm$ 2.4 ng/g.min-ről 67.1 %-kal csökkentette. Rezerpin előkezelés egyébként a nyugalmi felszabadulást is fokozta 35 %-kal. /PATON és VIZI,1969/. Guanetidin - amelyről szintén ismert, hogy adása után pár órával a noradrenalin felszabadulás lecsökken, fokozta a felszabaduló ACh mennyiségét izolált preparátumon is. 15 mg/kg gua-

netidinnel előkezelt /6 h,s.c./ tengeri malacból kivett ileum hosszanti simaizom - Auerbach'plexus preparátumból az ACh felszabadulás szignifikánsan magasabb volt /45o ± 18.5 pmol/g.min/ mint a kontroll állatokból vett Auerbach plexusból /28o.7 ± 13.6 pmol/g.min/ /n= 5; $p < 0.01$/. Ezek az adatok nagyon jól összhangban vannak azokkal a klinikai megfigyelésekkel, hogy rezerpin /Rausedyl/ vagy guanetidin /Sanotensin/ kezelés alatt gyakori mellékhatás a diarrhea, azaz a fokozott bélmüködés.

α-receptor bénitó phentolamin is fokozza az ACh felszabadulást Auerbach'plexusból /PATON és VIZI, 1969/. Ez a hatás is arra vezethető vissza, hogy az endogén NA preszinaptikus gátló hatása függesztődik fel α-receptor gátló jelenlétében.

4.4.2. Központi idegrendszer

Korábbi kisérleteinkben igazoltuk, hogy a kolinerg transzmisszió noradrenerg modulációja a központi idegrendszer területén is érvényesül: membrán ATPáz gátlás ACh felszabadító hatását noradrenalin illetőleg a szelektiv α-receptor izgató BAY-147o gátolta patkány izolált cortex szeleten /lásd 4.1.3/. Ezekből a kisérletekből mindenesetre arra lehet következtetni, hogy az agykéreg neuronhálózataiban müködő kolinerg transzmisszió is modulálható noradrenalinnal. A kérdés azonban jogosan merül fel: vajon normális fiziológiás körülmények között a perifériához hasonlóan a noradrenerg idegrendszer /31. ábra/, amely a központi idegrendszeren belül is feltehetően fontos funkciót tölt be, hogyan befolyásolja,

modulálja a kolinerg transzmissziót. Amennyiben a kolinerg transzmisszió, az acetilkolin felszabadulás állandó jelleggel a NA befolyása alatt áll, akkor a NA neuronok aktivitásának csökkentése az ACh fokozott felszabadulásához kell hogy vezessen.

Kisérleteimkben 6-OH-Dopamint adtunk /loo ug/ intraventriculárisan, és 1 nappal a beadás után az állatot dekapitáltuk és az agykéregből illetőleg a striatumból vékony szeleteket készitettünk a VIZI és mtsai /1971/ által leirt módszer szerint.

4.4.2.1. Agykéreg

Az ouabain $2x10^{-5}$M koncentrációban 18.3 ± 1.3 pmol/g.min-ről 21o.6 ± 13.4 pmol/g.min-re fokozta az ACh felszabadulását izolált agykéreg szeletben /VIZI, 1975/ 6-OH-Dopaminnal előkezelt állaton a nyugalmi felszabadulás 26.5 ± 1.8 pmol/g.min volt. Ouabain ezt a felszabadulási sebességet 31o.4 ± 16.3 pmol/g.min-re növelte /8. táblázat/. Az ouabain ACh felszabadulást fokozó hatása lényegesen jobban érvényesül α-receptor gátló jelenlétében. Phentolamin 10^{-6}M koncentrációban fokozta az ouabain ACh felszabaditó hatását /32. ábra/. Mivel minden valószinüség szerint agykéregből a membrán ATPáz gátlása az ACh mellett noradrenalin felszabaduláshoz is vezet, amint azt vas deferens preparátumon igazoltuk /VIZI,1975/, feltételezhető, hogy az ouabain által felszabaditott noradrenalin

8. táblázat

Acetilkolin felszabadulása noradrenalin illetve dopamin szegénnyé tett patkány izolált agykéreg illetőleg bazalis ganglion szeletből

	Acetilkolin /S.E.M./		
	tartalom, nmolg/g	felszabadulás*, pmol/g.min	
		nyugalmi	+ Ouabain $2x10^{-5}$M
Cortex	4.82 ± 0.55 /4/	18.3 ± 1.3 /6/	210.6 ± 13.4 /10/
Cortex /6-OH-Dopamin előkezelt/ **	-	26.5 ± 1.8 /3/	310.4 ± 16.3 /5/
Bazalis ganglion	8.62 ± 1.0 /4/	24.6 ± 3.1 /8/	97.1 ± 16.5 /4/
Bazalis ganglion /6-OH-Dopamin előkezelt/ **	12.4 ± 3.63 /4/	52.8 ± 6.3 /4/	815.2 ± 160.9 /4/

* Gyüjtési periodus, 10 perc. Krebs oldat. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 40-200 ng sulyu szeletek. Kisérletek száma zárójelben

** 6-OH-Dopamin /100 µg/ aszkorbinsav oldatban lett oldva és 10 µl-ban lett intracerebrálisan adva NOBLE /1967/ módszerével.

egyben csökkenti is az ouabain hatását az ACh felszabadulásra. Ezt a feltevésünket látszik igazolni a 6-OH-Dopaminnal, illetve a phentolaminnal kapott kisérleti eredmények.

9. táblázat

Centrális noradrenerg rostok roncsolásának hatása a patkányok görcskészségére

		görcs foka /Leptazol 8o mg/kg /			
	állat szám	+	++	+++	++++
1. Control	1o	7	3	0	0
2. 6-OH-Dopamin	1o	2	0	4	4
3. α-MT,	10	3	1	4	2
4. p-CPA,	10	6	4	0	0
5. 6-OHDA+ +p-CPA	10	1	3	2	4
6. Rezerpin	10	0	3	4	3

+ = Ø görcs, a fej myoclonusos rázása a jellemző;

++= klonusos görcs, v. a righting reflex elvesztése

+++= tonusos görcs a mellső és hátsó végtagokon

++++= tonusos görcs a mellső és hátsó végtagokon

6-OH-Dopamint /2oo ug/ intraventricularisan /0.o2 ml/állat/ adtuk E.P.NOBLE módszerével /1967/. 5. napon Leptazolt adtunk subcutan. α-MT, α-metil-p-tyrozin, 6o mg/kg s.c.; p-CPA, p-Chlorophenylalanin, 312 mg/kg, s.c.; resertin, 1.5 mg/kg s.c. 24 h.

5:1, X^2 = 2.4 $p < 0,05$; 2:1, X^2 = 16,11 $p < 0.01$; 2:5, X^2 = = 4,0 $0,5 > p > 0,2$; 3:1, X^2 = 8,6 $p < 0.05$.

Epilepszia modellje

Miután abban a nemzetközi irodalom is egyetért, hogy az agykéreg elektromos aktivitása a felszabaduló ACh mennyiségével van szoros összefüggésben és az is minden kétséget kizáróan megállapitható, hogy az agykéreg neuronjainak görcs aktivitása egy fokozott ACh felszabadulással van összefüggésben. Igy feltételezhetjük, hogy a membrán ATPáz gátlással /ouabain/ kiváltott fokozott ACh felszabadulás az epilepszia modelljének is tekinthető. Ezt a feltételezésünket támogatja az az elképzelés is, hogy epilepsziás gócban olyan ionális változásokat találtak /ESCUETA, 1974/, amelyeket a membrán ATPáz gátlás is eredményez: intracelluláris Na nő, K csökken. Továbbá megállapitották, hogy az egyik legjobb antiepileptikumkén ismert diphedan hatására viszont a Na_i csökken és K_i nő. Ezek az adatok továbbá azok az eredményeink, hogy a noradrenerg rostok szelektiv destrukciója fokozott ACh felszabaduláshoz /8.táblázat/ és a görcskészség fokozódásához /9. táblázat/ vezetnek arra utalnak, hogy szoros összefüggés van a kéreg végkészülékeiből felszabaduló ACh mennyisége és sebessége valamint a kéreg elektromos aktivitása között.

Adataink arra is utalnak, hogy a görcskészség alakulásában a noradrenalin fontos szerepet játszik. Erre a következtetésre jutott PFEIFFER Klára is doktori disszertációjában. Bár ő a NA tartalom változásának tulajdonitott jelentőséget.

Kisérleteink alapján viszont nem a noradrenalin tartalom változásának tulajdonitjuk a kulcs szerepet, hanem az agykéregben illetőleg subcorticalisan lecsökkent NA felszabadulást követően az agykéreg területén létrejövő fokozott ACh felszabadulásnak.

4.4.2.2. Bazalis ganglion

A központi idegrendszerben a nucleus caudatus /BERTLER és ROSENGREN, 1959 és KARLSSON, 1969/ tartalmazza a legnagyobb mennyiségben a dopamint. McLENNAN és YORK /1966/, valamint VOGT /1969/ viszont azt is bebizonyitotta, hogy a nucleus caudatusból dopamin szabadul fel. Ugyanakkor kimutatták, hogy a nucleus caudatusba dopamint tartalmazó neuronok futnak be a substantia nigrából /ANDEN és mtsai, 1967/. A 8. táblázat mutatja, hogy az ouabain szignifikánsan megemelte az ACh felszabadulást a bazalis ganglionból is, és ez a hatása noradrenalin ill. dopamin szegényitett bazalis ganglionban még jelentősebben érvényesül: az előbbi esetben az ACh felszabadulás 24.6 ± 3.1-ről 97.1 ± 16.5 pmol/g.min-re ill. 52.8 ± 6.3-ről 815.2 ± 16o.9 pmol/g.min-re emelkedett.

4.5. A kolinerg és noradrenerg idegrendszer közötti kölcsönhatás morfológiai bizonyitékai.

Funkcionálisan tehát bizonyitottnak vehetjük, hogy a szimpatikus ideg ingerlésekor elegendő mennyiségü NA szabadul fel, hogy receptorialis szinten gátolni tudja a kolinerg ideg-

ből az ACh felszabadulását.

LÖFFELHOLZ és MUSCHOLL /197o/ izolált nyul pitvaron igazolták, hogy a paraszimpatikus ideg ingerlésekor a szimpatikus ingerlésére felszabaduló NA mennyisége lecsökken. Ez azt is jelenti, hogy nemcsak a noradrenerg idegből felszabaduló NA gátolja az ACh felszabadulását, hanem forditva is igaz a preszinaptikus gátlás jelensége: a felszabaduló ACh gátolja a NA felszabadulását. THOENEN és TRANZER /1968/ sziven elektronmikroszkópikos vizsgálatokkal kimutatták, hogy a noradrenerg és a kolinerg idegek Schwann-sejt izoláció nélkül juxtapozicionálisan helyezkednek el. EHINGER és mtsai /197o/ patkány irisben axo-axonális szinapszisokat találtak kolinerg és noradrenerg idegek között.

NORBERG /1964/, JACOBOVICZ /1965/ adatai egyértelmüen azt bizonyitják, hogy az adrenerg idegek az Auerbach plexus ganglionjait körülfogják anélkül, hogy a simaizmot beidegeznék. Mások is megerősitették ezeket az adatokat /NORBERG és SJÖKVIST,1966; FURNESS, 197o; SILVA és mtsai,1971; FEHÉR és VAJDA,1974/. A hosszanti simaizomban noradrener végkészüléket elektronmikroszkóposan sem találtak /GABELLA 197o; 1971 és COSTA és GABELLA,1971/. Saját elektronmikroszkópos vizsgálatainkban/GARAMVÖLGYI, VIZI és KNOLL, 1971 /, amikor kimondottan az ileum hosszanti simaizmának ultrastrukturájával foglalkoztunk és leirtuk, hogy feszülés hatására vastag filamentumok mutathatók ki, egyetlen egy alkalommal sem találtunk kolinerg

vagy adrenerg végkészüléket vagy axont a simaizom rostok között. Ez azt jelenti, hogy a tengeri malac ileum hosszanti simaizom - Auerbach plexus között egy rendkivül primitiv neurokémiai transzmissziós hely van. Az ACh az Auerbach plexus végkészülékeiből felszabadulva diffuzió utján éri el a simaizom sejteket, amelyeken nincs specializáltan kialakult, ACh-ra érzékeny receptor zóna, tulajdonképpen a simaizom egész felszine érzékeny az ACh iránt. Talán éppen ezért ez a szinapszis nagyon alkalmas arra, hogy az ACh felszabadulását tanulmányozzuk. A PATON és VIZI /1969/ módszerével készitett 5o u vastag preparátum, amelynek felszinén az Auerbach plexus fekszik, rendkivül diffuzibilis és ha egy kis tulzással is, de a szervfürdő oldata extracelluláris térként kezelhető, amit nem szükséges külön hangsulyozni, hogy milyen lehetőségeket teremt a kutató számára. A Krebs oldat ionális miliójének változtatása gyakorlatilag az extracelluláris tér azonos irányu ionális változásának hatásait hozza létre, amelyek más izolált preparátumok esetén /agy-szelet, szivizom, neuromuszkuláris jukcio, stb./ nem érhető el. Az intracelluláris tér, amely a legkülső sejtektől eltekintve az extracelluláris tér, ion koncentrációja barrier problémák miatt a szervfürdők ion miliójének változásával csak nehezen befolyásolható. Elektronmikroszkóposan /UNGVÁRI és VIZI, nem közölt adat/ egyetlen egy esetben sem sikerült axo-axonális szinapszist találni az Auerbach plexusban. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a noradrenalin, felszabadulva a végkészülékből diffuzió utján éri el a kolinerg végkészüléket és ott gátolja, modulálja az ACh

felszabadulást. Ez a preszinaptikus gátlás egy olyan formáját bizonyitja, amikor a gátló anyag diffuzió utján /1oo-3oo nm/ éri el az ACh tartalmazó végkészüléket.

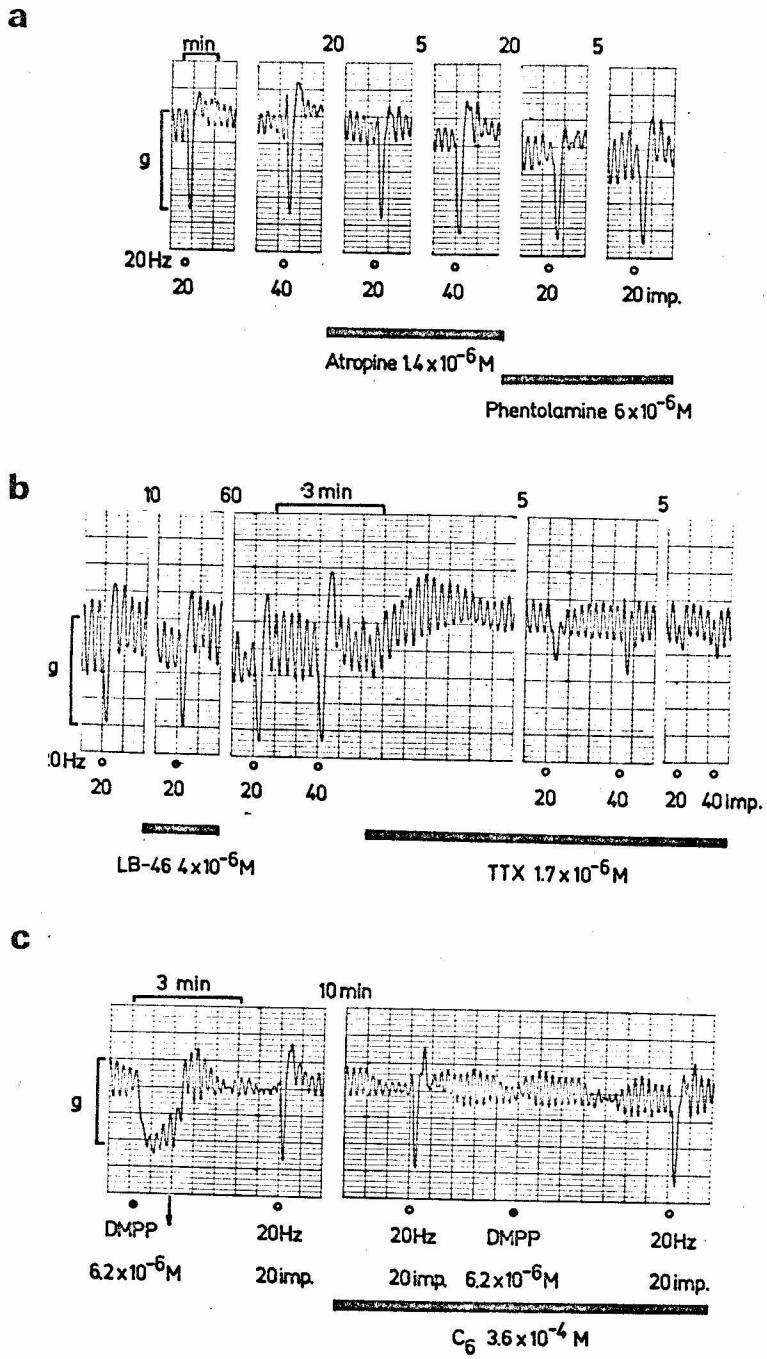
4.6. ACh felszabadulás humán colon Auerbach plexusából. Hirschsprung-betegség.

Emberi bél izolált készitményéből CREMA és mtsai /DEL TACCA és mtsai, 197o/ mértek először ACh felszabadulást. Megállapitották, hogy a katecholaminok gátolják az ACh felszabadulását humán Auerbach plexusból is. Ezzel tulajdonképpen bizonyitást nyert, hogy az adrenerg idegrendszer transzmitter anyaga, a NA, nemcsak a tengeri malac gasztrointesztinális traktusában, hanem emberben is gátolja az ACh felszabadulást. Egy nem-adrenerg transzmisszióju gátló idegi mechanizmust is leirtak emberi colonban /CREMA és mtsai, 1968/. Megfigyelték, hogy az adrenerg idegrendszer szelektiv gátlása után transzmurális ingerlés hatására a bél mozgása gátlódik.

Az elmult években több dolgozat jelent meg a colon egy sajátos megbetegedéséről a megacolon congenitum-ról a Hirschsprung-kórról. Idült, intermittáló obstipáció, haspuffadás, hányás, intesztinális obstructio, a colon röntgenológiailag igazolható tágulata a jellemző klinikai kép. A distalis, spastikus, szük szakaszt az Auerbach plexus ganglionjainak a hiánya /BODIAN, CARTER és WARD, 1951; HOWARD és NIXON, 1968; GARRETT

és HOWARD, 1969/ és fluoreszcens technikával igazolt dusabb adrenerg beidegzés /BENNETT és mtsai, 1968; GANNON és mtsai, 1969; TOULOUKIAN és mtsai, 1973/ jellemzi. Ma már kétséget kizáróan tudjuk, hogy nem a tág, proximális szakasz a beteg rész, hanem a distalis szakasz. A proximaális részen kialakult tágulat csupán mechanikus következménye a distális szükületnek. FRIGO és mtsai /1973/ Hirschprung-kórban szenvedő gyermekek mütét utján eltávolitott szük szakaszából magasabb ACh felszabadulást mértek. Ez arra utal, hogy esetleg az állandó szükületet egy fokozottabb kolinerg beidegzés okozná a simaizom muscarin receptorainak permanens izgatása révén.

A kérdést tanulmányoztuk, mivel arra gondoltunk, hogy humán farmakológiai kisérletekben is lehetőség nyilik a neurokémiai transzmisszió tanulmányozására. Kisérleteinkhez 2 hónaptól 4 évig terjedő életkoru Hirschprungos gyermekek mütéti anyagát használtuk fel. A diagnózist minden esetben szövettani vizsgálatok erősitették meg. A rezekált vastagbelet szobahőfokon /22°C/ karbogénnel átáramoltatott Krebs oldatban helyeztük el. A rezekció után 3o percen belül 37°C-u 3.5 ml térfogatu szervfürdőben Krebs oldatban függesztettük fel a körkörös izomtól megszabaditott hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátumot, amely kb. 5 cm hosszu, 4-5 mm vastag és széles valamint 15o-25o mg sulyu volt. Izometriásan regisztráltuk a kontrakciókat. Ezerin szulfát jelenlétében az ACh felszabadulást mértük. A spasztikus szakaszból nyugalmi körülmények között



37. ábra

Hirschsprung-kórban szenvedő beteg colonjának tág szakaszából készitett hosszanti simaizom-Auerbach plexus szelet /l. Appendix 8.1.4. fejezet/

a/ ingerlés /2o Hz, 2o és 4o shock, 1 ms, lo V/cm/ hatása, a relaxáció atropin és phentolamin rezisztens

b/ ingerlés hatása, a relaxáció gátlása TTX-al bizonyitva az idegi eredetet

c/ Ganglion izgató /DMPP/ és ingerlés hatása
Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2. Izometriás regisztrálás.

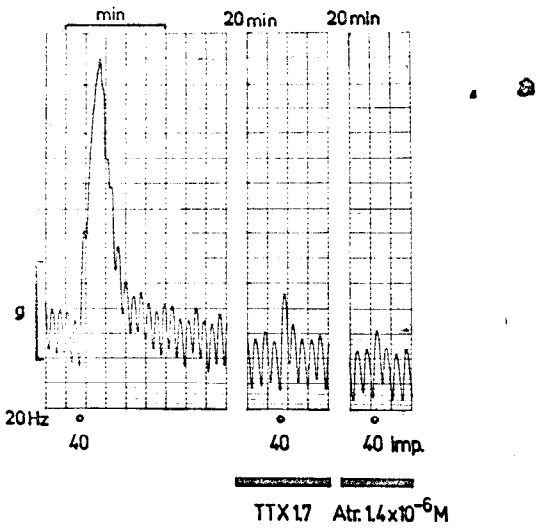
6.57 ± 2.o5pmol/g.min /n= 4/ ACh szabadult fel. 1 Hz-es ingerlés /1 ms, 1o V/cm, 15 perc/ hatására ez 12.46 pmol/g. min-re emelkedett. 1o Hz-es ingerlésnél a felszabadulás már 81.37 pmol/g.min volt /n=3/. Dilatált szakaszban a felszabadulás mértéke kisebb volt: a fenti értékek megfelelője e részben 3.58±1.26 /n=3/, 7.86 /n=2/ és 13.92±3.32 pmol/ g.min /n=3/ volt. Feltünő, hogy az értékek minden esetben alacsonyabbak, mint a szük részben. Tetrodotoxin /$1o^{-6}$M/ gátolta az ingerlés által kiváltott ACh felszabadulását. Gélkromatográfiás - biológiai titrálás kombinált módszerünkkel /1. függelék 2o4. oldal/ igazoltuk, hogy a spazmogén anyag, amit kivontunk és megtitráltunk az valóban ACh.

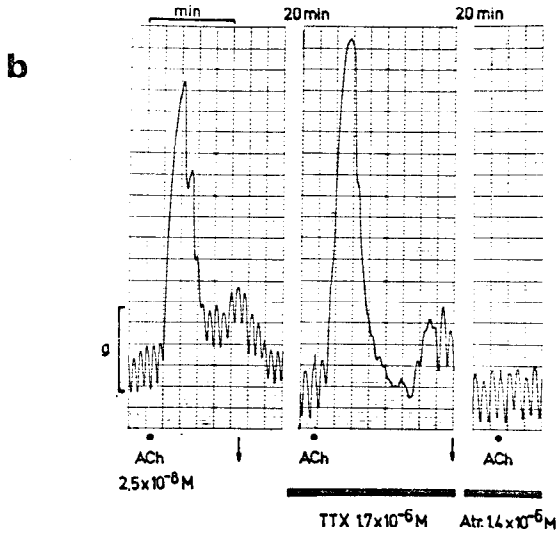
McINTOSH és PERRY /195o/ módszerével megmértük a szük és a tág szakasz ACh tartalmát: a szük szakaszban /11.3±2.3 nmol/g/ szignifikánsan több ACh volt mint a tág szakaszban, /5.57± ±0.98nmol/g / /n= 9, $p < 0.o5$/.

Egy esetben 1o Hz-es ingerlés mellett megmértük az Auerbach plexusban az ACh szintézisét VIZI és mtsai /1972/ módszerével. 75 perces folyamatos ingerlés után az ACh tartalom nem csökkent le s mivel jelentős mennyiségü ACh szabadult fel igy a végkészülékben nagy mennyiségü ACh szintetizálódott. A szintézis kiszámitott sebessége 2.1o nmol/g.h volt, ami viszont egy érdekes problémát veti fel. Ismert,hogy a szük szakasz Auerbach plexusa ganglion mentes. Ez azt jelenti, hogy a szintézishez nem szükséges a ganglion sejtek jelenléte? A kérdés természetesen további vizsgálatokat igényel.

Funkcionális vizsgálatokkal /3 eset/ igazoltuk izolált preparátumon, hogy a szük szakaszból nyert Auerbach plexus hosszanti simaizom preparátum ACh érzékenysége lényegesen nagyobb, mint a proximális szakasz simaizma. A különbség kb. 10-szeres volt. Érdemes itt megjegyezni, hogy FRIGO és mtsai /1973/ nem találtak különbséget.

Szelektiv ganglion izgatóval igazoltuk, hogy a szük szakaszban nincsenek ganglionok. DMPP /2 ug/ml/ koncentrációban teljesen hatástalan volt a szük szakaszból nyert preparátumon, ellentétben a dilatált szakasszal, ahol kontrakciót és relaxációt okozott. Az Auerbach plexus ingerlésénél /field ingerlés/ a szük szakasznál csak kontrakciókat észleltünk, a tág szakasznál kontrakciót és relaxációt /37. és 38. ábra/. Atropin és TTX gátolt az elektromos ingerléssel kiváltott kontrakciókat; a relaxációt sem α-gátló /phentolamin/ sem β-receptor gátló /LB.46/ nem befolyásolta, TTX viszont teljesen megszüntette. Ez az adat felveti, hogy a proximális szakaszban egy nem adrenerg gátló ideg okozza a relaxációt, amely lehetséges, hogy egyezik a BURNSTOCK /1972/ által leirt purinerg ideggel. Elképzelhető, hogy ez a gátló moduláló /1.5. fejezet/ faktor hiányzik megakolon esetén és ez esetleg fokozott ACh felszabadulást eredményez, mivel kimutattuk /1. 5.1. fejezet/, hogy az adenin nukleotidok preszinaptikusan gátolják, moduláljják az ACh felszabadulását. A posztszinaptikus membrán ACh iránti fokozott érzékenysége szintén szerepet játszhat a bélszakasz állandó spazmusának létrejöttében. A





38. ábra

Hirschsprung-kórban szenvedő beteg colonjának szűk szakaszából készitett hosszanti simaizom-Auerbach plexus szelet.

a/ ingerlés hatása

b/ ACh hatása

Egyébként lásd a 37. ábra szövegét

A szervezet természetesen megpróbálja kompenzálni a purinerg negativ moduláció hiányát, hogy egy fokozottabb adrenerg innervációt biztosit amit az a tény is bizonyit, hogy az adrenerg rostok száma megnő. Ez azonban a ganglion sejtek hiányában csak részben sikerülhet. A nyugalmi ACh felszabadulás és a simaizom sejtek fokozottabb érzékenysége a spazmust eredményezi. A ganglion sejtek és ennek következtében a gastrointesztinális hormonok, valamint a fiziológiás reflex lánc összeköttetésének a hiánya következtében ezen a bél szakaszon a perisztalzis is hiányzik, mint ahogyan azt a klinikai adatok is igazolják.

5. ADENIN NUKLEOTIDOK ACh FELSZABADULÁST GÁTLÓ HATÁSA

Már 1929-ben DRURY és SZENTGYÖRGYI Leirták, hogy az adenozin gátolja altatott mecsakán a belek mozgását. BURNSTOCK /1972/ összefoglalójában annak a véleményének adott nyilvánosságot, hogy a bélben egy olyen gátló funkciót betöltő neuron is létezik, amely se nem kolinerg, se nem adrenerg. Elektrofiziológiailag és biokémiailag bizonyitották, /BURNSTOCK 1972/, hogy a gátló transzmitter anyag egy purin alkaloida, valószinüleg az ATP. Meg kell jegyezni, hogy KUCHII és mtsai /1973/ kétségbevonták a purin alkaloidok szerepét a bélmozgások gátlásában.

10. táblázat

Adenozin és ATP gátló hatása az Auerbach plexus végkészülékeiből nyugalmi /resting/ és cholecystokininnal kiváltott ACh felszabadulásra. Tengeri malac hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátum.

		gyüjtési periódus/min/	ACh felszabadulás pmol/g.min /S.E.M./	szignifikancia p
1.	- /35/	10	162.4 ± 2.8	-
2.	Adenozin, 4×10^{-5}M /4/	10	85.3 ± 3.8	2:1 <0.01
3.	ATP, 10^{-4}M /4/	10	80.1 ± 6.9	3:1 <0.01
4.	Cholecystokinin 10^{-7}M /3/	10	395.9 ± 36.6	4:1 <0.01
5.	Cholecystokinin 10^{-7}M + Adenozin, 4×10^{-5}M /3/	10	96.4 ± 8.1	5:4 <0.01

Zárójelben a kisérletek száma. Krebs oldat. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 95 % O_2 + 5 % CO_2. Szervfürdő: 3,5 ml. 37°C.

11. táblázat

ATP és teophyllin hatása az ingerléssel kiváltott ACh felszabadulásra Auerbach plexusból.

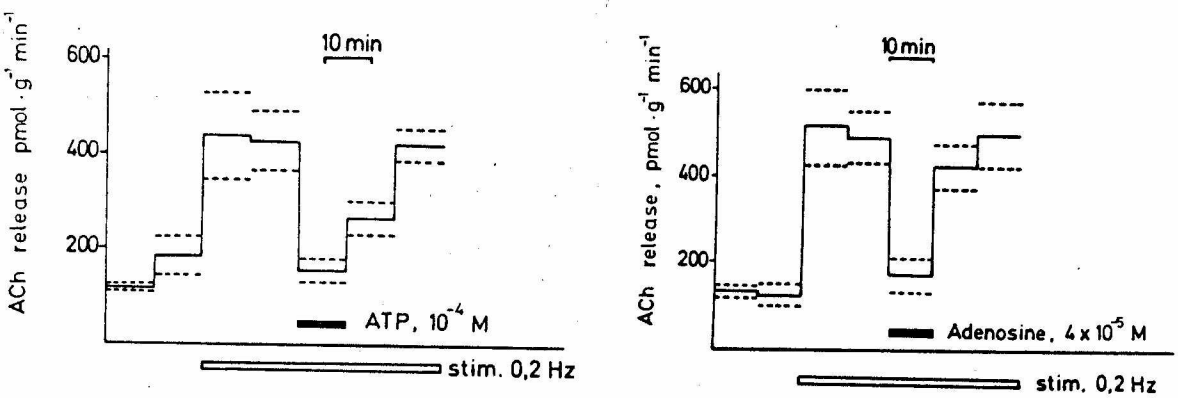
		Gyüjtési periódus /min/	ACh felszabadulás pmol/g.min /S.E.M./	Szignifikancia P
1.	0.2 Hz /14/	10	420.8 ± 11.1	-
2.	0.2 Hz+ATP, 10^{-4}M// 3/	10	132.3 ± 17.5	2:1 < 0.01
3.	0.2 Hz+Theophyllin, 1.7×10^{-4}M /3/	10	518.4 ± 24.9	3:1 < 0.05
4.	0.2 Hz+Theophyllin, 1.7×10^{-4}M+ATP, 10^{-4}M /3/	10	346.5 ± 30.8	4:2 < 0.01
5.	0.2 Hz, Ca^{2+}-túlsúly /3/	10	461.5 ± 26.8	5:1 > 0.05
6.	0.2 Hz, Ca^{2+}-túlsúly + ATP, 10^{-4}M /3/	10	159.8 ± 28.3	6:2 > 0.5
7.	10 Hz /3/	1	3068.2 ± 160.5	-
8.	10 Hz+ATP, 10^{-4}M /3/	1	2980.0 ± 310.0	8:7 > 0.5

Zárójelben a kisérletek száma. Krebs oldat. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 95 % O_2+ 5 % CO_2. Szervfürdő: 3,5 ml. 37°C. Szupramaximális field ingerlés: 10V/cm, 1 ms. Ca^{2+}-tulsuly: 5 mM $CaCl_2$.

5.1. Vegetativ idegrendszer

Kisérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a purin alkaloidok /adenozin, AMP, ADP, ATP/ hogyan befolyásolják a bél mozgásában alapvető szerepet játszó ACh felszabadulását. Az adenozin /4x10^{-5}M/ és az ATP szignifikánsan csökkentette az ACh nyugalmi felszabadulását 162.4 ± 2.8 pmol/g.min-ről 85.3 ± 3.8, illetőleg 8o.1 ± 6.9 pmol/g.min-re. Ha az ATP koncentrációját tovább emeltük /10^{-3}M/ az ACh felszabadulás nem csökkent tovább; a felszabadulás 81.5 ± 5.8 pmol/g.min - /n=3/ volt. Adenozin /4x10^{-5}M/ szignifikánsan gátolta az Auerbach plexusban a ganglionok izgatásával ACh-t felszabaditó/VIZI és mtsai, 1972/ cholecystokinin hatását /1o. táblázat/. Az ATP /10^{-4}M/ csökkentette a field ingerléssel felszabaditott ACh mennyiséget is /39. ábra/. Ezt a hatását a teophylline /1.7 x 10^{-4}M/ teljesen felfüggesztett /11. táblázat/. Theophyllyn, amely az adenozin receptort gátolja /McILWAIN, 1972/ fokozta a kis és nagy frekvenciával kiváltott ACh felszabadulást /0.1 és 1o Hz/. Az ATP hatását a Krebs oldat Ca^{2+} tartalmának emelése nem befolyásolta /11. táblázat/. Ez kizárja annak a lehetőségét, hogy az ATP a Ca belépést gátolva fejtené ki hatását. A 39. ábra mutatja az ATP illetőleg az adenozin axonális ingerléssel /0,2 Hz/ kiváltott ACh felszabadulást gátló hatását az Auerbach'plexusból, az idő függvényében.

Az adenin nukleotidok ACh felszabadulást gátló hatását természetszerüleg ezerin jelenlétében kellett vizsgálnunk, mivel



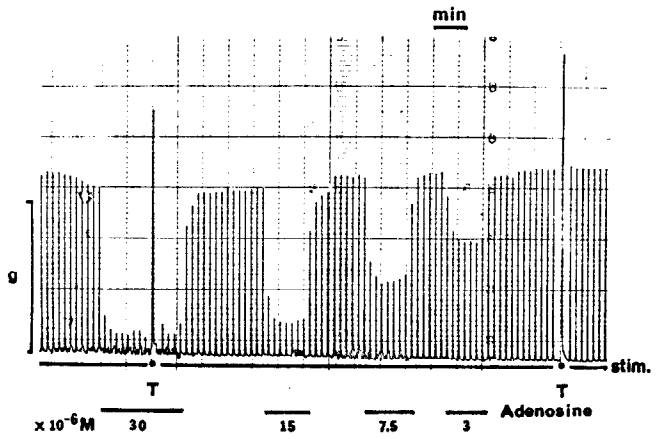
39. ábra

Az ATP /a/ és adenozin /b/ axonális ingerléssel kiváltott ACh felszabadulást gátló hatása. Tengeri malac izolált hosszanti simaizom preparátum. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2+5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. Field ingerlés, 0,2 Hz, 1ms, 10V/cm. 4 kisérlet átlaga. S.E.M.

direkt bizonyitékokat kivántunk kapni az ACh felszabadulást illetően. Azonban hogy meggyőződjünk arról, hogyan befolyásolják a nukleotidok az autonom idegrendszer területén a kolinerg transzmissziót, mint előző kisérleteinkben, most is ingerelt hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátumot használtunk és a kontrakciókat izometriásan regisztráltuk. Az adenozin /10^{-6}-$3x10^{-5}$M/, az AMP, ADP és az ATP 10^{-6}-10^{-4}M koncentrációban gátolták a 0.1 Hz-es ingerléssel kiváltott kontrakciókat anélkül, hogy az effektor sejt érzékenységét jelentősen befolyásolták volna /lásd 40-41. ábrák/. A 41. ábrán bemutatjuk, hogy az ATP 10^{-4}M koncentrációban teljesen gátolta az 0.1 Hz-es ingerléssel kiváltott kontrakciókat, anélkül, hogy a 10 Hz 50 shockkal kiváltott kontrakciót befolyásolta volna. Ez arra

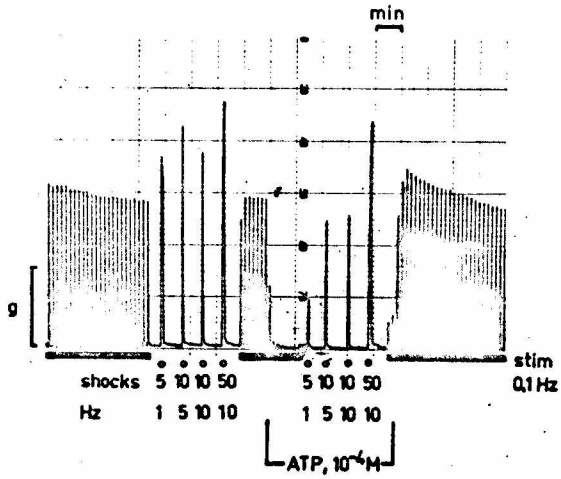
utal, hogy a posztszinaptikus membrán érzékenysége nem változik ACh iránt. Az adenin nukleotidok ismételt adása esetén nem észleltük a tachyphylaxia jelenségének kialakulását. Ugyanakkor azonban megfigyelhető volt, hogy 10^{-4}M-nál nagyobb koncentráció esetén a simaizom összehuzódott.

A guanozin trifoszfát még $2x10^{-4}$M koncentrációban sem befolyásolta a 0.1 Hz-cel kiváltott kontrakciókat. Ciklikus AMP dibutirát sója 10^{-4}M koncentrációban sem befolyásolta a kontrakciókat. Nagyobb koncentrációban azonban /10^{-3}M/ gátolta mind a 0.1 Hz-es ingerléssel, mind az exogén ACh-val kiváltott kontrakciókat, ami arra utal, hogy a posztszinaptikus



4o. ábra

Adenozin kolinerg neurokémiai transzmisszió gátló hatása. Tengeri malac izolált hosszanti ileum hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátum. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2.
T = 10 Hz 10 shock. Az adenozin koncentráció függően gátolta az 0.1 Hz-es /stim./ ingerlés által kiváltott kontrakciókat.



41. ábra

ATP kolinerg neurokémiai transzmissziót gátló hatása. Tengeri malac ileumizolált hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátum. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2. Field ingerlés. ATP frekvencia és shockszám függően gátolt a transzmissziót.

membrán érzékenységét is befolyásolja. Miután kimutattuk, hogy a gastrin, illetőleg a cholecisztokinin, mint enterális hormonok fontos szerepet játszanak a bél motilitásának fenntartásában, megvizsgáltuk, hogy az adenozin nukleotidok hogyan befolyásolják a cholecisztokinin által kiváltott kontrakciókat. A nukleotidok 10^{-6} - 10^{-5} M koncentrációban, az alkalmazott koncentrációtól függően, gátolták a cholecisztokinin által kiváltott kontrakciókat. A 42. ábrán egyébként látható, hogy az adenozin $2x10^{-5}$ M koncentrációban nem befolyásolja az ACh által okozott kontrakciót.

5.2. Központi idegrendszer. Agykéreg.

Az adenozin és az ATP nem befolyásolták az ACh nyugalmi felszabadulását patkány izolált agykéreg szeletéből. Ugyanakkor

12. táblázat

Adenozin és ATP hatása az ACh felszabadulásra patkány izolált agykéregszeleten.

		Gyüjtési periódus /min/	ACh felszabadulás pmol/g.min /S.E.M./	Szignifikancia P
1.	-	10	23.97 ± 2.18 /8/	
2.	Adenozin $3x10^{-5}M$	10	18.97 ± 2.8 /3/	2:1 < 0.61
3.	ATP, $10^{-4}M$	10	19.2 ± 3.1 /3/	3:1 n.s.
4.	Teophyllin, $1.7x10^{-4}M$	10	32.7 ± 1.8 /4/	4:1 n.s.
5.	Morphin $3x10^{-5}M$	10	19.0 ± 2.1 /3/	5:1 n.s.
6.	BAY-1470, $10^{-5}M$	10	21.8 ± 1.1 /3/	6:1 n.s.
7.	Ouabain, $2x10^{-5}M$	10	218.3 ± 58.2 /3/	7:1 < 0.01
8.	Ouabain, $2x10^{-5}M$ Adenozin, $3x10^{-5}M$	10	165.5 ± 21.8 /3/	8:7 n.s.

Zárójelben a kisérletek száma. Krebs oldat. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 95 % O_2+ 5 % CO_2.
Szervfürdő: 3,5 ml. 37°C.

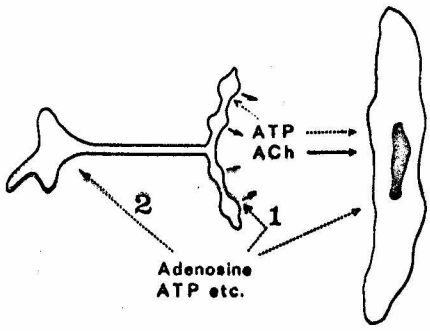
viszont teophyllin $1.7x10^{-7}$M koncentrációban szignifikánsan emelte az ACh felszabadulást, 23.97 ± 2.18 pmol/g.min-ről 32.7 ± 1.8-re /12. táblázat/. Az adenozin egyébként nem csökkentette a membrán ATPáz gátlással kiváltott ACh felszabadulást sem.

Felmerül most a kérdés, van-e fiziológiai jelentősége az adenin nukleotidok ACh felszabadulást gátló hatásának. Ha elfogadjuk BURNSTOCK /SU és mtsai, 1971; BURNSTOCK és mtsai, 197o; BURNSTOCK, 1972/ véleményét, hogy a gastrointestinális traktus területén purinerg rostok találhatók, amelyekből ATP vagy hasonló nukleotida szabadul fel, akkor jogos feltételezni, hogy a kolinerg transzmisszió preszinaptikus szintén érvényesülő noradrenerg gátlása mellett létezik egy purinerg moduláció is. Miután kimutatták azt is, hogy adenozin szabadul fel az agykéreg ingerlésekor /McILWAIN, 1972; és PULL és McILWAIN 1972/ igy most már az ATP receptor gátló teophyllin ACh felszabadulást fokozó hatását agykéregből ugy értékelhetjük, hogy az állandó purinerg kontroll alól szabadul fel az ACh felszabadulás. DOUGLES és POISNER /1966/ kimutatták, hogy a szimpatikus végkészülékből a noradrenalin mellett ATP is felszabadul. WHITTAKER és mtsai /1972/ az ACh-t tartalmazó vezikulákban jelentős mennyiségü ATP-t mutattak ki. Igy plauzibilisnek látszik az a feltételezés is, hogy az ATP vagy hasonló nukleotida a valódi transzmitterrel együtt felszabadulva gátolja az ACh felszabadulását.

Kisérleteink alapján plauzibilisnek látszik az a feltételezés, hogy az adenin nukleotidok vagy a végkészülékből vagy egy "purinerg" rostból felszabadulva moduláljják a neurokémiai transzmisszió. PHILLIS és KOSTOPOULOS /1976/ eredményei megerősitik elképzeléseinket, nevezetesen a központi idegrendszerben is az adenozin gátló funkciót tölt be. Kisérleteikben igazolták, hogy különböző adenozin származékok gátolják az agykéreg neuronjain az elektromos aktivitást. Igy elképzelhető, hogy az adenozin vagy valamelyik más adenin nukleotida mind a perifériás mind a centrális idegrendszer területén modulátor szerepet játszik: gátolja/k/ a transzmitter felszabadulását, igy a mérhető elektromos aktivitást is. E jelenség fiziológiai értelmezése, illetve bizonyitása még hátralevő, megoldandó feladat.

A kérdés most már csak az, hogy h o l és h o g y a n hat az adenozin illetőleg a hozzá hasonló nukleotida. A noradrenalin hatásához való hasonlósága miatt önként adódik a lehetőség, hogy feltételezzük, hogy a membrán ATPázt izgatják. Biokémiailag ki is mutatták, hogy az ATP fokozza az ATPáz aktivitását /ROBINSON 1973; YOSHIDA és mtsai 1969/.

Felmerül egy olyan lehetőség is, hogy a nukleotidok a cAMP szint növelésével gátolják a felszabadulást, amint azt McAFEE és GREENGARD /1972/ feltételezik. Ilyen elgondolás szerint a teophyllinnek, egy foszfodieszteráz gátlónak csökkentenie kellett volna az ACh felszabadulást. Az eredmény, amit kaptunk,



42. ábra
Adenin nukleotidok hatás helye. L. szöveg.

ezzel ellentétes volt; teophyllin növelte az ACh felszabadulást és gátolta a nukleotidok hatását.

A hatás helyét illetően a 42. ábra mutatja elképzeléseinket. Mivel "field" ingerlést használtunk igy a preeffektoriális axonból felszabaduló ACh gátlása feltétlenül a noradrenalinhoz hasonló preszinaptikus gátlásra utal /1/. Mivel a ganglionok izgatásával ható cholecisztokinin hatását teljesen felfüggesztette, igy elképzelhető, hogy az axonális inputot valahol az axon hillock táján gátolja, ahol az akciós potenciál is generalizálódik /2/.

Az adenin nukleotidok ACh felszabadulást gátló hatását illetően tulajdonképpen azonos következtetésre jutottak MORITOKI és mtsai /1976/ akik izolált egész ileumon azt találták, hogy a

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

methylxantionok /10^{-5} - 10^{-3}M/ fokozzák a transzmurális ingerlésre a választ ugy, hogy közben az exogén ACh és hisztamin kontrakciót okozó hatását csökkentették. Ez a hatás preszinaptikus jellegére utal. Megmérve az egy ingerre jutó felszabaduló ACh mennyiséget, azt találták, hogy a vizsgált methylxantinok közül /theobromin, coffein, teophyllin és imidazol/ a theobromin fokozza a legjobban az ACh felszabadulást, 0.26 ng/g.volley-ról 1.04 ng/g.volley-ra.

6. A Na^+-K^+-AKTIVÁLTA ATPáz PRE- ÉS POSZTSZINAPTIKUS MODULÁLÓ HATÁSA A KOLINERG NEUROKÉMIAI TRANSZMISSZIORA. AZ ELEKTROGÉN Na PUMPA FELFEDEZÉSÉNEK TÖRTÉNETE.

Az evolució során kialakult, hogy az állati szövetekben az ionok intra- és extracelluláris eloszlása különböző. Az intracelluláris közeg K^+-ban és organikus anionokban gazdag, ugyanakkor Na^+-ban és Cl^--ban szegény, ennek ellenkezője érvényes az extracelluláris térben. Ez az egyenetlen ion megoszlás számos fiziológiai jelenségben játszik fontos szerepet. Igy pl. az ion grádiensnek döntő szerepe van az impulzusok idegi vezetésében /HODGKIN, 1964/, az intracelluláris K^+ viszont nagyon sok enzim müködéséhez /acetyl-CoA-szintetáz, piruvátkináz, stb/.

A sejtek membránja polarizált: belső felszinük negativ a külsőhöz viszonyitva. A belső felszin negativitása a K^+ számára könnyebbé teszi a mozgást, ugyanakkor a kémiai gradiens is az ilyen irányu mozgást segiti elő. A Na^+ számára viszont mind a

kémiai, mind az elektromos grádiens gátlólag hat. Igy a Na^+ sejtből való kilépéshez energia szükséges, mely energiát a Na-pumpa szolgáltatja /l. SKOU, 1975/.

CALDWELL, HODGKIN, KEYNES és SHOW /196o/ szolgáltattak elsőként direkt bizonyitékot arra, hogy a Na^+ effluxhoz energia szükséges. Kisérleteikben azt tapasztalták, hogy tintahal óriás axonjából a radioaktiv Na^+ kiáramlása CN-al, DNP-al és aziddal gátolható volt. Az ATP intracelluláris adásánál a Na^+ kiáramlása ismételten megindult. Az extracellulárisan adott ATP viszont hatástalannak bizonyult.
Hasonló bizonyitékot kaptak vörösvérsejtek esetében is.
A fő probléma azonban annak bizonyitása, hogy melyik energia gazdag vegyület szállitja az energiát. GÁRDOS által kidolgozott rendkivül szellemes metodikával sikerült végülis igazolni, hogy Na^+-t csak akkor pumpál ki a sejt, ha intracellulárisan Na^+ és ATP van jelen. A pumpa aktivitásához tehát ATP jelenléte szükséges.

STRAUB /1952; 1953/ GÁRDOS /1954/, valamint GÁRDOS és STRAUB /1957/ megállapitották, hogy vörösvérsejtekben az egyenlőtlen ion megoszlás mindaddig fennáll, amig a vörösvérsejtekben elegendő ATP van jelen. GÁRDOS és STRAUB /1957/ azt találta, hogy a K vesztés forditott arányban áll az intracelluláris ATP koncentrációval.

SKOU /1957/ felfedezése, hogy az idegszövetben egy membránhoz kötött ATP-áz van jelen, amely Na^+ és K^+ ionokkal aktiválható,

továbbá az a következtetés, hogy a membrán ATP-áz és a Na^+, valamint K^+ transzport között szoros összefüggés áll fenn, inditotta meg azokat a kutatásokat, amelyek az enzim részleges vagy teljes fiziológiás szerepének tisztázásához vezettek. Az ATP hidrolizise két lépésből áll /1. SKOU,1965; SOMOGYI, 1968; 1973/. a protein Na^+ függő foszforilációja, melyet K^+ függő defoszforiláció követ. A membrán ATP-áz működése közben a Na^+ a membránon keresztül K^+-ra cserélődik ki, miközben egy intracelluláris ATP lebomlik ADP-re és anorganikus P-ra. A pumpa aktivitásához intracelluláris Na^+-ra és extracelluláris K^+-ra van szükség. A Na^+ enzim rendszerhez való affinitása a membrán belső oldalán mintegy 6-8-szor erősebb, mint a K^+-é. A külső oldalon a helyzet forditott, itt a K^+ affinitása az enzim rendszerhez jóval erősebb, mint a Na^+-é /GLYNN, 1962; LARIS és LETCHWORTH, 1962; WHITTAM, 1962; GARRAHAN és GLYNN, 1967/. Intracellulárisan az enzim aktiválásához Mg^+ jelenlétére is szükség van. A membrán külső oldalán számos kation képes helyettesiteni a K^+-ot az enzim aktiválásában, amelyek hatékonysági sorrendje a következő: $K > Rb > NH_4 > Cs > LI$ /SKOU, 1965/. A Tl^+ hasonló hatásu, azonban mintegy 10-szer erősebb a K^+-nál. /BRITTEN és BLANK,1968/.

Az enzim rendszernek egy további nagyon jellegzetes tulajdonsága, hogy szivglikozidákkal specifikusan gátolható /SCHATZMANN, 1953; HOKIN és DAHL, 1972/, amely effektus intakt sejten

a membrán külső oldalára lokalizálódik, mivel ouabain intracelluláris injekciója nem depolarizálja a membránt. A szivglikozidák gátló hatása vagy az enzim rendszerhez való kötődésükben, vagy a Na^+ - és K^+-al szembeni relativ affinitás fokozásában áll /SCHATZMANN, 1965/.

SKOU /1957/ irta le először, hogy a szisztéma erőteljesen gátolható Ca^{2+}-al, továbbá, hogy intakt vörösvérsejt membrán aktiv transzportjának gátlása észlelhető, ha a Ca^{2+} az intracelluláris térben helyezkedik el.

Ujabban ezen enzim rendszert teszik felelőssé a Na:Na /GLYNN, 1968; GLYNN és HOFFMAN, 1971; GARAY és GARRAHAN, 1973/ és a K:K /GLYNN és mtsai 1970; 1971; SIMONS, 1974/ membránon keresztül történő kicserélődéséért is.

A Na^+ pumpa a membrán enzim aktivitásának függvénye, s attól függően, hogy a transzportált Na^+ és K^+ mennyisége egyenlő avagy különböző, lehet neutrális ill. elektrogén. Ha a pumpa több Na^+-t hajt ki a sejtből, mint amennyi K^+-t felvesz, ugy a pumpa aktivitása elektrogén és mint ilyen, direkt módon befolyásolja a membrán potenciál alakulását.

A továbbiakban a pre- és posztszinaptikus membránban jelen levő Na^+ - K^+ - aktiválta ATPáz szerepét tárgyaljuk a neuro--neuronális és a neuro-effektoriális transzmisszióban.

Az elektrogén Na pumpa felfedezésének története

USSING /1949/ idegroston végzett kisérletei vetik fel először az elektrogén Na^+-pumpa müködésének lehetőségét. HODGKIN /1951/ két évvel később diszkussziójában világosan utal a Na^+-pumpára, mely véleménye szerint fontos szerepet játszik a nyugalmi potenciál fenntartásában.

Nyugalmi körülmények között az intracelluláris térből kifelé irányuló Na^+ áram /current/ intenzitása pontosan megegyezik a belépő Na^+ mennyiségével. Ez magyarázza, hogy anyagcsere gátlók, melyek a Na^+ intracelluláris térben történő felhalmozódását eredményezik, erőteljesen csökkentik a kifelé irányuló Na^+ áramot. Ennek eredménye a depolarizáció. A Na^+ ionok belépését követi a K^+ ionok intracelluláris térből történő kiáramlása és a Cl^- ionok belépése, mely további depolarizációt eredményez. Ha a Na^+ pumpa aktivitása fokozódik, K^+ ionok lépnek be a nyugalmi potenciál megnő, majd az eredeti ionális megoszlás fokozatosan visszaáll. A Na^+ intracelluláris térből való kihajtása az eredeti érték fölé emeli a nyugalmi potenciált, mely HODGKIN szerint megmagyarázhatja a LORENTO DE NO /1947/ által észlelt anoxia utáni "overshoot"-t.

1952-ben LUNDBERG és OSCARSSON vizsgálták idegroston az anoxiát követő "overshoot"-t, normál ill. K^+ mentes közegben. A membrán potenciál az anoxia után 10 mV-val az eredeti érték

fölé emelkedett. Ez a membrán válasz K^+ mentes közegben elmaradt. HODGKIN és KATZ /1949/ tintahal óriás axon nyugalmi potenciálját a Goldman egyenlet alapján számitva azt találták, hogy az nagyon jól korrelál a mért nyugalmi potenciál értékével. Ezt az eredményt GRUNDFEST és mtsai /1954/ cáfolták meg először, akik óriás axonon a membrán potenciált elsősorban az elektrogén Na^+ pumpával és csak másodsorban az E_K-val magyarázták. HODGKIN és KEYNES /1955/ tintahal óriás axonon dolgozva a következő érdekes megfigyeléseket irták le:

1/ a Na^+-efflux és a K^+-influx hütésre csökken,

2/ a Na^+ kihajtása jelentősen csökkenthető a külső K^+ megvonásával,

3/ az anyagcsere gátlók lényegesen nem befolyásolják sem az akciós, sem a nyugalmi potenciált.

Később /1956/ ugyancsak a fenti szerzők irták le, hogy tintahal óriás axonjába fecskendezett Na^+ megemeli a membrán potenciált, melyet a megnövekedett aktiv Na^+ kiáramlással magyarázták. Diszkussziójukban 1:1-es kuplung arányt jelöltek meg, azaz a pumpa által minden egyes Na^+ ion kihajtása egy K^+ ion felvételével jár együtt.

Macska motoneuronon dolgozva COOMBS és mtsai /1955/ azt találták, hogy Na elektroforetikus injekciója után depolarizáció lép fel, amely a lecsökkent intracelluláris K koncentrációval van összefüggésben. 1o-2o perccel később viszont a nyugalmi potenciál

1o-15 mV-al megemelkedett. Ez a jelenség TEA intracelluláris adásával nem volt kiváltható. Véleményük szerint az elektrogén Na pumpa fokozott aktivitása okozta ezt a hiperpolarizációt.

RITCHIE és STRAUB /1957/ velőtlen idegroston tetanusz után jelentős hiperpolarizációt észleltek, amelyet a neutrálisnak tartott Na^+ pumpa müködésének tulajdonitottak. Konkluziójukban a jelentkező hiperpolarizációt a megmelekdett K^+ felvételével és ennek kapcsán a membrán külső oldalán helyileg lecsökkenő K^+ koncentrációval magyarázták, mivel a pumpa erős aktivitása folytán a membrán külső oldalán olyan mérvü a K^+ felvétel, hogy az a diffuziós viszonyok miatt a szervfürdőből pótlódni nem tud. CONNELLY /1959/ szerint a neutrális pumpa nem magyarázza meg a béka idegroston észlelt tetanusz utáni hiperpolarizációt. Tetanusz során ugyanis az intracelluláris térből való folyamatos K^+ vesztés nem engedi a Na^+-pumpa aktivitás fokozódás során a lokális K^+ vesztést, továbbá egyensulyi állapot jön létre a K^+ kiáramlás és felvétel között. Az ionális transzport-szisztéma CONNELLY szerint elektrogén, amelyet később STRAUB /1961/, továbbá RANG és RITCHIE /1968/ megerősitettek. Az irodalomban 196o. óta a pumpa elektrogenitására vonatkozóan egyre több és több bizonyiték lelhető fel, melyek szerint valószinüleg minden esetben, de legalábbis részben a pumpa elektrogén.

Általában a pumpa intenzitása arányos az intracelluláris Na^+ koncentrációval. A Na^+ sejten belüli koncentrációjának emel-

kedése fokozza a pumpa aktivitását. A pumpa aktivitása, mint arra már a fentiekben utaltunk a membrán ATP-áz aktivitásának függvénye. Ha meggondoljuk, hogy a membrán ATP-ázt intracellulárisan a Na^+ aktiválja, ugy egyértelmünek tünik az a feltételezés, hogy az intracelluláris Na^+ koncentráció emelkedése a pumpa aktivitás fokozódásához vezet.

A Na-pumpa fiziológiás feladata, hogy helyreállitsa az eltolódott ion egyensulyt, amely akkor jön létre, amikor egy akciós potenciált követően az intracelluláris Na^+ felszaporodik és a K^+ lecsökken. Az intracelluláris Na^+ aktiv kipumpálása a Na^+-pumpa segitségével többféle módon jöhet létre.

A neuron teória szerint funkcionálisan a szinapszis biztositja két sejt között az ingerület tovaterjedését. Amikor az idegroston tovaterjedő idegimpulzus eléri a végkészüléket, egy kémiai anyag, a transzmitter /átvivő anyag/ szabadul fel a Ca^{2+} jelenlétében /l. VIZI, 1975/. A szinapszis preszinaptikus membránjából felszabaduló nagy mennyiségü transzmitter anyag a szinaptikus résen áthalad és a posztszinaptikus membrán receptorain fejti ki hatását. Az eddigi elképzelések nem adtak választ arra az egyszerü kérdésre, hogy a transzmitter anyag h o g y a n és m i l y e n mechanizmus segitségével jut át a morfológiailag és funkcionálisan egyaránt jól meghatározható preszinaptikus membránon. Korábbi munkáinkban kimutattuk /PATON, VIZI és ZAR, 1971; VIZI 1972; 1974b; 1975a,b/, hogy a

Na^+ - K^+ - aktiválta ATP-áz enzim gátlása az ACh, illetőleg a NA felszabadulásához vezet. Ca^{2+}-ról kimutatták /SKOU,1957; ALDRIDGE, 1962; SOMOGYI és VINCZE,1962; SOMOGYI, 1964 a,b/, hogy az egyik legerősebb gátlója a membrán ATP-áz enzimnek, így nagyon plauzibilisnek látszik az a feltételezés, hogy fiziológiás feltételek között a Ca^{2+} belépés a membrán ATP-ázt rövid időre /néhány msec/ gátolja és ez teszi lehetővé a transzmitter membránon történő áthaladását /VIZI, 1972; 1975a,b/.

A neurokémiai transzmisszió hatékonysága azonban nem csak a preszinaptikus membránból felszabaduló transzmitter anyag mennyiségétől függ, hanem függ a posztszinaptikus membránon végbemenő folyamatoktól is. A szinapszisban végbemenő neurokémiai ingerületátvitel hatékonysága tehát függ:

1/ a felszabadult transzmitter mennyiségétől, a felszabadulás sebességétől;

2/ a szinaptikus rés nagyságától /receptorális szinten a transzmitter anyag koncentrációját befolyásolja/;

3/ a posztszinaptikus membrán /effektor sejt/ állapotától, a recepciótól;

4/ az akciós potenciál generalizálásához szükséges feltételektől. Ez az ingerület tovavitele szempontjából fontos. A Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz megtalálható mind az ingerületet vezető axonnak, a sejt testnek és a végkészüléknek membránjában, mind a fiziológiai működésben végrehajtó szerepet játszó szövetek /izom/ membránjában.

6.1. A preszinaptikus membrán Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz enzimjének szerepe a transzmitter felszabadulásában

A transzmitter anyag, amely az elektromos jelenségek kémiai átvitelében játszik fontos szerepet, preszinaptikusan helyezkedik el. Ez az elrendeződés is biztositja az ideg ingerület egyirányu vezetését. A szinapszis müködését a diódához lehet hasonlitani; a transzmitter azt a funkciót tölti be, amit az elektron: felelős az egyenirányitásért.

6.1.1. Az ACh felszabadulás, mint a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz aktivitás gátlásának eredménye.

Korábbi munkáinkban /VIZI, 1972; 1973; 1974b; 1975a,b; PATON, VIZI és ZAR, 1971/ kimutattuk, hogy azok a kisérleti feltételek, amelyek a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz enzim gátlásához vezetnek ACh felszabadulást okoznak a centrális és perifériás kolinerg ideg végkészülékből. POULSEN /1974/ ouabain hatására észlelt ACh felszabadulást macska szubmandibularis paraszimpatikus idegéből. Ouabain, PCMB Na^+- és K^+-hiány, N-etilmaleimid /NEM/, Ca^{2+} helyettesitése Ba^{2+}-al, etakrinsav, amelyek valamennyien a membrán ATP-ázt szignifikánsan gátolják, fokozták az ACh felszabadulását a végkészülékből /13. és 14. táblázat/. Ezekből a kisérletekből azonban még nem lehet azt a következtetést levonni, hogy a membrán ATP-áz aktivitás gátlása per se lenne az ACh felszabadulás oka. A membrán ATP-áz

13. táblázat

Na^+-K^+-aktiválta membrán ATP-áz gátlás ACh-t felszabaditó hatása patkány izolált agykéreg szeletben.

KEZELÉS	ACh felszabadulás pmol/g.min, S.E.M. kontroll	kezelt*	P
Na^+-hiány /3/	32.2 ± 2.1	92.3 ± 22.7	< 0.01
Ouabain/ $2x10^{-5}$M/ /3/	34.4 ± 9.8	218.3 ± 58.2	< 0.01
Ouabain / " / + Ca-hiány, EGTA /mM/ /3/	35.6 ± 4.0	164.8 ± 9.8	< 0.01
Ouabain /$2x10^{-5}$M/ + /4/ TTX /1 uM/	23.8 ± 5.6	95.6 ± 23.1	< 0.01
p-chloromerkuribenzoát /PCMB/, $5x10^{-4}$M /3/	20.5 ± 1.6	72.5 ± 13.2	< 0.01
N-aethylmaleimid, $5x10^{-3}$M /6/	25.3 ± 3.1	87.4 ± 7.5	< 0.01
NaF, $4x10^{-3}$M /6/	38.8 ± 2.8	79.1 ± 7.1	< 0.01
Quinidin, 10^{-3}M /4/	40.9 ± 5.2	154.2 ± 10.3	< 0.01
Etakrinsav, 10^{-4}M /8/	24.8 ± 1.6	85.4 ± 4.2	< 0.01
Chlorpromazin, 10^{-5}M /4/	22.1 ± 1.5	92.4 ± 8.5	< 0.01
Ba^{2+}, $2,5x10^{-3}$M + Ca^{2+}-hiány /3/	30.0 ± 3.2	65.4 ± 3.9	< 0.01
Cu^{2+}, $1.5x10^{-4}$M /8/	33.3 ± 4.8	59.0 ± 17.2	< 0.05

* Az ACh felszabadulást 60 perc előinkubálás után 10 percenként mértük a vegyület adása után 30-70 percig és a legmagasabb /10 perc alatt mért/ felszabadulási sebességet vettük figyelembe a táblázat összeállitásánál. Krebs oldat, ezerin szulfát /2 ug/ml/. Na^+-hiányos oldatnál az összes Na^+-t sucrossal helyettesitettük, a HCO_3^--t $KHCO_3$ formájában tettük az oldatba, a KCl-t és a KH_2PO_4-t elhagytuk. Báriumos oldatnál a $CaCl_2$-t $BaCl_2$-al, a $MgSO_4$-t $MgCl_2$-al helyettesitettük. Cu^{2+} adásánál $CuSO_4$-t használtunk. Zárójelben a kisérletek száma. Krebs oldat. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 95 % O_2+ 5 % CO_2. Szervfürdő: 2 ml. 37°C. Cortex szeletek sulya: 60-90 mg.

14. táblázat

Na^+-K^+-aktivált membrán ATP-áz gátlás ACh-t felszabadító hatása patkány agy különböző részeiben.

	Acetilkolin		
	tartalom, $nmol.g^{-1}$ /S.E.M./	felszabadulás pmol/g.min /S.E.M./	
		kontroll	+ ouabain / $2x10^{-5}$ M/
Cortex	4.82 ± 0.55 /4/	18.3 ± 1.3 /6/	210.6 ± 13.4 /10/
Bazális ganglion	8.62 ± 1.03 /4/	24.6 ± 3.1 /8/	97.1 ± 16.5 /4/
Cerebellum, cortex	1.4 ± 0.06 /5/	16.6 ± 0.58 /4/	23.5 ± 1.05 /4/
" , n.interpositus	-	7.0 ± 3.1 /3/	13.4 ± 2.5 /3/

Patkány agy kéregnél és bazális ganglionnál a gyüjtési idő: 10 perc; cerebellumnál 30 perc. Izolált szeletek összsulya 100-200 mg. Ouabain kezelésnél 50-80 percig mértük a felszabadulást és a legnagyobb mért felszabadulási sebességet tüntettük fel a táblázatban. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. Zárójelben a kisérletek száma.

gátlása olyan változásokat is létrehoz, a preszinaptikus membránban, amelyek maguk is részben, vagy teljesen felelőssé tehetők az ACh felszabadulásért. A membrán ATP-áz gátlása a következő változásokat hozhatja létre:

a/ depolarizációt,

b/ intracelluláris Na^+ emelkedést,

c/ fokozott Ca^{2+} belépést,

d/ az ACh felvételének gátlását,

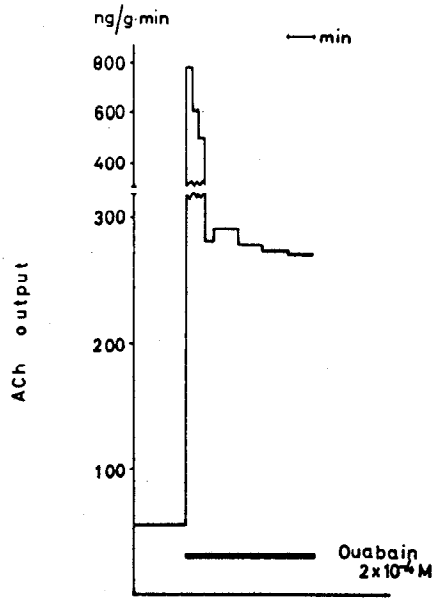
e/ az axon tüzelésének fokozódását.

6.1.1.1. Depolarizáció

LILEY /1956/ neuromuszkuláris szinapszisban azt találta, hogy a miniatür véglemezpotenciálok frekvenciája, amely az ACh felszabadulásnak indirekt jele, a depolarizáció mértékétől függött. Kisérleteinkben /lásd. 7. ábra a,b/ 47.3 ill. 24 mM K-al depolarizáltuk a véglemezt és ACh szabadult fel. Ez a felszabadulás teljesen gátolható volt ha a Krebs oldatból a Ca^{2+} hiányzott és ha 1 mM EGTA pufferrel biztositottuk, hogy a Ca^{2+} koncentráció ne legyen magasabb 10^{-10} - 10^{-9} M-nál. Mivel a membrán ATP-áz bénitók Ca^{2+} hiányban is képesek voltak ACh-t felszabaditani /VIZI, 1972; 1975b/, igy kizárható az a lehetőség, hogy a membrán ATP-áz bénulása következtében létrejövő nyugalmi potenciál csökkenés /depolarizáció/ volna az ACh felszabadulás oka.

6.1.1.2. Intracelluláris Na^+ emelkedése.

BIRKS, /1963/ BIRKS és COHEN /1968/ szerint az intracelluláris Na^+ emelkedése szoros összefüggésben van az ACh felszabadulással. Digitálisz glikozidák, amelyek gátolják a membrán ATP-ázt, fokozták a neuromuszkuláris junkcióban a miniatür véglemezpotenciálok frekvenciáját /BIRKS,1963; ELMQUIST és FELDMAN,1965; BIRKS és COHEN, 1968; BAKER és CRAWFORD, 1975/, amely tulajdonképpen a nyugalmi ACh felszabadulás indirekt bizonyitéka. Na^+ - hiányos Krebs oldatban az Auerbach plexus /PATON, VIZI és ZAR, 1971/, valamint az agykéreg végkészülékeiből /VIZI, 1972; 1975b/ is észleltünk szignifikáns ACh felszabadulást, amely Ca^{2+}-hiányban is tapasztalható volt. Ilyen kisérleti körülmények között az intracelluláris Na^+ emelkedése semmi esetre sem várható, bár a membrán ATP-áz gátolva van. Hogy a membrán ATP-áz bénulás nem az intracelluláris Na^+ megemelésével hoz létre ACh felszabadulást, bizonyitja még az a tény is, hogy ha az extracelluláris Na^+-t teljesen Li^+-ra cseréljük ki, ugy is az ACh felszabadulás szignifikáns emelkedése tapasztalható /VIZI és mtsai, 1972; VIZI, 1974a/. Az a tény, hogy az ouabain alkalmazása után / 44.ábra/ 15 mp-en belül szignifikánsan fokozódik az ACh felszabadulása, szintén azt bizonyitja, hogy az ACh felszabadulás oka a membrán ATP-áz gátlása és nem az intracelluláris Na^+ felhalmozódásának következménye, hiszen ilyen rövid idő alatt a Na^+ nem tud felszaporodni. Bár meg kell jegyezni, hogy a végkészülék felszinének és térfogatának aránya nagy, igy



44. ábra.

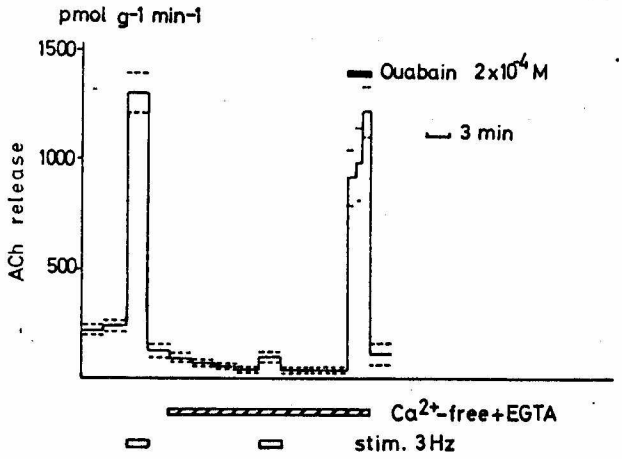
Ouabain ACh felszabadulást okozó hatása. Tengeri malac hosszanti simaizom /Auerbach plexus/ preparátum. Krebs oldat, 95 % O_2+ + 5 % CO_2. ACh felszabadulást PATON és VIZI /1969/ módszerével mértük. Figyeld meg, az ouabain adása után azonnal /15 mp/ jelentkező ACh felszabadulást. VIZI /J.Physiology, 226: 95-117, 1972/ közleményéből ujra rajzolva.

igy gyors ionális változások képzelhetők el. BIRKS elképzelése ellen szólnak továbbá KATZ és MILÉDI /1967/, valamint RAHAMIMOFF /197o/ kisérletei, akik azt találták, hogy az extracelluláris Na^+ teljes kicserélése Ca^{2+}-ra sem befolyásolja a végkészülék direkt deporalizációjának ACh-t felszabadiót hatását. Tehát teljes Na^+ hiányban, amikor az intracelluláris Na^+ felszaporodása elképzelhetetlen, ugyancsak van ACh felszabadulás.

6.1.1.3. Fokozott Ca^{2+} belépés.

Általánosan elfogadott tény, hogy a transzmitter felszabaduláshoz /l. RUBIN 197o/ a külső oldatban kálcium jelenléte szükséges. De a vasopressin vagy más neurohormonok /DOUGLAS 1966/ felszabadulásához is elengedhetetlenül szükséges a kálcium jelenléte.

Olyan kisérleti feltételek mellett, amikor a Na^+-K^+ aktiválta ATP-ázt gátoljuk /ouabain, PCMB, Na^+-hiány, NEM, K^+-hiány, stb./ az intracelluláris Na^+ felszaporodik és ez egy fokozott Ca^{2+} influxot eredményez. Valóban kimutatták, hogy az ouabain megnöveli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját cortex szeleteken /OKAMOTO és QUASTEL, 197o; SWANSON, 1968/ és izolált szinaptikus végkészüléken /BLAUSTEIN és WEISMANN, 197o/.



45. ábra

Ouabain ACh felszabaditó hatása Ca^{2+}-mentes kisérleti feltételek között. Tengeri malac izolált hosszanti simaizom-Auerbach plexus. Krebs oldat, 37°C, 95 % O_2 + 5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 3 kisérlet átlaga. S.E.M.

Igy jogosan merül fel az a probléma, hogy a membrán ATP-ázt gátlók alkalmazása esetén a felfokozott Ca^{2+} belépés lenne az ACh felszabadulás oka. Ha a membrán ATP-áz gátlás per se szabaditja fel az ACh-t, akkor nyilvánvalóan az ATP-áz bénitóknak Ca^{2+} hiányában is ACh felszabadulást kell okozniuk. A 45. ábra mutatja, hogy ouabain Ca^{2+} hiányban is megemeli az ACh felszabadulást. Egyébként a Ca^{2+} megvonás a Na^{+}hiány ACh felszabadiót hatását sem gátolja meg az Auerbach-plexus kolinerg végkészülékeiből /PATON, VIZI és ZAR, 1971/. Meg kell azonban jegyezni, hogy Ca^{2+} hiányos oldatban az ouabain kevesebb ACh-t szabaditott fel /1. 13. táblázat/. Minden valószinüség szerint a felfokozott Ca^{2+} belépés additiv módon fokozza az ACh felszabadulást. Egyébként digoxin Ca^{2+}-hiányban és Mg^{2+} jelenlétében is megemeli a miniatür véglemez potenciál frekvenciáját /BIRKS és COHEN, 1968/.

Ezek az adatok azt bizonyitják, hogy ha membrán ATP-áz bénitókat, vagy olyan kisérleti feltételeket alkalmazunk, amikor a Na^{+}-K^{+}-aktiválta ATP-áz gátolva van, nem szükséges az extracelluláris Ca^{2+} jelenléte az ACh felszabaduláshoz.

Természetesen felmerül az a lehetőség is, hogy pl. ouabain hatására a mitochondriumokból szabadul fel a Ca^{2+}, megnövelve ezáltal az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját s ez az ACh felszabadulás oka. Korábbi kisérleteinkben /VIZI, 1972/ kimutattuk, hogy KCN /10^{-3}M/ vagy DNP /$6x10^{-4}$M/ csak kismértékben emelte meg az ACh felszabadulását, bár a mitochondriumokból jelentős mennyiségü Ca^{2+}-t szabaditanak fel /BAKER és mtsai,1967/.

Izolált patkány agykéregből DNP adása után 1o perccel az ACh felszabadulás 34.o6 pmol/g.min-ről 44.69 pmol/g.min-re emelkedett /VIZI, 1972/. Ez a növekedés /23,8 %-os/ lényegesen kisebb, mint amit membrán ATP-áz gátlókkal el lehet érni /1oo-4oo %/. FISCHER és mtsai /1974/ kisérleteikben izolált patkány agykéreg szeleten DNP hatására 5o %-os emelkedést mértek. BEANI és mtsai /1966/ viszont, a DNP-t hatástalannak találták m.e.e.p. frekvenciát mérve, ami azt jelenti, hogy nem fokozta az ACh felszabadulását a neuromusculáris junkcióban. Egyébként MILEDI és SLATER /1966/ azt észlelte, hogy Ca^{2+}-mentes oldatban tintahal óriás axonjából nem szabadul fel transzmitter ha Ca^{2+}-t adtak intracellulárisan. Ugyanakkor igen kis mennyiségü Ca^{2+} lokális extracelluláris alkalmazásakor a szinapszis ismét müködni kezdett. Néhány évvel később viszont MILEDI /1973/ közölte, hogy Loligo vulgaris ganglion preparátumán tetrodotoxin jelenlétében Ca^{2+} intracelluláris adása még az extracelluláris Ca^{2+} megkötése /La^{3+} vagy Mn^{2+}/ esetén is néhány tized milivoltos depolarizációt okoz a posztszinaptikus membránon, amely valószinüleg a transzmitter felszabadulás jele. Ez azt jelentené, hogy az intracelluláris Ca^{2+} a bazális membrán belső felszinén is olyan változásokat tud létrehozni, amelyek transzmitter felszabaduláshoz vezetnek. E kisérlet sorozatban azonban nem lehetett kizárni annak lehetőségét, hogy a Ca^{2+}-pipetta intracelluláris bevezetésénél a membránnak egy olyan sérülése jön létre, amely lehetővé teszi, hogy a Ca^{2+} kiszökjön /leakage/ és igy az

intracellulárisan adott Ca^{2+} tulajdonképpen a membrán külső részén gátolná a membrán ATP-ázt, ami azután transzmitter felszabadulást eredményezne. Természetesen az is lehetséges, hogy a membrán ATP-áz nem tesz különbséget a kivülről befelé, vagy belülről kifelé haladó Ca^{2+} között. Bárhonnan is jön a Ca^{2+} /fiziológiásan kivülről befelé/ az gátolni képes a membrán ATP-ázt, melynek eredménye ACh felszabadulás.

Véleményünk szerint fiziológiás körülmények között a Ca^{2+} játsza azt a szerepet, amit a fenti kisérleti körülmények között a membrán ATP-áz bénitók.

6.1.1.4. <u>ACh felvételének gátlása.</u>

A neurokémiai transzmitter anyagoknak az elbontó enzimen kivül a másik jelentős inaktivációs mechanizmusa a szöveti felvétel /uptake/. Noradrenalin esetében ezt egyértelmüen bizonyitottnak vehetjük /l. IVERSEN, 1967/. A NA-nak nincs olyan elbontó enzimje, amely extraneuronálisan helyezkedne el és rendkivül nagy aktivitással bontaná le a felszabadult NA-t. A katecholoximetiltranszferáz /COMT/ bár extraneuronálisan helyezkedik el, de nagyon lassan bontja a NA-t, igy fiziológiásan a gyors felvétel játszik döntő szerepet a NA inaktiválásában. Ezzel szemben viszont az ACh végkészülékbe való visszavétele nem jelentős. Azonban a pre- és posztszinaptikusan elhelyezkedő kolineszteráz gyorsan elbontja a felszabadult ACh-t kolinra és acetátra és a kolin biológiailag már inaktiv. A vég-

készülék kolint vesz fel mely az ACh reszintézisében játszik szerepet. LIANG és QUASTEL /1969/ patkány agykéreg szeleten kimutatták, hogy az ouabain egy nem kompetitiv gátlója az ACh felvételnek. Amikor a felszabadult ACh mennyiségét mérjük, akkor kolineszteráz bénitót - ezerint - is alkalmazunk. Ezerin maga is gátolja /MANN és mtsai, 1939; ELLIOT és HENDERSON, 1951/, az egyébként nem jelentős ACh felvételt, igy nem volna helyes arra a következtetésre jutni, hogy a membrán ATP-áz gátlás esetén azért kapunk fokozott ACh felszabadulást az extracelluláris térben, mert a felvétel gátolva van. 2,4-dinitrofenol, mely szintén gátolja az ACh felvételét /LIANG és QUASTEL, 1969/ nem fokozta lényegesen az ACh felszabadulását /VIZI, 1972; FISCHER és mtsai, 1974/.

6.1.1.5. Axonális tüzelés fokozódása.

A membrán ATP-áz bénitása megemeli a Na^+ intracelluláris koncentrációját, ami viszont, ha átmenetileg is, az axonális tüzelés fokozódását hozhatja létre. A kérdés most már az; vajon a fokozott ACh felszabadulásnak, - amelyet membrán ATP-áz bénitás esetén észlelünk, - nem a fokozott axonális tüzelés-e a kizárólagos oka. Ez a kérdés eldönthető volt tetrodotoxinnal, amely a Na^+ belépés gátlásával az idegvezetést teljesen fel tudja függeszteni /NARAHASHI és mtsai, 1964/. Ouabain tetrodotoxin jelenlétében is ACh-t szabadit fel,

bár a felszabadulás kisebb, mint tetrodotoxin nélkül /VIZI, 1974b/. Ez azt jelenti, hogy a végkészülék membrán ATP-áz aktivitásának gátlása által létrehozott ACh felszabaduláson kivül, valószinüleg az axonok tüzelése által kiváltott ACh felszabadulás is hozzájárul a mért transzmitter felszabaduláshoz. A Na^+-mentes közeg ugyancsak emelte /3oo %-os/ az ACh felszabadulást, ahol viszont az idegi vezetés már teljesej gátolt s igy hatása természetszerüleg nem érvényesülhet. A membrán ATP-áz azonban bénitva van, tehát az észlelt ACh felszabadulás ennek tulajdonitható. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a membrán ATP-áz gátlása - bár valószinüleg csak átmenetileg - az axonális tüzelés fokozódásával egy addicionális ACh felszabadulást eredményez, de a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz gátlása per se is létrehoz ACh felszabadulást. A Na^+-mentes oldatban észlelt ACh felszabadulás kizárólagosan a membrán ATP-áz bénulásával magyarázható.

6.1.1.6. ACh és NA felszabadulás, mint a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz és a hozzátartozó K^+-függő foszfatáz enzimek aktivitás gátlásának eredménye.

Előzőekben bizonyitottuk, hogy a membrán ATP-áz bénitók által okozott ACh felszabadulás jelentős részét nem a membrán ATP-áz enzim gátlása következményeképpen fellépő depolarizáció, intracelluláris Na^+ emelkedés, fokozott Ca^{2+}-belépés, fokozott axonális tüzelés váltja ki. Igy plauzibilis az a feltételezés, hogy az enzim gátlása per se az oka a fokozott ACh

felszabadulásnak. Felmerül a kérdés mi történik fiziológiás körülmények között ? Az akciós potenciál az idegszövetben a Na^+-belépése mellett Ca^{2+}-belépést is okoz. A Ca^{2+}-ról viszont patkány agykéreg szeleten kimutatták, /SOMOGYI, 1964a, b; SOMOGYI és VINCZE, 1962/, hogy 1oo mM Na^+, 2o mM K^+ és 5 mM Mg^{2+} jelenlétében koncentrációtól függően gátolja a Na^+-K^+-aktiválta ATP-ázt. 5x1o^{-6}M koncentrációban a Ca^{2+} kb. 5o %-os gátlást okoz. Ma már egyértelmüen bizonyitottnak vehető, hogy az idegszövet depolarizációja /HODGKIN és KEYNES, 1957/, az akciós potenciál /HODGKIN és KEYNES, 1957/ jelentős Ca^{2+}-influxot eredményez. Igy feltételezzük, hogy fiziológiás körülmények között a Ca^{2+} áthatolva a bazális membránon átmenetileg gátolja a Na^+-K^+-aktiválta membrán ATP-ázt és a bazális membrán egy igen rövid időtartamra permeabilissá válik, és az ACh az intracelluláris térből az extracelluláris térbe jut, ahol eleget tud tenni transzmitter funkciójának. HARVEY és McINTOSH már 194o-ben felismerte, hogy extracelluláris Ca^{2+} mindenképpen szükséges az ACh felszabadulásához. KATZ és MILEDI /1967/ igazolta, hogy bár a végkészülék depolarizálható Ca^{2+} hiányában, de transzmitter nem szabadul fel. Calcium jelenlétében az akciós potenciál után néhány ms. mulva kezdődik csak az ACh felszabadulása.

BAKER és CRAWFORD /1975/ béka sartorius-ischiadicus preparátumon miniatür véglemez potenciálokat regisztrálva ugyancsak azt találta, hogy a membrán ATP-áz gátlása /ouabain, K^+-hiány/

még Ca^{2+} hiányos oldatban is fokozza az ACh felszabadulását. Egyetértve azzal a feltételezésünkkel, hogy a Na^{+}-pumpa gátlása kulcs szerepet játszik az ACh felszabadulásában, mint oki tényezőt, az intracelluláris K^{+} lecsökkenését emliti. Nem kétséges, ez valóban a Na^{+}-pumpa gátlásának eredménye, de oki szerepe könnyen kizárható azzal, miszerint nem valószinü, hogy az ACh felszabaditásában szerepet játszon egy olyan tényező, amely egyébként az ACh szintézisének gátlásához vezet /PATON és mtsai, 1971/, nevezetesen az intracelluláris K^{+} lecsökkenése. Ismeretes, hogy magas intracelluláris K^{+} koncentráció kell az ACh szintézisében résztvevő acetil-CoA--szintetáz aktivitásához /WEBSTER, 1966/, valamint a piruvátkináz müködéséhez /TAKAGAKI, 1968/. Ugyancsak cáfolja az intracelluláris K^{+} hiány szerepét az a kisérleti tény is, hogy ha K^{+}-t Rb^{+}-al helyettesitjük ACh nem szabadul fel, bár az intracelluláris K^{+} koncentráció alacsony. Ez a tény viszont támogatja azt az elképzelésünket, hogy a membrán ATP-áz aktivitása felelős az ACh felszabadulásért. Rb^{+} helyettesiteni tudja a K^{+}-ot az enzim aktiválásában /BAKER és CONNELLY, 1966/, igy nem gátlódik az ATP-áz és nem szabadul fel ACh.

GARCIA és KIRPEKAR /1973/ kimutatta macska izolált lép szeleten, hogy Na^{+}-hiányos oldatban a NA felszabadulás fokozódik. A NA a végkészülékben a vezikulában dopamin- -hidroxilázzal, ATP-al és chromogranin-A-val együtt helyezkedik el /SMITH és WINKLER, 1972/. Mivel a NA felszabadulással egyidejüleg a

szerzők nem észleltek dopamin- -hidroxiláz enzim felszabadulást, igy a Na^+-hiány NA-t felszabaditó hatását a raktározást befolyásoló gátló hatással magyarázták, és igy nem tartották a felszabadulás ezen formáját a fiziológiáshoz hasonlithatónak. Exocitózisnál a NA-al együtt fent emlitett alkotórészek is kiürülnek. A kérdés azonban az, hogy vajon fiziológiás körülmények között az exocitózissal szabadul-e fel a NA ?
LASTOWECKA és TRIFARÓ /1974/ viszont azt találta, hogy a Na^+-megvonás esetén fellépő NA felszabadulás ATP és dopamin- -hidroxiláz ürüléssel jár együtt mellékvese velőállományban. A NA /dopamin-β-hidroxiláz és a NA/ ATP arány ugyanolyan volt, mint a granulában. Ez azt igazolja, hogy a Na^+-megvonásra jelentkező NA felszabadulás exocitózissal kapcsolatos. Kis molekula sulyu citoplazmatikus fehérje és tejsav-dehidrogenáz nem volt a perfuzátumban, ami azt igazolja, hogy nincs sejtkárositó hatása Na^+-megvonásnak.
Kimutattuk, hogy a noradrenerg transzmisszióju patkány vas deferensből Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz bénitó ouabain hatására C^{14}-NA szabadul fel /VIZI, 1974b/, akár volt Ca^{2+} az inkubáló oldatban akár nem.
LASTOWECKA és TRIFARÓ /1974/ kisérleteiben a Na^+-hiány akkor is felszabaditotta a NA-t, amikor Ca^{2+} nem volt az oldatban. Ezek a kisérleti eredmények arra utalnak, hogy az ACh-hoz hasonlóan NA-nál is a bazális membrán ATPáz enzimjének gátlása kulcs szerepet játszik a transzmitter felszabadulásában. Fiziológiás

körülmények között a belépő Ca^{2+} gátolná a membrán ATP-ázt és ez tenné lehetővé a NA felszabadulását /VIZI,1974b/. A Ba^{2+} jobban fokozza a catecholaminok szekrécióját mint a Ca^{2+} /DOUGLAS és RUBIN, 1963; 1964/, a Ba^{2+} viszont jobban is gátolja a membrán ATP-ázt, mint a Ca^{2+}, és valószinüleg ennek tulajdonitható, hogy hatására az ACh /PATON és mtsai, 1971/ és NA felszabadulása intenzivebb.

6.1.1.7. ACh felszabadulás humán izolált agykéreg-szeletből membrán ATPáz gátlás hatására.

A fiziológus, a farmakológus állat kisérletei során tulajdonképpen modelezni próbálja az emberi szervezet funkcióit. Azonban vannak esetek amikor az emberi szervezetből, főleg mütétek során nyert preparátumokon lehet kisérletezni. Igy indirekt emberi extrapolált tudományos következtetések helyett rögtön direkt választ lehet kapni a feltett kérdésre. Meningeoma, gliobastoma és astrocytoma miatt végzett agymütétek során a behatolás helyén ép szürke állományhoz jutottunk. A szövet darabokat, kivétele után rögtön szobahőfoku /22°C/ karbogénnel átáramoltatott Krebs oldatba tettük. 3o percen belül 2ml-es szervedényben 37°C-on a kisérleteket megkezdtük. A szövet darabok sulya 4o-13o mg között változtak. A diffuziós viszonyok megjavitása miatt a kéreg darabokat 2-4 mm vastag szeletekre vágtuk. Ezerin szulfát /2 ug/ml / jelenlétében mértük a felszabaduló ACh mennyiségét. McINTOSH és PERRY /195o/ módszerével az ACh tartalmat is megmértük.

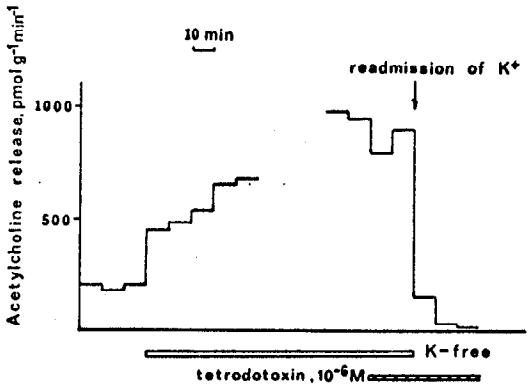
Akár csak patkány izolált agykéreg szeletből, humán szürke állomány végkészülékeiből is ACh szabadul fel ouabain hatására. $2x10^{-5}$M ouabain hatására a nyugalmi felszabadulás 7.02 ± 1.72 pmol/g.min-ről 45.4 ± 7.5 pmol/g.min-re emelkedett. Az emelkedés szignifikáns, $p < 0.001$. Feltünő, hogy patkány agykéreg szeletből is kb. hatszoros emelkedést váltott ki az alkalmazott koncentrációju ouabain /lásd a 13. táblázat adatait/. Az ACh tartalom 719.8 ± 56.1 pmol/g volt.

Ezzel a kisérlettel bebizonyosodott, hogy a membrán ATPáz bénitása emberi agykéreg végkészülékeiből is fokozza az ACh felszabadulását.

6.1.2. Membrán ATPáz aktivitás fokozódása és az ACh felszabadulás gátlása

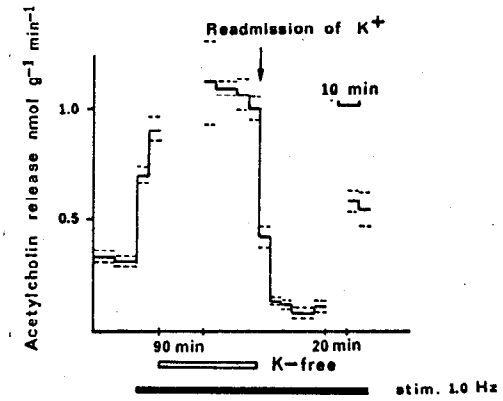
Az eddigiekben azt bizonyitottuk, hogy ha a membrán ATPáz gátolva van, akár Ca^{2+}-al, akár membrán ATP-áz bénitókkal, ACh szabadul fel a végkészülékekből. Magától értetődő, hogy a membrán ATPáz izgalmának viszont az ACh felszabadulás csökkenéséhez kell vezetnie.

Számos szerző /RANG és RITCHIE, 1968; BOLTON, 1973/ leirta, hogy tartós K^+-megvonás után a K^+-t visszaadva aránylag tartós izgalma jön létre a Na^+-pumpának, amely elektrogén hiperpolarizációt okoz. Mivel K^+-hiányban - ellentétben a Na^+-megvonással - ingerelni is lehet az ideget, igy egy kitünő lehetőség adódott, hogy tanulmányozzuk a Na^+-pumpa fokozott aktivitásának a hatását az ingerléssel kiváltott ACh felszabadulásra. Tengeri malac



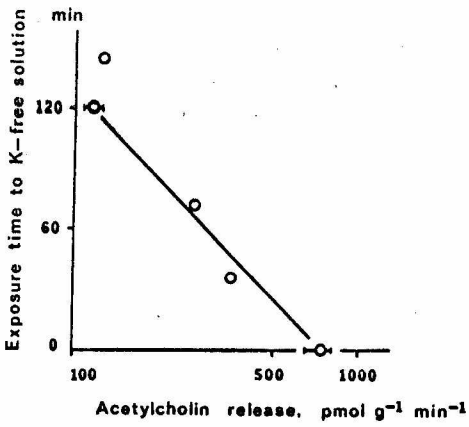
46. ábra

K^+-hiány ACh felszabaditó hatása tetrodotoxin jelenlétében. Visszaadott K^+ ACh felszabadulást gátló hatása. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom /Auerbach plexus/ preparátum. Krebs oldat, 95 % O_2 + 5 % CO_2. ACh felszabadulást PATON és VIZI /1969/ módszerével mértük. Figyeld meg, hogy TTX jelenlétében K^+ megvonás növeli az ACh felszabadulást. K^+ visszaadása után ACh felszabadulás csökken.



47. ábra

K-visszaadás ACh felszabadulást gátló hatása K-mentes Krebs oldatban /9o perc/ tartott Auerbach plexuson. Tengeri malac izolált hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátum. Ezerin szulfát, 2 ug/ml. 95 % O_2 + 5% CO_2. "Field"-ingerlés: 1Hz, 1ms; 1oV/cm.



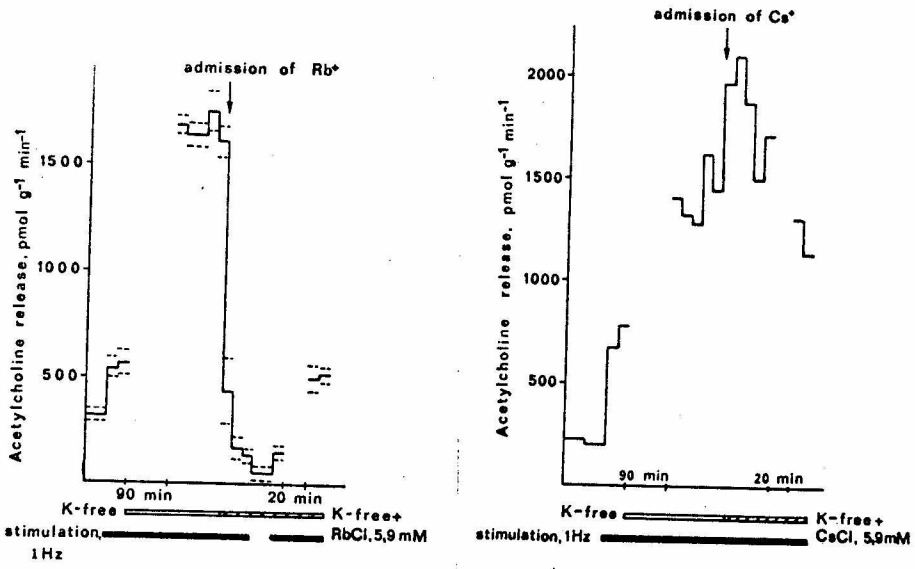
48. ábra

K-visszaadás ACh felszabadulást gátló hatásának függése a K-megvonás időtartamától. A K-visszaadás után elért legalacsonyabb felszabadulási sebesség lett figyelembe véve. Egyébként lásd a 47. ábra szövegét.

hosszanti simaizom-Auerbach plexus /PATON és VIZI, 1969/ preparátumán vizsgálva a kérdést azt tapasztaltuk, hogy a K^+-megvonás hatására szignifikánsan megnőtt az ACh felszabadulás 189.9 pmol/g.min-ről 912.5 pmol/g.min-re /46. ábra/. 9o perc után a K visszaadására a felszabadulás gyorsan lecsökkent 38.8 pmol/g.min-re. Mint a 46. ábrán is látható tetrodotoxin /10^{-6}M/ nem befolyásolta a K-megvonás ACh felszabaditó hatását, ami arra utal, hogy a K-hiány hatásában axonális tüzelés fokozódása nem játszik szerepet. K-megvonás az ingerléssel kiváltott ACh felszabadulást is fokozta /47. ábra és 15. táblázat/. 5,9mM K visszaadására viszont a felszabadulás 1112.2 ± 271.8 pmol/g. min-ről gyorsan 13o.o ± 12.4 pmol/g.min-re csökkent /47. ábra/.

A csökkenés szignifikáns, $p < 0.01$. A csökkenés csak átmenetinek bizonyult és nem tartott tovább, mint 25-50 perc. A csökkenés mértéke attól függött, hogy mennyi ideig tartottuk K-mentes oldatban az Auerbach plexust /48. ábra/. 100 percnél hiába tartottuk tovább a preparátumot K-mentes oldatban a K-visszaadásra bekövetkező gyors csökkenés és annak időtartama nem fokozódott tovább. Hasonló megfigyelést közölt RANG és RITCHIE /1968/ vagus izolált C roston, ahol a nyugalmi potenciál változását tanulmányozták és megállapitották, hogy K-megvonás után visszaadott K a nátrium pumpa aktivitásának extrém foku fokozódásához vezet. BOLTON /1973/ is hasonló következtetésre jutott simaizmon. Igen érdekes, hogy izolált cortex szeleten nem észleltünk ACh fokozódást K-megvonás hatására: 60 percig tartó K megvonás hatására az ACh felszabadulás 24.5 ± 1.8 pmol/g min-ről 29.7 ± 5.3 pmol/g min-re emelkedett /$p > 0.05$; n=4/. Ebben az esetben valószinüleg arról van szó, hogy a K-nak a fürdőből való megvonása még nem vezet az intracelluláris tér K-koncentrációjának teljes lecsökkenéséhez, ami viszont elengedhetetlen feltétele a membrán ATPáz gátlásának. Az izolált agykéreg szeleten, bármily vékonyra is van az vágva /0.2-0.4 mm/, a fürdővel direkt módon csak a legszélső rétegek érintkeznek és megfelelő diffuziós viszonyok csak itt vannak biztositva. A tengeri malac ileumának hosszanti simaizom - Auerbach plexus preparátuma ebből a szempontból egyedülálló készitmény: az extracelluláris tér praktikusan megegyezik a szervfürdő oldatával. Egyébként

velünk hasonló nehézségbe ütközött KEYNES /1954/ és BIRKS és COHEN /1968/ is. Elektrofiziológiailag vizsgálva a K megvonás hatását nem észlelték a m.e.p.p.-ek frekvenciájának fokozódását. Ugyanakkor BAKER és CRAWFORD /1975/ megerősítve korábbi adatinkat /VIZI, 1972/ speciális "superfusion" technikával véglemez potenciálokat regisztrálva a K-megvonás után a m.e.e.p.-ok frekvencia fokozódását észlelte, azaz az ACh felszabadulás fokozódását.



49. ábra

Rb^+ hatásossága /a/ és a Cs^+ hatástalansága /b/ a K^+ helyettesitésben az ACh felszabadulás vonatkozásában. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom /Auerbach plexus/ preparátum. Krebs oldat, 95 % O_2 + 5 % CO_2. 1 Hz-es Field ingerlés ahol jelezve van /1 msec, supramaximális inger/.
K-megvonás után Rb^+-t adva az ACh felszabadulás gátlódik, Cs^+ hatástalan.

15. táblázat

Membrán ATPáz gátlásának és reaktiválásának hatása az acetylcholin felszabadulásra. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátuma

	Acetylcholin felszabadulás , pmol/g. min			
	kontroll	K-mentes Krebs oldat /12o perc/	K-visszaadás	csökkenés %
Nyugalmi * /6/	217.9 ± 38.1	637.2 ± 151.6	53.8 ± 6.6	75.3
Ingerlés:				
0.1 Hz** /5/	465.9 ± 24.2 /41.3 pmol/g.volley/	873.2 ± 88.9 /33.3 pmol/g.volley/	63.o ± 4.o /1.6 pmol/g.volley/	96.1
1.o Hz* /5/	739.9 ± 82.o /8.7 pmol/g.volley/	1147.6 ± 255.7 /7.9 pmol/g.volley/	115.7 ± 11.3 /1.o pmol/g.volley/	88.2
1o.o Hz□ /4/	228o.2 ± 1187.5 /3.44 pmol/g.volley/	469o.5 ± 31o.6 /6.5 pmol/g.volley/	649.8 ± 67.4 /1.o pmol/g.volley/	71.2

* gyűjtési idő 1o perc, ** 5 perc; □ 1 perc. Krebs oldat, 95 % O_2 + 5 % CO_2. Ezerin szulfát, 2ug/ml. Szuparmaximalis "field" ingerlés /1o V/cm, 1 ms /. Ingerlés és ACh meghatározás: PATON és VIZI, 1969. Zárójelben volley output. K-mentes Krebs oldatban 12o percig tartottuk a preparátumot és a maximális felszabadulási sebességet adtuk meg. K-visszaadás után 1o perccel mértük az ACh felszabadulást.

Ha a KCl-t RbCl-al helyettesitettük, akkor nem emelkedett meg az ACh felszabadulás és az nem csökkent, ha 5,9 mM KCl-t adtunk. Ez azt jelenti, hogy a Rb^+ helyettesiteni tudja a K^+-t az ACh felszabadulás mechanizmusában. Ezzel szemben a Cs^+ nem tudta helyettesiteni a K^+-t /49. ábra/. A Rb^+ azonban nemcsak itt, hanem a membrán ATP-ázra kifejtett hatásában is helyettesiteni tudja a K^+-t /l. SKOU, 1975/. Ez az adat az ACh felszabadulás és a membrán ATP-áz aktivitása közötti szoros összefüggés egy ujabb bizonyitéka.

Ha nem 5.9 mM K adtunk vissza a Krebs oldathoz, hanem a Na^+ megfelelő csökkentése mellett 47.3 mM-t az ACh felszabadulás akkor is lecsökken 838.6 ± 41.5 pmol/g.min-ről 68o.5 ± 71.6--re /n=3/. Ami teljesen váratlan eredmény, hiszen ha a membrán követné a Nernst egyenletet, akkor most jelentős ACh felszabadulást kellene észlelnünk /l. 6. ábra/. Azonban valószinüleg a membrán ATPáz aktiválódása függetleniti a membránt a szokásos törvényszerüségektől.

További kisérleteinkben arra voltunk kiváncsiak vajon a membrán ATPáz izgatásának ACh felszabadulást gátló hatása frekvencia függő-e. A 15. táblázat mutatja a tengeri malac ileum hosszanti simaizom- Auerbach plexus preparátumon kapott kisérleti eredményeket. K-visszaadás, azaz a membrán ATPáz izgalma, nemcsak az 0.1 Hz-es, de a lo Hz-es ingerléssel kiváltott ACh felszabadulást is lecsökkentette, bár azt kisebb mértékben.

Amig a felszabadulás 0.1 Hz-nél 465.9 ± 24.2 pmol/g.min-ről 63.o ± 4.o pmol/g.min-re csökkent, addig 1o Hz-nél a 228o.2 ± 1187.5 pmol/g.min-ről csak 649.8 ± 67.4 $pmolg^{-1}$-re. Ez arra utal, hogy a membrán ATPáz izgalma a nagy frekveniás ingerléssel kiváltott ACh felszabadulást is részben gátolni tudja. Itt is felmerül azonban, hogy esetleg nem a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz aktivitás fokozódása per se az oka az ACh felszabadulás gátlásnak, hanem ennek valamelyik következménye. Melyek lehetnek ezek ?

6.1.2.1. Hiperpolarizáció.

Az elektrogén Na^+-pumpa aktivitás fokozódásának az eredménye C-roston /RANG és RITCHIE, 1968/ és simaizmon /TOMITA és YAMAMOTO, 1971; BOLTON, 1973/ a nyugalmi potenciál emelkedése. Azonban nem valószinü, hogy egyedül a nyugalmi potenciál emelkedése okozná az ACh felszabadulás csökkenését. Maga a hiperpolarizáció tulajdonképpen fokozza a véglemez potenciálok quantális transzmitter tartalmát /HUBBARD és WILLIS, 1968/, bár a nyugalmi ACh felszabadulással analóg miniatür véglemez potenciálok frekvenciáját csökkenti /LILEY, 1956/. Az egy ingerületre felszabaduló ACh mennyisége kisérleteinkben jelentősen lecsökkent, igy ezt a nyugalmi potenciál változásával magyarázni nem lehet.

6.1.2.2. Intracelluláris K^+ emelkedése.

A membrán ATPáz izgatása az K_i emelkedéséhez vezet.

Mivel az ATPáz enzim izgatása gátolta az ACh felszabadulását, ezt ugy is lehet értelmezni, hogy az intracelluláris K koncentráció emelkedése az ACh felszabadulás csökkenéséhez, a K_i csökkenése pedig, ami egyébként a K-mentes oldatban illetőleg membrán ATPáz gátló jelenlétében bekövetkezik, a transzmitter felszabadulás fokozódásához vezet. BAKER és CRAWFORD /1975/ K-hiányos oldatban kapott m.e.p.p. frekvencia fokozódást tulajdonképpen igy magyarázza. Ez az elképzelés a K_i szerepét hangsulyozza a transzmitter felszabadulásban. Rb-al végzett kisérleteink azonban kizárják ezt a lehetőséget. Ha Rb-t adtunk vissza K-mentes oldathoz az ACh felszabadulás szintén teljesen gátolva volt /49. ábra/, K belépés lehetősége pedig ki volt zárva. Az igaz, hogy a Rb teljesen helyettesiteni tudja a K-t a membrán ATPáz aktiválásában, viszont ez a tény megint a membrán ATPáz aktivitásának fontosságát hangsulyozza csak.

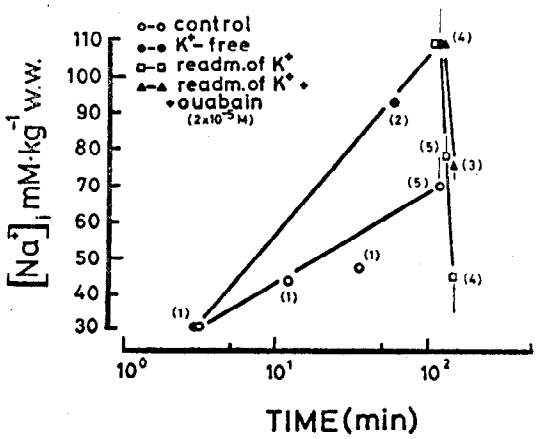
6.1.2.3. Intracelluláris Na csökkenése.

A Na^+-K^+-aktiválta ATPáz gátlása a Na_i emelkedéséhez, az enzim izgatása a Na_i csökkenéséhez vezet. Vagus C-roston megvizsgáltuk a kérdést, amely preparátum egyébként myelin--hüvely nélküli ideg és egyben a végkészülék modelljének tekinthető. Az Auerbach plexus neuronjai egyébként Schwann-sejt nélküliek GABELLA /1972/. Igy jogosnak látszott nyul meghámozott vagus rostjain vizsgálni az ionális megoszlás változását a különböző ionális miliőben. Két órás inkubáció után a Na_i tartalom

7o.4 ± 4.8 a kalcium 11.3 m-mole/kg volt. K-megvonása hatására ez 1o9.7 illetőleg 12.o-re emelkedett. K /5.9 mM/ visszaadására a Na_i tartalom 1o perc után 57.3, 3o perc után 44.9 m-mole/kg csökkent le, ami azt jelenti, hogy a natrium pumpa igen aktivan müködött. Az 5o. ábra mutatja a kisérleti eredményeket, amikor is a Na kilépés konstansát ki lehet számitani. Az a tény, hogy a Na_i tartalom a kontroll

5o. ábra

K-megvonás és visszaadása hatása a Na_i koncentrációjára nyul vagus rostjain vizsgálva. Krebs oldat, 37°C.
Emissziós spektrometriás meghatározás. Zárójelben a kisérletek száma, függőleges vonal a standard hibát jelenti.



érték alá csökken K visszaadásra arra utal, hogy a nátrium pumpa aktivan pumpálja ki a Na-t, tehát elektrogén. Ez az adat arra utal, hogy a C-rostban is müködik az elektrogén Na pumpa. RANG és RITCHIE /1968/ még arra következtettek, hogy a Na kipumpálásának csak kis része köszönhető az elektrogén Na pumpa aktivitásának. Kisérleteink alapján bizonyitva van viszont, hogy C-roston igen jelentős a Na belépés sebessége /5o. ábra/ és erre egyébként a C rostra jellemző nagy

16. táblázat

Na_i koncentrációjának változása különböző kisérleti feltételek mellett izolált nyul "meghámozott" rostjain vizsgálva. Krebs oldat, 37°C.

	Na^+_i /m-mol-kg^{-1} w.w./	k /min^{-1}/
kontroll /kezdeti/ n=1	31.5	
kontroll /12o perc/ n=5	7o.4 ± 4.8	0.oo15
K-mentes /12o perc/ n =4	1o9.7 ± 9.7	0.oo93
K-visszaadás /3o perc/ n=4	44.9 ±1o.2	0.o74
K-visszaadás + ouabain /2x1o^{-5}M/ /3o perc/ n=3	76.o ± 3.6	0.o42
K és Ca-mentes + EGTA /1 mM/ /12o perc/ n=5	1o1.7 ± 5.1	0.oo27
K-visszaadás Ca-mentes + EGTA/1mM/ /3o perc/ n=5	51.3 ± 9.1	0.o65
K-visszaadás + Ouabain /2x1o^{-5}M/ Ca-mentes + EGTA /1mM/ /3o perc/ n=5	75.5 ± 6.8	0.o25

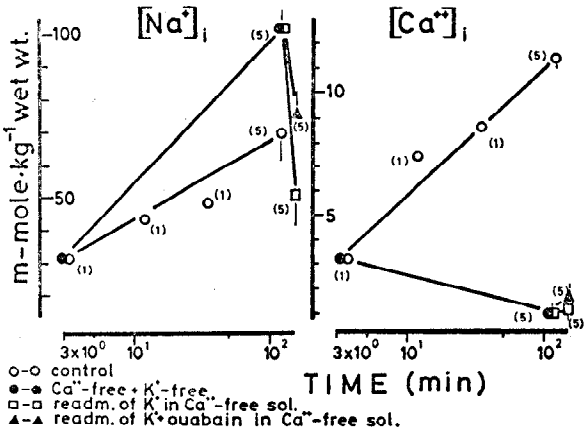
A Na^+ vesztés vagy felhalmozódás sebességé KAO és NISHIYAMA /Am.J.Physiol. 217: 525-531, 1969/ módszerével határoztuk meg.

$Na_t = /Na_o - Na_{oo}/.e^{-kt} + NA_{oo}$, ebből k-t kifejezve

$$k = \frac{\lg \frac{Na_o - Na_{oo}}{Na_t - Na_{oo}}}{0.434.t}$$

felszin/térfogat arányból következtetni is lehetett. Az intracellulárisan felszaporodó Na pedig aktiválja a membrán ATPázt és az most már ugy állitja helyre az egyensulyt, hogy a Na-t még a normális szint alá is süllyeszti.

Ha a Ca-hiányos Krebs oldatból kihagytuk a K ionokat ugy ebben az esetben is megemelkedett a Na_i koncentrációja /16. táblázat és 51. ábra/ 101.7 ± 5.1 m-mole/kg-ra. Ca^{2+} jelenlétében 109.7 ± 9.7 m-mole/kg volt az intracelluláris Na^+koncentrációja 120 perc után. Tehát lényeges különbség nincs a két érték között, ami azt bizonyitja, hogy a Ca_i nem befolyásolja lényegesen a K-megvonás hatására bekövetkező Na_i emelkedését. K visszaadása Ca-hiány esetén is a Na_i gyors lecsökkenéséhez vezet /51. ábra/. Ez arra utal, hogy extracelluláris calcium ionoktól független a K-aktiválta ATPáz aktivitás fokozása. Az 50. és az 51. ábrán jól látható, hogy a K-visszaadásra bekövetkező gyors Na-efflux csak egy része az ouabainnal gátolható Na-pumpa aktivitás fokozódásának az eredménye.



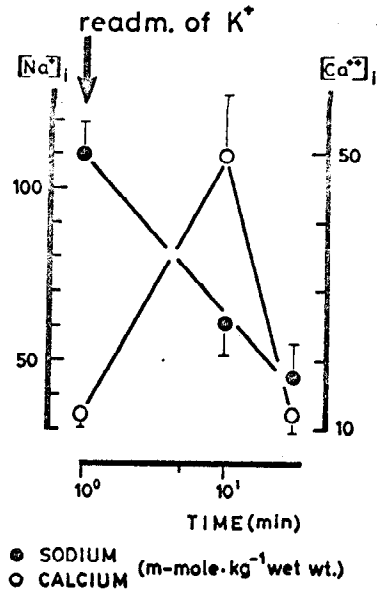
51. ábra K-megvonás és visszaadás hatása Ca^{2+} hiányban a Na_i és Ca_i koncentrációra. Nyul izolált vagus preparátum. Emissziós spektrometriás ion meghatározás. Zárójelben a kisérletek száma. Standard szórást a függőleges vonal jelzi.

6.1.2.4. Változások a Ca^{2+} permeabilitásban.

Korábbiakban kimutattuk, hogy a fokozott Ca belépés, valószinüleg az erőteljesebb membrán ATPáz gátlás eredményeképpen, fokozottabb ACh felszabadulást eredményez. Calcium hiányos oldatban tartott tengeri malax ileum hosszanti simaizom-Auerbach plexus preparátumából az ACh felszabadulás lecsökken /45. ábra/. Visszaadva a Ca-t egy okozottabb felszabadulást észleltünk. A kérdés most már az, hogy a K visszaadása a K hiányos Krebs oldatban tartott preparátumon hogyan befolyásolja a Ca belépést. Az ACh felszabadulás gátlásának az oka lehet az is, hogy a Ca belépés gátolva van. Ez a lehetőség kizáródik azzal a kisérleti ténnyel , hogy a K hiányos oldatban bár a Ca_i nem szaporodik fel, visszaadva a K-t egy gyors és meglepő intracelluláris Ca tartalom növekedés észlelhető /52. ábra/. A Ca tartalom 11.3 ± 2.8 m-mole/kg-ről K mentes oldatban 12.o ± 1.35 m-mole/kg-ra emelkedik. Ha most visszaadjuk a K-t tehát tulajdonképpen normális Krebs oldatban tartjuk a preparátumot, akkor a Ca_i tartalom lo perc után 49.7 ± 9.9 m-mole/kg-re emelkedik C-roston /n=7/. Ebben az idő pillanatban az ACh felszabadulás majdnem teljesen gátolva van. Tehát K visszaadás esetén a Ca-belépés hirtelen fokozódik /52. ábra/, az ACh felszabadulás mégis gátolva van, és a Na^+-K^+-aktiválta ATPáz viszont erős izgalmi állapotban van. Megválaszolandó, hogy a hirtelen a Ca belépés fokozódásának mi az oka. Idegi strukturákon ki-

52. ábra

Intracelluláris Na^+ és Ca^{2+} tartalom változása K-mentes Krebs oldatban tartott nyul vagus C-roston K-visszaadás hatására. K-mentes Krebs oldatban 9o percig volt 37°C-on a szövet. Emissziós spektrometriás meghatározás. Figyeld meg az intracelluláris Ca tartalom emelkedést 1o perc után !



mutatták, hogy a Ca^{2+} mozgása nagy részben függ a Na^+ permeabilitás változás irányától /BAKER és BLAUSTEIN, 1968; BAKER és mtsai., 1969; KALIX, 1971; COOKE és ROBINSON, 1971; STAHL és SWANSON, 1972; BLAUSTEIN és OBORN, 1975/. Véleményünk szerint igy elképzelhető, hogy a K-mentes Krebs oldathoz való K visszaadás esetén a Na kilépés olyan nagymértékben fokozódik /16. táblázat/, hogy ezt kompenzálandó Ca^{2+} lép be és ez a másodlagos Ca belépés, amely viszont a membrán ATPáz izgalom eredménye, már nem okoz transzmitter felszabadulást.

Az eddigi kisérleti eredmények alapján tulajdonképpen kizárható a K, Na és a Ca ionok permeabilitás változásainak direkt szerepe az ACh felszabadulás gátlásában. Igy jogosan feltételezzük, hogy a membrán ATPáz izgalom per se felelős az ACh felszabadulás gátlásáért.

6.1.2.5. Na^+-K^+-aktiválta ATPáz aktiválódása és az ACh és NA felszabadulás gátlása. A NA transzmitter felszabadulást gátló és a membrán ATPáz izgató hatása közötti összefüggés.

Kisérleteink alapján valószinü, hogy a Na^+-K^+-aktiválta membrán ATP-áz aktivitás fokozódásra vezethető viszsza az ACh felszabadulás lecsökkenése. Ezzel a mechanizmussal meg lehet magyarázni a noradrenalin /PATON és VIZI,1969; VIZI, 1968/ α-receptoron keresztül kifejtett ACh felszabadulást gátló hatását is.
Kimutatták, hogy a NA fokozza a K^+-aktiválta p-nitrofenilfoszfatáz aktivitását /FORMBY és CLAUSEN, 1968/. Patkány agyban aktiválja a membrán ATPáz müködését, ha az Ca^{2+}-al, vagy ouabainnal van gátolva /GODFRAIND és mtsai, 1974/. Ez az adat nagyon jól magyarázza azt a megfigyelésünket, hogy az α-receptor izgatása akkor csökkenti az ACh felszabadulást, ha az Ca^{2+} belépéssel van összefüggésben. Az ouabain által felszabaditott ACh mennyiségéből csak annyit gátol a NA, amennyi a fokozott Ca^{2+} belépés rovására irható /VIZI, 1972; 1975/. Patkány agy membrán ATPáz aktivitását mérve GODFRAIND és mtsai /1974/ a NA ED 5o-jét és ED loo-t $6x10^{-6}$ illetőleg 10^{-4}M-nak találták. Kisérleteinkben a NA hasonló koncentrációban gátolta az ACh felszabadulást az Auerbach plexusból /PATON és VIZI, 1969/. A NA membrán ATP-áz izgató hatását mutatta még ki SCHAFER és mtsai /1972/, valamint YOSHIMURA /1973/ is. A NA ACh felszabadulást gátló hatásánál felmerül

17. táblázat

Különböző vegyületek, kationok, Na^+-K^+-aktiválta membrán ATPázt gátló és acetilkolint felszabaditó koncentrációi /agyszövet/.

	ACh felszabadulást* okozó koncentráció /M/, izolált agykéreg szeletből	Na^+-K^+-aktiválta ATPázt gátló koncentráció /ED_{50}/ agyszövetben	Irodalmi adatok a membrán ATPáz gátlásra
Ouabain	10^{-6} - 10^{-4}	10^{-6}	AKERA és BRODY, 1970;
Ca^{2+}	10^{-4} - 10^{-5}	$5x10^{-4}$; 10^{-3}	SOMOGYI, 1964; SOMOGYI és VINCZE, 1962; RENDI, 1966;
Ba^{2+}	10^{-5}	$2x10^{-4}$	RENDI, 1966;
p-chloromerkuribenzoát /PCMB/	10^{-5}	$5x10^{-6}$	AKERA és BRODY, 1970;
Etakrinsav			
Chlorpromazin	$5x10^{-4}$	$2x10^{-5}$ $2x10^{-4}$	AKERA és BRODY, 1970; EBADI és CARVER, 1970;
Cu^{2+}	10^{-5}	10^{-6}	HEXUM, 1974;
Phospholipase A	**		SKOU, 1960;
Triton - x-100	0.1 % V/V ***		SOMOGYI és GÁL, 1965;

* VIZI /1974; 1975/ adatai patkány agykéreg szeleten

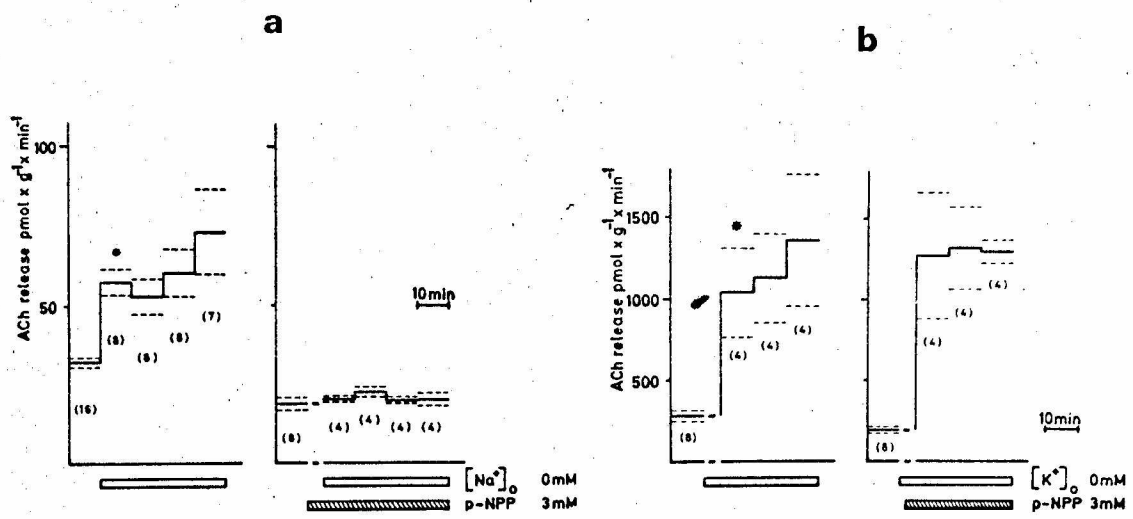
** HEILBRONN, 1970

*** FISCHER és mtsai, 1974

egy esetleges hemicholiniumszerü hatás. Ez kizárható, mert hatása egyrészt azonnal jelentkezik, másrészt az endogén és exogén NA fokozza a magas affinitásu kolin transzportot /COROLL és BUTERBAUGH, 1975/. Korábban a NA ACh felszabaditást gátló hatását a K^+ permeabilitás fokozó hatásával magyarázták /PATON és VIZI, 1969/. Az ACh felszabadulás sebessége és a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz enzim aktivitása közötti szoros összefüggés található /l. 17.táblázat/. A NA gátló hatását a Ca^{2+}-al gátolta membrán ATPázon kifejtett izgató hatással magyarázzuk. Ugyanilyen mechanizmussal magyarázzuk a Mg^{2+} ACh felszabadulást gátló hatását, amely egyébként patkány agykéreg szeleten 5 mM koncentrációban teljesen felfüggeszti az 5 mM Ca^{2+} gátló hatását /SOMOGYI, 1964/. Ami különösen érdekes, hogy a Mg^{2+} a NA-hoz hasonlóan csak az alacsony frekvenciával kiváltott ACh felszabadulást gátolja és teljesen hatástalan ha az ACh felszabadulást nagy frekvenciás ingerléssel hozzuk létre /VIZI, 1972/. Véleményünk szerint a nagy frekvenciás ingerlésnél, ahol az egy ingerre jutó ACh felszabadulás kisebb, mint az alacsony frekvenciáknál /KNOLL és VIZI, 197o; 1971/ az elektromos ingerlés hatására, valamint a fokozott Na^+-belépésre a Na^+-pumpa aktivitása <u>sui generis</u> fokozódik és ez eleve lecsökkenti az ACh felszabadulását, és ekkor már a NA és a Mg^{2+} természetszerüleg hatástalan. Egyébként a NA-nak a NA felszabadulást gátló hatását /negativ feedback/ ugyanezzel a mechanizmussal magyarázzuk: NA a preszinaptikus

membrán α-receptorain keresztül izgatja a Na^+-K^+-aktiválta ATP-ázt.

BELLEAU /1966, 1967/ véleménye szerint az α-receptor szoros összefüggésben van a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz enzimmel. Ezt a véleményt igazolják azok a biokémiai adatok is /GILBERT és mtsai, 1975/, amelyek kimutatták, hogy a patkány agyból preparált szinaptoszómában /izolált végkészülék/ a Na^+-Mg^{2+}--aktiválta ATP-áz mellett, amely nem érzékeny ouabainra, Na^+-K^+-aktiválta ATPáz enzim is jelen van, melynek aktivitása NA-al /10^{-6} - 10^{-4}M/ fokozható. Phentolamine, mely egy szelektiv α-receptor blokkoló, 10^{-5}M koncentrációban, bár önmagában nem befolyásolta az enzimaktivitását, antagonizálta a NA enzim aktivitását fokozó hatását. Kisérleteinkben a NA és a phentolamine hasonló koncentrációban volt hatékony: phentolamin /2.5-5.0 x 10^{-6}M/ antagonizálta a NA /5.0 x 10^{-6}M/ ACh felszabadulást gátló hatását.



53. ábra

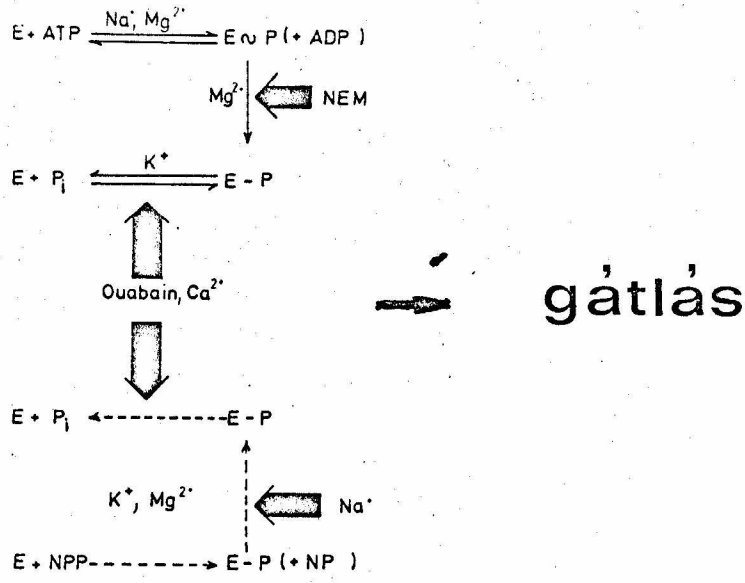
/a/ p-NPP /3 mM/ gátló hatása a Na^+-megvonás ACh felszabaditó hatására. Patkány izolált agykéreg szelet. Krebs oldat, 95 % O_2 + 5 % CO_2.

/b/ p-NPP /3 mM/ hatástalansága a K^+-megvonás ACh felszabaditó hatására. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom /Auerbach plexus/ preparátum. Krebs oldat, 95 % O_2 + 5 % CO_2. Ez a preparátum egyébként nagyon alkalmas az extracelluláris tér ion koncentrációjának gyors változására, mivel a diffuziós viszonyok kitünőek /a preparátum vastagsága kb. 2o-5o u, az Auerbach plexus és a végkészülékek a simaizom felszinén helyezkednek el/. Az agykéreg szeleten a K^+-megvonás nem okoz ACh felszabadulást, mivel a Na^+-pumpa valószinüleg nem gátlódik a szövetből kiáramló K^+ miatt. Sartorius izom preparátumon is hasonló jelenséget észlelt BIRKS és COHEN /1968/, valamint KEYNES /1954/.

18. táblázat

Na-megvonás és a p-NPP hatása vagus C-rost intracelluláris Na és Ca tartalmára. Emissziós spektrometriás meghatározás.

	Na^+_i	Ca^{++}_i
	/m-mole.kg^{-1}wet wt./	
kontroll/kezdeti/ n=1	31.5	3.2
kontroll /12o perc/ n=5	7o.4 ± 4.8 k=0.oo15 min^{-1}	11.3± 2.8 k=0.o36 min^{-1}
Na-mentes /12o perc/ n=5	26.o ± 2.8 k=0.o33 min^{-1}	22.6 ± 1.1 k=0.o97 min^{-1}
Na-mentes + + 3 mM p-NPP /12o perc/ n=5	22.3 ± 5.3 k=0.o35 min^{-1}	7.5 ± 0.8 k=0.o3omin^{-1}
Na^+visszaad. /3o perc./ n=3	88.4 ± 16.6 k=0.o64 min^{-1}	2o.o ± 1.4 k=0.o69 min^{-1}



54. ábra

A Na^+-K^+-aktiválta ATPáz enzim vázlatos ábrázolása.
A Na^+-függő foszfoenzim képződést /E~P/ egy konfromáció változás követ /E~P → E – P/, amely irreverzibilis. A reakció második része egy K^+-függő defoszforiláció.
A p-NPP-áz enzim K^+-függő, Na^+-al, Ca^{2+}-al és ouabainnal gátolható, valószinüleg egyezik a membrán ATP-áz K^+-függő részével.

6.1.3. K^+-aktiválta ATPáz jelentősége a transzmitter felszabadulásban. A p-nitrofenilfoszfatáz /p-NPPáz/ jelentősége.

A Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz K^+ függő részét és a K^+-aktiválta p-nitrofenilfoszfatázét azonosnak tartják /BADER és SEN, 1966; ALBERS és KOVAL, 1966/, ezért megvizsgáltuk, hogy a p-nitrofenilfoszfát /p-NPP/, amely kitünő szubsztrátuma a p-NPPáz enzimnek, hogyan befolyásolja az ACh felszabadulást,

ha azt az ATP-áz enzim Na^+- ill. K^+-függő részénél, gátoljuk. Az 54. ábra mutatja, hogy patkány agy kéreg szeleten a p-NPP 3 mM koncentrációban teljesen felfüggeszti a Na^+-hiány ACh felszabadító hatását. Ugyanakkor hatástalannak bizonyult, ha az enzim második lépését K^+-megvonással /53. ábra/ vagy ouabainnal gátoltuk. Ez arra utal, hogy a membrán ATP-áz első részének gátlása még nem hoz létre ACh felszabadulást, ha a második lépés aktiválva van /54. ábra/. Ez azt látszik alátámasztani, hogy az ACh felszabadulásban a második lépésnek van jelentősége.

Nagyon sok szövet mikroszómális frakciójában a Na^+-K^+-aktiválta ATP-ázon /ATP foszfohidroláz, EC 3.6.1.3/ kivül a neutrális foszfatázok aktivitása is mérhető. E foszfatázok káliummal aktiválhatók és Na^+-al gátolhatók. Az enzimnek acetilfoszfát /BADER és SEN, 1966/, p-nitrofenilfoszfát /ALBERS és KOVAL, 1966/ és karbamil foszfát /BADER és SEN, 1966/ lehet a szubsztrátuma. Nagyon hasonló tulajdonságai arra utalnak, hogy ez utóbbi a membrán ATP-áz K^+-függő része /BADER és SEN, 1966; ALBERS és KOVAL, 1966/. INTURISSI /1969/ kimutatta, hogy a Tl^+ pótolni tudja a K^+-t a p-NPP-áz aktiválásában. BRITTEN és BLANK /1968/ membrán ATPáz vonatkozásában talált hasonlót. Azonos hatást kiváltó koncentrációt illetően a Tl^+ lox hatékonyabb mint a K^+ /INTURISSI, 1969/. Kisérleteink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az ACh felszabadulásért a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz rendszerből a

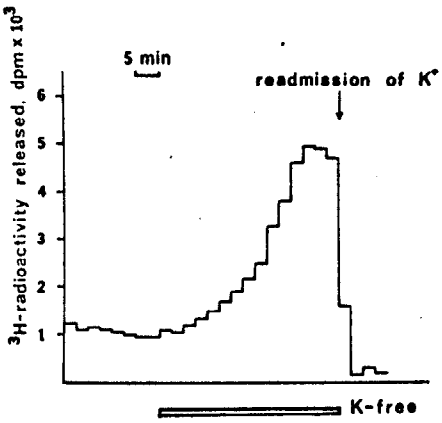
K^+-aktiválta rész a felelős, amely valószinüleg megegyezik a p-NPP-ázzal. A következő kisérleti adatok igazolják feltételezésünket:

1./ A Na^+-hiányos oldat ACh felszabaditó és Ca^{2+}belépést fokozó hatását a p-NPP /3 mM/ teljesen felfüggeszti /53. ábra és 16. táblázat/.

2./ Oligomicin /1o-2o ug/ml / nem fokozta az ACh felszabadulást /VIZI, 1975/ és nem gátolta a K^+-függő p-NPP-áz aktivitását sem /ASKARI és KOYAL, 1971; SOMOGYI és mtsai, közlés alatt; FORMBY és CLAUSEN, 1968/.

3./ Noradrenalin fokozza a p-NPP-áz aktivitását és kisérleteinkben gátolta az ACh felszabadulását.

A Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz enzim, amely egy Na-függő foszforilációs és egy K-függő defoszforilációs részből áll, aktivitása befolyásolja tehát a transzmitter felszabadulást. Minden valószinüség szerint a második rész tehető felelőssé a transzmitter felszabadulásért. ASKARI és RAO /1972/ kimutatta, hogy patkány agy Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz specifikus antiszéruma csak az első lépést gátolja. ASKARI /1974/ szerint ez még nem jelenti, hogy két teljesen független enzimről van szó. Valószinüleg az ATP-áz enzimnek két antigén szempontból eltérő tulajdonságokkal rendelkező része van. Az antiszérum a p-NPP-áz aktivitását nem befolyásolja /ASKARI és RAO, 1972; ASKARI, 1974/, tehát azt a részt, amely valószinüleg felelős a transzmitter felszabadulás moduláláséért.



55. ábra

K-megvonás noradrenalin felszabadiót hatása patkány izolált iriséből. FARNEBO és HAMBERGER /1971/ módszere. K-visszaadásra /5.9 mM/ a noradrenalin felszabadulás gátlódik. 5o uCi ^{3}H--/-/-noradrenalinnal exponáltuk a szövetet 3o percig 2 ml Krebs oldatban. 1ox1 percig 5o ml friss Krebs oldatban mosás. 2.5 mines minták. Insta-Gel scintillációs oldatban /5 ml/ mértük a radioaktivitást. /Packard, 33oo TriCarb/. 2 kisérlet átlaga.

Ez az elképzelés lehetőséget ad arra, hogy az ACh, ACh felszabadulást gátló hatását /SZERB és SOMOGYI, 1973; VIZI, 1974c/ is megmagyarázzuk. Az ACh gátló hatása azonban farmakológiai jelentőségü /VIZI, 1974c/, mivel csak ezerin jelenlétében mutatható ki /SZERB és SOMOGYI, 1973/, de valószinüleg ez is az ATP-áz izgatásával gátolja az ACh felszabadulást. Érdekes biokémiai adat, hogy atropin gátolja a membrán ATP-ázt, ha ezerin is van jelen /OELSNER, személyes közlés/. BROWN /1966/ kisérleteiben a scopolamin az ouabainhoz hasonlóan hatott, gátolta a pozitiv utópotenciált, amit a membrán ATP-áz fokozott

aktivitásával hozunk összefüggésbe. Ezekből az adatokból ugy látszik, hogy tropein szerkezetü acetilkolin antagonisták gátolják a Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz aktivitását. Igy válik érthetővé, hogy ezek az anyagok miért emelik meg az ACh felszabadulását /l. SZERB és SOMOGYI, 1973/.

További kisérleteinkben azt próbáltuk igazolni, hogy vajon a membrán ATPáz izgalom ACh felszabadulást gátló hatása általános érvényü-e, tehát például NA felszabadulásra is ilyen hatást fejt ki. Patkány izolált irisen /FARNEBO és HAMBERGER, 1971/ megpróbáltuk a kérdést tisztázni, miután előzőleg patkány vas deferensen sikertelenül zártuk kisérleteinket. K-mentes Krebs oldatban ^{3}H-/-/-noradrenalin felszabadulása az idő függvényében fokozódott /55. ábra/ 2.23 x 10^3 d.p.m. /2.5 min-ről 5.9 x 10^3 d.p.m./2.5 min-re. Visszaadva a K-t, a radioaktivitás mennyisége a fürdőben, amelyet 2.5 percenként levéve mértünk, gyorsan a kontroll érték alá süllyedt. Ilyen kisérleti feltételek mellett jogosan feltételezzük, hogy a membrán ATPáz izgalomban van. Ezen kisérletünk alapján általánosnak mondhatjuk azt a törvényszerüséget, hogy a membrán ATPáz izgalma a transzmitter felszabadulás gátlásához vezet.

6.2. A posztszinaptikus membrán Na^+-K^+-aktiválta ATPáz enzimjének szerepe a szinaptikus input recepciójában.

Eddigiek során azt tárgyaltuk, hogy a preszinaptikus membrán Na^+-K^+-aktiválta ATP-áz enzim aktivitásának változása

hogyan befolyásolja az ACh felszabadulását. Továbbiakban a posztszinaptikus membrán Na-pumpájának fiziológiai és farmakológiai szerepét elemezzük.

A posztszinaptikus membránok feloszthatók:

1. idegi strukturáju /neuro-neuronális szinapszis/ és
2. izom strukturáju /neuro-effektoriális/ membránokra.

6.2.1. Neuro-neuronális szinapszis

Néhány szerző kimutatta /PASCOE, 1956; BROWN, 1966; KOSTERLITZ és mtsai, 1968; 197o; LEES és WALLIS, 1974/, hogy macska vagy patkány ganglion cervicale superiorban különböző depolarizáló vegyületek /kolin, ACh, carbachol/ kimosása után a sejttestben hiperpolarizáció lép fel. Régóta ismert volt, hogy ezen ganglionok preganglionális idegének ingerlésekor az akciós potenciál lezajlása után a membrán hiperpolarizálódik. Ezt a jelenséget különböző okok magyarázhatják:

a/ Nagy pozitiv utópotenciál, mely összefüggésben van a konduktancia változással, /K^+, vagy K^+ és Cl^+ iránt/, amely a ganglion akciós potenciálját követő repolarizáció eredménye.

b/ Hiperpolarizációt kiváltó posztszinaptikus potenciál /lassu i.p.s.p./ amely nincs összefüggésben az ionális konduktencia változással /KOBAYASHI és LIBET, 1968/. Sokan ezt az in loco felszabadult katecholaminok posztszinaptikus hatásának tartják /l. LIBET, 197o/.

c/ Az elektrogén Na-pumpa aktivitás fokozódása /KOSTERLITZ és mtsai, 1969, 1972/. Nagy koncentrációban adott ACh depolarizáló hatása után a posztszinaptikus membrán hiperpolarizálódik. Ez a jelenség függ a külső Na^+ koncentrációjától, de független a K^+ permeabilitástól. Az extracelluláris K^+ koncentrációjának csökkentésével nem lehetett fokozni a hiperpolarizációt /LEES és WALLIS, 1974/. Ouabain /1o uM/ jelenlétében K-mentes oldatban pedig csak igen kis mértékben fejlődött ki hiperpolarizáció az ACh hatására létrejövő depolarizáció után /LEES és WALLIS, 1974/, amit bizonyit az a tény is, hogy muscarin-receptor bénitók nem befolyásolják a nagy koncentrációju ACh depolarizációja után kifejlődő hiperpolarizációt /BROWN és mtsai, 1972/.

6.2.2. Neuro-effektoriális szinapszis

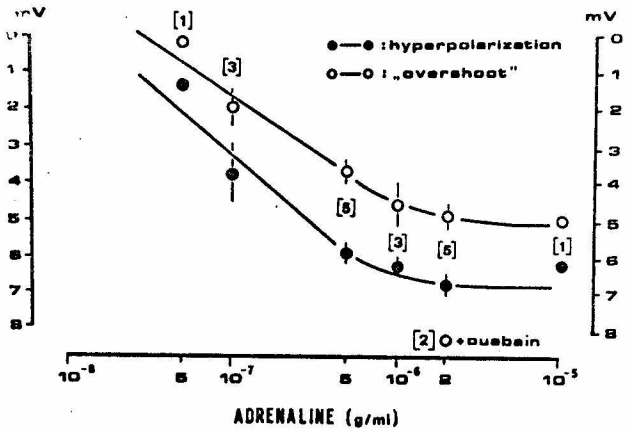
6.2.2.1. Simaizom

A Na-pumpa elektrogén jellegét BÜLBRING /1962/ irta le először simaizmon. Megállapitotta, hogy az elektrogén Na--pumpának szerepe van abban a hiperpolarizációban melyet glukóz adása után, vagy hőmérséklet emelésére észlelt. Mindamellett BORN és BÜLBRING /1956/ taenia coli preparátumon azt találták, hogy az adrenalin csak a befelé irányuló K^+ áramot fokozza, mig a kifelé irányulót nem befolyásolja. Ennek alapján feltételezték, hogy az adrenalin a sejt K vezetőképességét fokozza. BURNSTOCK /1958/ az anyagcsere gátló DNP-vel vég-

zett kisérleteiben azt találta, hogy a fenti vegyület az adrenalin jellegzetes hiperpolarizáló hatását taenia colin megforditja, adrenalin depolarizációt okoz. Ezért BURNSTOCK az adrenalin hatását az elektrogén pumpa aktivitás fokozásával hozta összefüggésbe, mely véleménye szerint megmagyarázhatja a BORN és BÜLBRING /1956/ által észlelt fokozott K-felvételét. Később BÜLBRING és mtsai /1966/ megerősitették BURNSTOCK feltételezését, mivel kisérleteikben az adrenalin 5o %-kal fokozta a simaizom sejtekből a jelzett Na^+ kilépését. BÜLBRING és TOMITA /197o/ az izom elektrotónusos potenciálját mérve kimutatták, hogy az adrenalin a membrán ellenállását csökkenti, azaz a vezetőképességet fokozza /V=1/R /, mely hatás phentolaminnal gátolható volt. Ez arra utal, hogy az adrenalin hatása a simaizom sejten lévő α-adrenoceptorok közvetitésével jön létre.

Taenia coli preparátumon a nyugalmi potenciál mintegy 2o mV-al negativabb, mint azt a Goldman egyenletből várhatnánk. Ez az állandó "hiperpolarizáció" valószinüleg a Na-pumpa fokozott aktivitásának az eredménye.

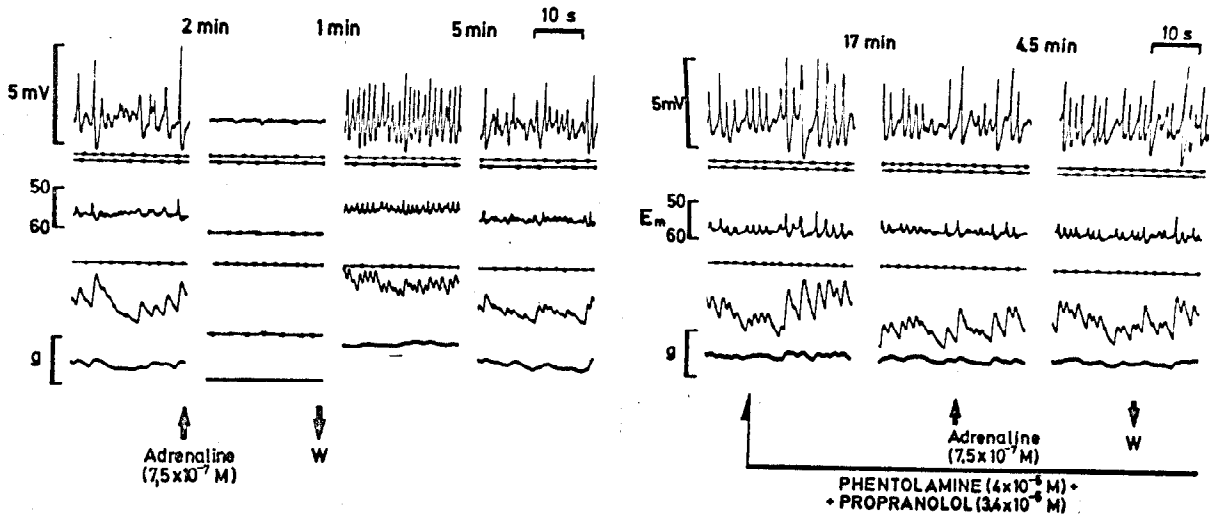
Kisérleteinkben taenia coli preparátumon "sucrose-gap" /VIZI, TÖRÖK és KNOLL,1972/ technikával koncentrációfüggőnek találtuk az adrenalin membrán potenciál emelő hatását /56. ábra/. Az adrenalin által létrehozott hiperpolarizáció alfa-receptoron keresztül érvényesül, mivel phentolaminnal /$4x10^{-5}$M/ gátolható volt. Ugyanakkor az adrenalin tüske tevékenységre



56. ábra

Adrenalin hiperpolarizációt és a kimosását követő utódepolarizációt okozó hatása taenia coli preparátumon. Sucrose-gap módszer. Ordináta: hiperpolarizáció /mV/, kimosás utáni depolarizáció /mV/. Abszcissza: adrenalin HCl koncentráció g/ml-ben.

kifejtett gátló hatását béta-receptor gátlóval fel lehetett függeszteni. Phentolamin és propranolol /3.4x10^{-5}M/ jelenlétében az adrenalin teljesen hatástalan volt /57a ábra/. Ebből következők, hogy az alfa receptor izgatása révén a membrán hiperpolarizálódik, és ezen nyugalmi potenciál változásnak a következménye a tüske aktivitás megszünése. Ezt támasztja alá az a kisérleti tény is, hogy csupán α-receptor blokkolás esetén a vegyület tüske aktivitást gátló hatása megmarad. BÜLBRING és TOMITA /1969/ ugyancsak alfa és béta receptor aktiválásban jelölte meg az adrenalin hatását sima izmon.



57. ábra

Tengeri malac taenia coli preparátumának spontán elektromos és mechanikus aktivitása Krebs oldatban 35°C-on mérve "sucrose--gap" módszerrel.

/a/ az adrenalin hiperpolarizáló hatását 8 csatornás direktirón /Mingograph-81/ regisztráltuk. W: kimosás.
Első csatorna /fentről lefelé/: tüske aktivitás AC erősitéssel
Második csatorna: membrán potenciál DC erősitéssel
Harmadik csatorna: tüske aktivitás integrálja DC erősitéssel
Negyedik csatorna: mechanikus aktivitás DC erősitéssel regisztrálva.

/b/ alfa + béta receptor blokkolók hatása az adrenalin hiperpolarizációjára.

Kisérleteinkben szinte törvényszerüen egy u.n. "after depolarization" utódepolarizáció jelentkezett az adrenalin kimosását követően /57b ábra/, amely ugyancsak koncentráció függőnek bizonyult /56. ábra/. Feltételezve, hogy az adrenalin a Na^+-K^+-aktiválta ATPázt izgatja, ez a jelenség könnyen érthetővé válik. A Na-pumpa aktivitása intracelluláris Na^+ koncentráció

függő. Ez a megállapitás általános érvényünek mondható. Ha az intracelluláris Na^+ koncentráció csökken, ugy az enzim rendszer és ezáltal a Na-pumpa gátlás alá kerül, mivel a membrán belső oldalán a Na^+ és a K^+ között csakugy mint a külső oldalon kompetició áll fenn. Ezért az intracelluláris Na^+ koncentráció lecsökkenése azt eredményezi, hogy az enzim rendszerhez való kötődés relative a K^+ javára tolódik el, ami viszont a szisztéma gátlását vonja maga után. Ouabain az adrenalin által kiváltott hiperpolarizációt csökkentette, az utódepolarizációt fokozta. Adrenalin jelenlétében a membránon kettős és egyben ellentétes hatással kell számolnunk. Az egyik a membrán külső oldalára lokalizálódik, izgató hatás, a másik viszont ezzel ellentétesen ható intracelluláris Na^+ koncentráció csökkenés. E két effektus időben nem esik teljesen egybe, mivel a Na^+ csökkenés a pumpa izgatásának az eredménye, de minden esetben e két ellentétes hatásnak az eredőjét mérjük. Ha azonban az adrenalint kimossuk, ugy a membrán belső oldalára lokalizálódó gátló hatás /pumpa gátlás/ jut érvényre, amelynek következménye a fokozott Na-belépés /utódepolarizáció/, melyet az 56. ábrán "overshoot"-al jelöltünk. Az adrenalin által ökozott maximális hiperpolarizáció 7 mV volt, amelyet egyébként $2x10^{-6}$ g/ml koncentrációban hozott létre. BOLTON /1972/ számolási technikáját követve az

Equilibrium potenciál = $E_m - E_{max.}$

ahol: E_m = nyugalmi potenciál

$E_{max.}$ = vegyület által okozott maximális hiperpolarizáció

igy kisérletünkben az

Equilibrium potenciál = 66-/-7/;

Equilibrium potenciál = 73 mV.

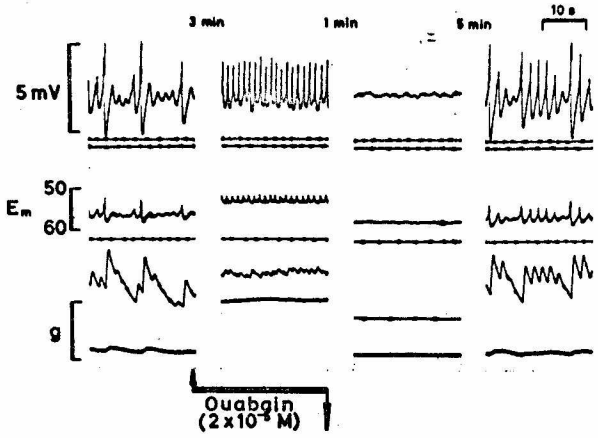
Az adrenalin membrán ATP-ázt és igy a Na-pumpát izgató hatását többen felvetették, ill. igazolták /HEXUM, 1974; GODFRAIND és mtsai, 1974/. Az ouabain és az adrenalin ellentétes hatást fejt ki az enzim rendszerre és ezáltal a Na-pumpára. Kvantitativ kémiai analitikai módszerrel /emissziós spektrofotometria/ módunkban állt megmérni a preparátum intracelluláris Na^+ koncentrációját, adrenalin ill. ouabain jelenlétében /19. táblázat/. A Na^+ karakterisztikus sugárzását 589 nanométer hullámhosszon mértük. A kontroll preparátumok intracelluláris Na^+ koncentrációja mM-ban kifejezve és kg nedves szövet sulyra számitva 35.1 ± 1.5 mM volt. Ez az érték adrenalin jelenlétében csökkent /2o.6 mM/, ouabainnal való inkubálás során pedig emelkedett /9o.9 mM/, mely igen jó összhangban van a két vegyület Na-pumpára gyakorolt ellentétes hatásával.

19. táblázat

Az intracelluláris Na^+ koncentráció változása a membrán ATPáz gátlása illetőleg izgatása esetén. Tengeri malac taenia coli preparátum. Emissziós spektrofotometriás meghatározás.

	Na^+_i m mole kg^{-1} nedves suly S.E.M.	
kontroll /1 h/	35.1 ± 1.5	/n=5/
ouabain /2x1o^{-5}M/ /1^h/	9o.9 ± 4.7	/n=7/
adrenalin /3.5x1o^{-5}M/ /1^h/	2o.6 ± 5.9	/n=5/
ouabain /2x1o^{-5}M/+ + adrenalin /3.5x1o^{-5}M/ /1^h/	45.6 ± 7.2	/n=4/

Taenia coli preparátumon az ouabain /2x10^{-5} M/ azonnali depolarizációt okoz /5-6 mV/, fokozza a tüske aktivitás



58. ábra

Tengeri malac taenia coli preparátum spontán elektromos és mechanikus aktivitása és annak befolyásolása membrán ATPáz gátlóval /ouabain/. Sucrose-gap módszer. Krebs oldat. Egyébként lásd az 57. ábra magyarázatát.

frekvenciáját, gátolja a negativ utópotenciált /58. ábra/, a következményes mechanikus választ viszont fokozza. Kimosását követően a membrán hiperpolarizálódik, a tüske aktivitás megszünik és az izom relaxálódik. A membrán potenciál emelkedése meghaladja az ouabain által kiváltott depolarizáció mértékét. Mérve az izom intracelluláris Na^+ koncentrációját,

ouabain hatására, az egy órás mérési periódus során, az 35.1 ± 1.5 mM/kg nedves sulyról 9o.9 ± 4.7 mM nedves sulyra emelkedett /19. táblázat/. A vegyület adását és kimosását követően CASTEELS /1966/ az első 5-1o perc során nem tudott intracelluláris K^+ és Na^+ koncentrációban változást mérni. Ez felveti a membrán ATPáz oki szerepének a lehetőségét. Az ouabain depolarizáló hatását külső Na^+ koncentráció csökkenésével és adrenalin adásával gátolni lehet, mely adatok a vegyület elektrogén Na-pumpára kifejtett hatását látszanak alátámasztani. Kisérleteinkben taenia coli preparátumon az adrenalin is meggátolta az ouabain intracelluláris Na^+ koncentrációt emelő hatását. E két vegyület együttes alkalmazásakor az intracelluláris Na^+ koncentráció 35.1 ± 1.5 mM-ról 45.6 ± 7.2 mM kg^{-1} nedves sulyra emelkedett csupán.

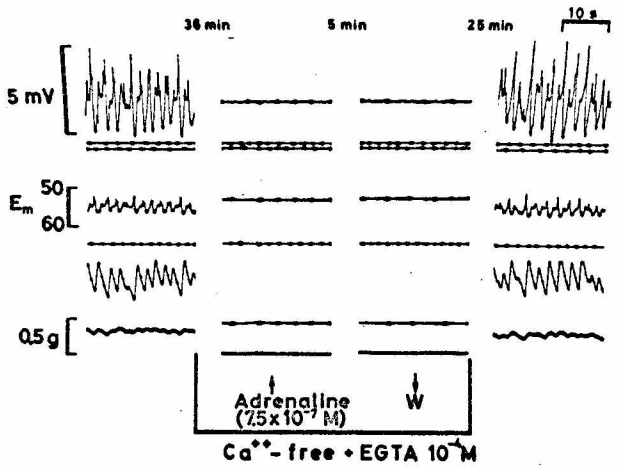
Extracelluláris Ca^{2+} szerepe a Na-pumpa müködésében.

Korábbi kisérleteinkben bizonyitottuk, hogy fiziológiás körülmények között az extracelluláris Ca^{2+} szerepe a transzmitter felszabadulásában éppen a bazális membránban helyet foglaló Na-pumpa gátlásán keresztül érvényesülhet. Joggal merül fel a gondolat, hogy a szinapszis másik oldalán, a posztszinaptikus membránban szintén jelen lévő Na^+-K^+-aktiválta ATPáz /Na-pumpa/ aktivitását milyen mértékben befolyásolja az extracelluláris calcium.

Megvizsgáltuk a posztszinaptikus membrán pumpa aktivitását Ca-hiányban "sucrose-gap" technika segitségével. Ez a kérdés

akkor látszik különösen fontosnak, ha figyelembe vesszük, hogy mind a neuro-neuronális, mind a neuro-effektoriális szinapszisban az extracelluláris Ca^{2+}-nak fontos szerepe van a transzmitter anyag hatásának kialakulásában is.

Izolált taenia-coli preparátumon az adrenalin elektrofiziológiai hatásai Ca-függőnek bizonyultak /59. ábra/. Ca-mentes Krebs oldatban /0.1 mM EGTA jelenlétében/ tartva a preparátumot egy átemeneti fokozódás után a tüske tevékenység teljesen megszünik. Ilyen körülmények között a membrán rezisztencia csökken /BÜLBRING és TOMITA, 197o/, a membrán depolarizá-



59. ábra

Ca-mentes /+0.1 mM EGTA/ Krebs oldat hatása tengeri malac taenia coli preparátumának nyugalmi potenciáljára, tüske tevékenységére és mechanikus aktivitására, valamint az adrenalin hatásaira. "Sucrose-gap" technika. Figyeld meg: Ca-mentes közeg a membránt depolarizálja, a tüske tevékenységet egy átmeneti frekvencia fokozódás után megszünteti, az izmot elernyeszti és az adrenalin hatását meggátolja.

lódik /5.6 ± 0.5 mV/ és a szövet mechanikus tónusa megszünik. Ezen membrán jelenség valószinüleg a REUTER és SEITZ /1968/, valamint REUTER és mtsai /1973/ által sziven és simaizmon kimutatott Ca:Na kicserélődési mechanizmusra vezethető vissza: az intracelluláris Ca effluxa Na^+ belépéssel kapcsolatos. Ezt látszik alátámasztani az a kisérleti adatunk is, miszerint Ca-mentes közegben a szövet intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja 1.77 m-mole/kg nedves sulyról 0.4 m-mole/kg nedves sulyra csökken a három órás terhelési periódus során, akkor amikor az intracelluláris Na^+ koncentrációja megemelkedik. Kisérleteinkben a FLECKENSTEIN és mtsai /1971/ által leirt D-6oo /Verapamil analóg/, amely a Ca^{2+}-t megköti $2x10^{-5}$M koncentrációban szintén gátolta az adrenalin hiperpolarizáló hatását.

Ezek a kisérletek arra utalnak, hogy a Ca-influx és az általa létrehozott membrán ATPáz gátlás kulcs szerepet játszik a membrán nyugalmi potenciáljának befolyásolhatóságában.

Az intracelluláris Ca^{2+} szerepe a Na-pumpa müködésében.

A legtöbb biológiai szövetben a Ca^{2+} kifelé irányuló transzportja energia igényes folyamat, mivel az elektrokémiai grádienssel szemben történik. SCHATZMANN és VINCENZI, /1969/ kimutatták, hogy a vörösvérsejtek ATP hidrolizise és kalcium transzportja között összefüggés áll fenn. Szivizmon /REUTER és SEITZ,1968;

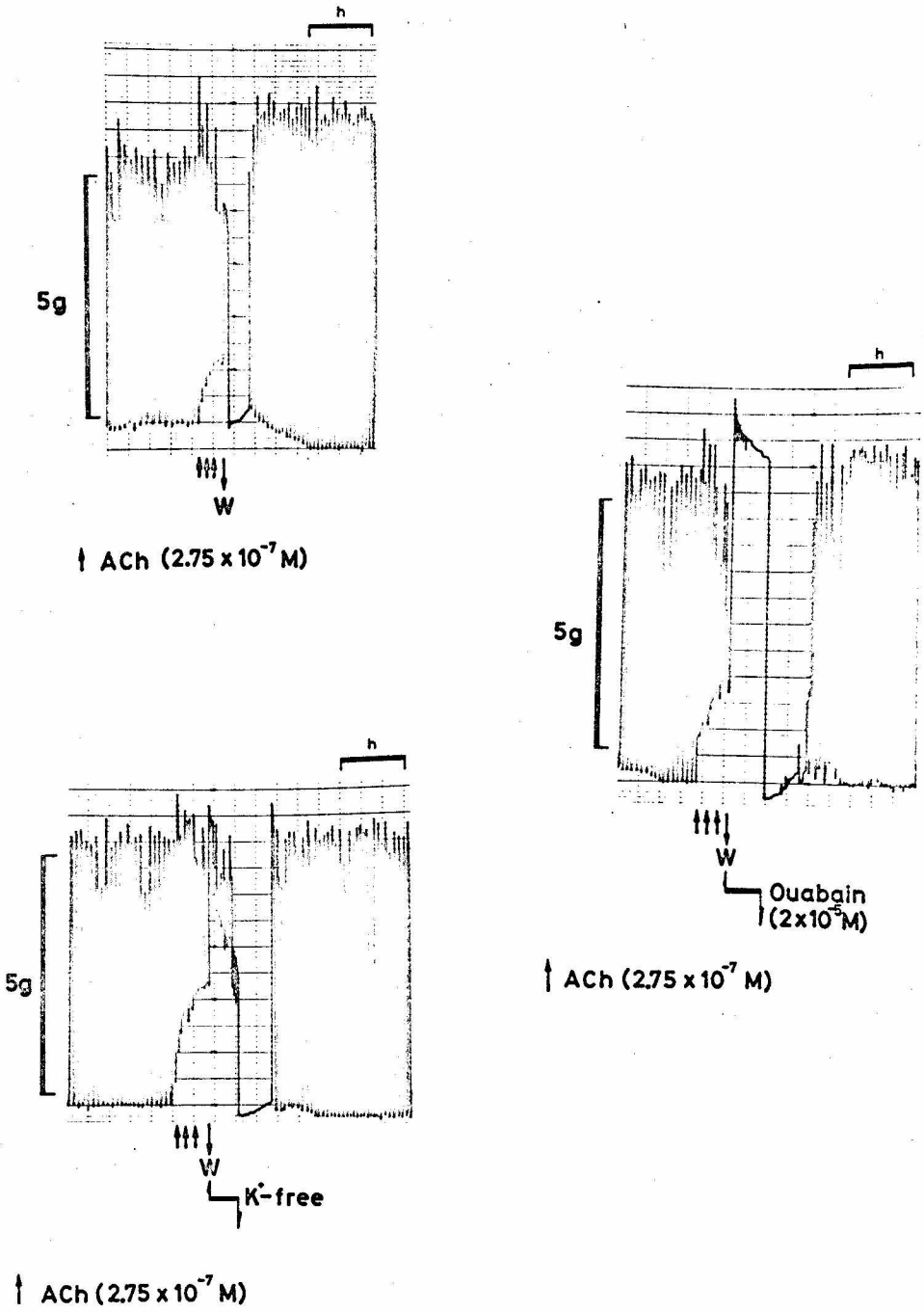
GLITSCH és mtsai, 197o/ tintahal óriás axonon BAKER és mtsai, 1969; BLAUSTEIN és HODGKIN, 1969; DI POLO, 1973/ és más ingerelhető szövetben /l. BAKER, 1972/ a Ca-efflux legfőbb energia forrása a Na^+ koncentráció grádiensétől származik. A sejtekben lévő rendkivül alacsony intracelluláris Ca^{2+} koncentráció regulációja mégsem a membránon keresztül történik, hanem ezt a feladatot az intracelluláris raktárak /mitkondrium, szarkoplazmatikus retikulum/ töltik be. Igy pl. a Ca^{2+} felszabadulása a mitokondriumból az axoplazmába CN^- adása után, megemeli a Na- és Ca-függő Ca-effluxot /BLAUSTEIN és HODGKIN, 1969/. JUNDT és mtsai, /1975/ szivizmon kimutatták, hogy CN^-, valamint 537 A fokozza izolált mitkondriumból a Ca^{2+} kilépést, és bebizonyitották, hogy az extracelluláris Na^+ fontos szerepet játszik a Na:Ca cserében. Ez a mechanizmus biztositani tudja az alacsony intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt abban az esetben, ha a mitokondriumból Ca^{2+} szabadulva fel. Igy feltételezhető, hogy az intracelluláris Ca^{2+} is éppen a Ca:Na csere révén a bazális membránon belülről kifele haladva is gátolhatja a Na-pumpát.

A külső Ca^{2+} megvonása és EGTA /0.1 mM/ adásánál /58. ábra/ jelentkező nyugalmi potenciál csökkenést viszont ugy magyarázzuk, hogy a belülről kifelé haladó Ca^{2+} gátolná a membrán ATPáz aktivitását. Ez természetesen az intracelluláris kalcium csökkenéséhez vezet az idő függvényében. A Ca-megvonás után jelentkező átmeneti tüske aktivitás fokozódás ill. depolarizáció valószinüleg a membrán ATPáz gátlás eredménye. Felmerül azonban

egy olyan lehetőség is, hogy a fokozott Na:Ca csere miatt az intracelluláris Na^+ felszaporodás lenne az oka ezeknek a jelenségeknek. Ez kizárható azzal az egyszerü megfontolással, hogy a csere aránya 2:1. Igy az 1.8 mM intracelluláris Ca^{2+} helyére maximálisan 3.6 mM Na^+ léphet be, és ez nem okoz jelentős változást a nyugalmi potenciálban. Ez a folyamat ráadásul még idő igényes is. A Ca-megvonása után viszont azonnal jelentkezik a depolarizáció. Igy ez feltételezhetően a membránon belülről kifelé haladó Ca^{2+} membrán ATPázt gátló hatásával lehet összefüggésben.

A Na-pumpa szerepe a simaizom effektor sejtek mechanikus müködésében.

A továbbiakban választ kivántunk kapni arra a kérdésre, hogy a transzmitter posztszinaptikus /receptoriális/ hatásában milyen szerepe van az elektrogén Na-pumpa müködésének. A kolinerg transzmitter anyag az ACh hatása alatt az intracelluláris Na^+ koncentráció az effektor sejtekben megemelkedik és ha most az ACh-t kimossuk a preparátum relaxálódik és csak egy átmeneti nyugalmi periódus után tér vissza a szövet spontán aktivitása /6o. ábra/. BOLTON /1971/ tengeri malac ileum hosszanti simaizom preparátumán az ACh kimosását követően a szövet hiperpolarizációját észlelte. Sucrose-gap technikával kisérleteinkben hasonló membrán választ tapasztaltunk Carbachol kimosását követően /VIZI és TÖRÖK,nem közölt adat/. Mivel az ACh kimosása után észlelt izom relaxáció K--mentes oldattal /6o.ábra/, valamint ouabainnal /6o. ábra/



6o. ábra

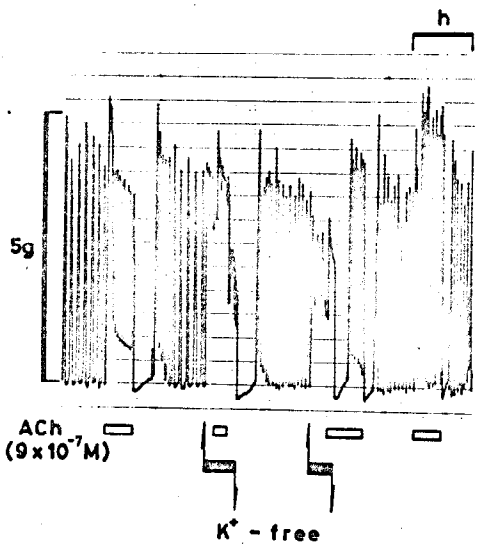
/a/ Exogén ACh kontrakciót okozó hatása tengeri malac taenia colin. Figyeld meg: a transzmitter kimosása után az izom aktivitás csak egy átmeneti nyugalmi periódus után tér vissza.

/b/ Exogén ACh kimosása utáni izomrelaxáció K^+-mentes Krebs oldatban nem jön létre.

/c/ Exogén ACh kimosása utáni izomrelaxációt ouabain gátolja.

Krebs oldat. 37°C. 95 % O_2 + 5 % CO_2. Izometriás regisztrálás.

gátolható volt, ezért kézenfekvőnek látszik feltételznünk az elektrogén Na-pumpa oki szerepét a fenti membrán válaszban. Az ACh depolarizációt és ennek eredményeként kontrakciót okozó hatása valószinüleg kapcsolatban van a membrán ATPáz enzim aktivitásával. Az antagonista hatására fokozódik



61. ábra

Exogén ACh hatása: normál,
K-mentes és
K-mentes közeg után normál K-ra cserélt Krebs oldatban. Figyeld meg: a visszaadott K^+ izomrelaxáló hatását az ACh nem gátolja meg. Egyébként lásd 59. ábra.

a Ca^{2+} belépés és ez, ha átmenetileg is, de a membrán ATPáz gátlását váltja ki. Az antagonista kimosása után az enzim felszabadul a gátlás alól és a pumpa fokozott aktivitása hiperpolarizációban mutatkozik meg.

A 61. ábra mutatja, hogy a membrán ATPáz gátlása illetőleg fokozott aktivitása milyen hatással van az ACh posztszinaptikus hatására. K-mentes Krebs oldatban tartott taenia coli preparátum megemelkedett tónusát a hozzáadott ACh /9x10^{-7}M/ tovább fokozta. Ha a pumpa aktivitását fokoztuk 5.9 mM K^+ hozzáadásával az ACh jellegzetes kontrakciót és spontán aktivitást fokozó hatásai nem jöttek létre: az izom relaxálódott. A visszaadott K^+ membrán ATPázt izgató hatása is azonban csak addig tart, amig az ionális egyensuly kialakul. Kisérletünkben is a visszaadott K^+ ACh hatást gátló hatása is csak 15-35 percig tartott. Utána a simaizom megint érzékeny lett az ACh iránt /61. ábra/.

Ezek a kisérletek arra utalnak, hogy az effektor sejtek érzékenysége lecsökken, ha a membrán ATPáz aktivitása fokozódik. BOSE és INNES /1972/ macska lép kapszula simaizmán hasonló jelenséget észlelt NA-al szemben.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a neurokémiai transzmisszió hatásossága modulálódik pre- és posztszinaptikus szinten. Egyfelől a transzmitter felszabadulás sebessége, másrészt az effektor sejt érzékenysége csökken le a membrán ATPáz aktivitás fokozódása esetén. Kisérleteinkben a Na-pumpa aktivitás fokozódása gátolta az ACh és a magas K^+ hatását a simaizmon. A deszenzibilizálódás is valószinüleg erre a mechanizmusra vezethető vissza. Az antagonista adása után Ca^{2+} és Na^+ belépés

fokozódik. A belépő Ca^{2+} gátolja a membrán ATPázt, amely viszont megint az intracelluláris Na^{+} koncentráció emelkedéséhez vezet. Az enzim felszabadulva a Ca^{2+} gátlás alól és az intracellulárisan megszaporodott Na^{+} egyaránt az enzim, a Na-pumpa fokozott aktivitásához vezet. Ezen átmeneti periódus alatt az effektor sejt érzéketlen a transzmitter iránt /általános deszenzibilizálódás/.

6.2.2.2. Harántcsikolt izom

A Na-pumpa elektrogén jellegét ezen az izom félességen KERNAN már 1962-ben felvetette. K-mentes oldatban tartott izmon kimutatta, hogy K visszaadására a membrán potenciál 11 mV-al negativabb mint a számitott E_K. KEYNES és RYBOVA /1963/ általánosságban megerősitették KERNAN eredményeit. Véleményünk szerint a Na^{+} kihajtás és K^{+} felvétel közötti kuplung arány változó.

Ezt követően számos publikáció jelent meg, amelyek Na-terhelt szövetből való Na^{+} vesztést elektrogén természetünek tartottak /ADRIAN és SLAYMAN, 1966; CROSS és mtsai, 1965/.

ADRIAN és SLAYMAN /1966/ K^{+} depletált szövet Na vesztésének vizsgálatakor azt találták, hogy K^{+} visszaadása esetén az észlelt hiperpolarizáció kisebb, mint Rb^{+} akkumulációkor, jóllehet a két ion diffuziós konstansa hasonló. Ez is alátámasztja az elektrogén Na-pumpa müködésének lehetőségét.