

SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

A NYOMELEMEK SZEREPE ÉS LOKALIZÁCIÓJA PATKÁNY HIPPOCAMPUSÁBAN

Doktori értekezés

Készítette: Szerdahelyi Péter



Készült: SZOTE KÖZPONTI KUTATÓLABORATÓRIUM
1982.

B 5090



E 2.171

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS, IRODALMI ELŐZMÉNYEK	
1.1. A nyomelemek általános szerepe és funkciója a központi idegrendszerben	1
1.2. A hippocampus szerkezete és működése	3
1.3. A nyomelemek lokalizációja a hippocampusban	7
1.4. A hippocampus neurotranszmitterei és lokalizációjuk	9
1.5. Célkitűzések	12
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	13
2.1. Felhasznált anyagok	13
2.2. Az állatok kezelése	13
2.2.1. Krónikus cinkhiány előidézése	13
2.2.2. Műtéti beavatkozások	14
2.3. Hisztokémiai vizsgálatok	16
2.3.1. A nyomelemek hisztokémiai demonstrálása	16
2.3.2. Az AChE aktivitás fénymikroszkópos lokalizációja	17
2.3.3. Az axonális degeneráció fénymikroszkópos kimutatása	18
2.4. Biokémiai vizsgálatok	19
2.4.1. Idegszöveti minták AAS mérésre történő előkészítése	19
2.4.2. Szubcelluláris frakcionálás és a minták AAS mérésre történő előkészítése	19
2.4.3. Az AAS mérések kivitelezése, paramétere	20
2.4.4. A CAT aktivitás radiokémiai mérése	21
2.4.5. Az AChE aktivitás spektrofotometriás meghatározása	22
2.4.6. Biometriai számítások	23
3. EREDMÉNYEK	23
3.1. A nyomelemek normál szöveti lokalizációja a hippocampusban	23
3.2. A cink és réz differenciált hisztokémiai kimutatása a hippocampusban	25
3.3. A nyomelemek strukturális lokalizációja és mennyiségük változása normál hippocampusban az ontogenetikus fejlődése folyamán	27

3.4.	Krónikus cinkhiány hatása a hippocampális nyomelemszintre és szubcelluláris megoszlására, valamint a CAT és AChE aktivitásra	30
3.4.1.	A nyomelemek fénymikroszkópos lokalizációja	31
3.4.2.	Atomabszorpciós spektrofotometriás vizsgálatok	33
3.4.3.	A kolinerg rendszer enzimjeinek vizsgálata	35
3.5.	A fimbria átmetszését követő nyomelemszint változások a hippocampusban	38
3.6.	Kémiai anyagok intracerebrális alkalmazása során bekövetkező nyomelemszint változások a hippocampusban	42
3.6.1.	6-OHDA kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére	42
3.6.2.	Kainsav kezelés hatása a hippocampális nyomelemszintre	45
3.6.3.	Kolhicin kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére	47
4.	MEGBESZÉLÉS	
4.1.	A nyomelemek normál szöveti lokalizációja a hippocampusban	49
4.2.	A cink és réz differenciált hisztokémiai kimutatása a hippocampusban	49
4.3.	A nyomelemek strukturális lokalizációja és mennyiségük változása normál hippocampusban az ontogenetikus fejlődés folyamán	50
4.4.	Krónikus cinkhiány hatása a hippocampális nyomelemszintre és szubcelluláris megoszlására, valamint a CAT és AChE aktivitásra	56
4.5.	A fimbria átmetszésének hatása a hippocampus nyomelemszintjére	59
4.6.	Kémiai anyagok intracerebrális alkalmazása során bekövetkező nyomelemszint változások a hippocampusban	60
4.6.1.	6-OHDA kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére	61
4.6.2.	Kainsav kezelés hatása a hippocampális nyomelemszintre	62
4.6.3.	Kolhicin kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére	64
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	67
6.	IRODALOMJEGYZÉK	69

RÖVIDÍTÉSEK

AAS	atomabszorpciós spektrofotometria
ACh	acetilkolin
AChE	acetilkolin-észteráz
ACoA	acetyl-koenzim A
ASP	aszpartát
AThChI	acetiltiokolin-jodid
ATP	adenozin-trifoszfát
CAT	kolinacetyl-transzferáz
DA	dopamin
DBH	dopamin- β -hidroxiláz
GABA	γ -aminovajsav
GAD	glutaminsav-dekarboxiláz
GLU	glutamát
5-HT	5-hidroxitriptamin (szerotonin)
HA	hisztamin
KA	kainsav
MAO	monoamin-oxidáz
NA	noradrenalin
str.	stratum
6-OHDA	6-hidroxidopamin
TAU	taurin
TCA	triklórecetsav
tf.	térfogat

1. BEVEZETÉS, IRODALMI ELŐZMÉNYEK

1.1. A nyomelemek általános szerepe és funkciója a központi idegrendszerben

Az élő szervezet által nélkülözhetetlen elemek között különleges helyet foglalnak el az esszenciális mikroelemek, más néven a nyomelemek. Korábban -- a vas és a jód kivételével -- a nyomelemeknek nem tulajdonítottak élettani szerepet. Csak századunk első évtizedeitől kezdve vált fokozatosan világossá, hogy a nyomelemek élő szervezettől való megvonása jellegzetes tünetekkel járó hiánybetegségeket idéz elő, ami különböző biokémiai folyamatok zavarára utal.

A nemfémes nyomelemek biokémiai szerepéről -- a jód kivételével -- nem sokat tudunk, s kutatásuk csak az utóbbi két évtizedben élénkült meg. A fémes nyomelekekről (a következőkben "nyomelemek") viszont kiderült, hogy a biológiai folyamatokban szerepet játszó fémionok a szerves makromolekulákkal (elsősorban a fehérjékkel) kölcsönhatásba lépve különböző térszerkezetű és stabilitású komplexet képeznek, s ennek a kölcsönhatásnak a természete (reverzibilis vagy irreverzibilis volta) alapvető a biológiai rendszer működése szempontjából.

Az enzimeknek kb. 30%-a esszenciális nyomelemként fémiont tartalmaz, ami részt vesz az enzim felépítésében (metalloenzim), vagy zavartalan működésében (mint aktivátor). A cink és a mangán elsősorban az izomerizációs és hidrolitikus reakciókat, a vas és a réz pedig a redoxi-

folyamatokat katalizáló enzimek felépítésében vesz részt. Az enzimekben erősen kötött állapotban található meg, és nem, vagy csak lassan cserélődnek ki a környezetükben levő szabad ionokkal.

A nyomelemek központi idegrendszerben és annak biokémiai folyamataiban betöltött szerepének tisztázása csak az utóbbi évtizedekben került a kutatások homlokterébe. Bebizonyosodott, hogy a cink hiánya az agyi fehérjeszintézisben és az esszenciális zsírsavak metabolizmusában okoz zavart (Fosmire és mtsai., 1975; Cunnane és Horrobin, 1980), de az idegszöveti membránok destabilizálásával különböző neurológiai rendellenességeket is előidéz (Henkin és mtsai., 1975). Rézhiányban elsősorban a katekolaminszintek nagymérvű csökkenésével magyarázzák a kísérő neurológiai diszfunkciók jelentkezését (Morgan és O'Dell, 1977; Feller és O'Dell, 1980), bár az oxidatív enzimekre gyakorolt hatása sem elhanyagolható (Prohaska és Wells, 1975). A krónikus mangánmérgezés és a Parkinson kór szimptomáinak hasonlósága vezetett el a mangán biogén aminosavak metabolizmusában betöltött szerepének tisztázásához (Papavasiliou és mtsai., 1968). A vas az oxidatív enzimek felépítésén kívül valószínűleg részt vesz a szerotonin-kötő fehérje felépítésében is (Tamir és mtsai., 1976) és hiánya hatással van a katekolamin-függő enzimek aktivitására is (Quik és Sourkes, 1977).

Vizsgálatainkban a cink, vas, réz és mangán hipocampális lokalizációját és szerepét igyekeztünk felderíteni,

hisztokémiai és biokémiai módszerek segítségével. Tisztázni próbáltuk a nyomelemek főbb hippocampális neurotranszmitterekkel való funkcionális kapcsolatát is.

1.2. A hippocampus szerkezete és működése

A hippocampus archicortikális struktúra, ami a szomszédos fascia dentatával szorosan összekapcsolódva a limbikus rendszer fontos tagját alkotja. Szerkezete lamináris elrendeződésű, s ez a hippocampust különösen alkalmassá teszi a neurotranszmitterek vagy markerjeik, továbbá a nyomelemek topográfiai és hisztokémiai tanulmányozására.

A hippocampus szerkezeti felosztásában kétféle terminológia használatos (1.Ábra). Az egyik CA (=cornu ammonis) 1-4 régiókat különböztet meg (Lorente de Nó, 1934), míg a másik a régió superior (durván a CA1 régió) és a régió inferior (CA2 és 3) felosztást használja (Cajal, 1911).

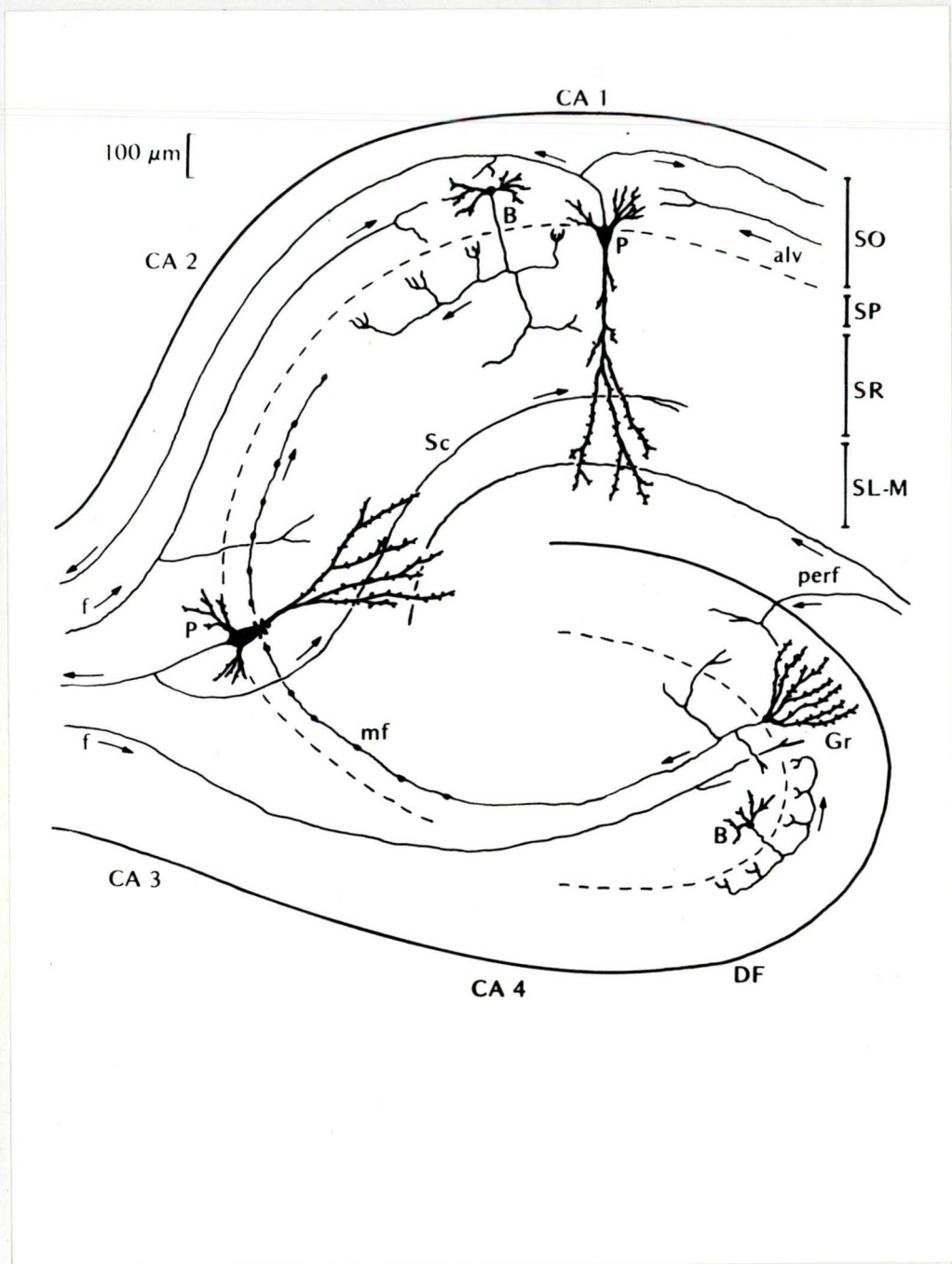
A hippocampus rétegei a következők: 1. alveus, 2. stratum oriens, 3. stratum pyramidale, 4. stratum radiatum, 5. stratum lacunosum, 6. stratum moleculare (ennek külső, középső és belső rétegét különböztetjük meg), 7. stratum granulare, 8. stratum polymorphe (hilus).

Fő sejttípusai, a piramis-, a szemcse- és a kosársejtek a hippocampus egész kiterjedésében külön rétegekben helyezkednek el. Kivételt képez a subiculum, ahol a piramis- és a szemcsejtek szómái heterogén elrendeződésűek. A hippocampus és a fascia dentata legfontosabb sejttípusai és

azok főbb neuronális kapcsolatai láthatók az 1. ábrán, Shepherd (1974) nyomán.

A hippocampus entorhinális cortex felől érkező afferensei két pályán át lépnek be a hippocampális formációba. A perforáns rostok a subiculumon 'en route' haladnak keresztül, majd a CA1 régión áthaladva, a CA3 régió piramissejtjeinek apikális dendritjein a dendrittüskékkel axodendritikus szinapsziszokat alkotnak (Hjorth-Simonsen és Jeune, 1972). A másik entorhinális afferens, az alveoláris pálya a ventrikuláris felszínen (alveuson) áthaladva a CA1 régió piramissejtjeivel szintén axodendritikusan szinaptizál. A fascia dentata entorhinális afferense a szemcsesejtek dendritjein axodendritikus szinapszist alkot (Laatsch és Cowan, 1966). A hippocampus további fontos afferensei a fornixon, ill. a fimbrián át a septum mediális magja felől érkeznek és a str. oriensben ill. az area dentata hilusában a piramissejtek ill. a szemcsesejtek dendrittüskéivel szinaptizálnak.

Az interhippocampális kapcsolatot jelentő un. commissurális pályák szintén fontos afferensei a hippocampális formációnak. Az ellenkező oldali hippocampus CA3 régió piramissejtjeiből kiinduló kollaterálisok a CA1 és CA3 régiók str. radiatumában ill. str. oriensében végződnek. A másik típusú commissurális afferens az ellentétes oldali hilus fasciae dentatae sejtjeiből ered, s a fascia dentata molekuláris rétegének belső harmadában végződik. Mindkét pálya a fimbrián ill. a ventrális psalteriumon át lép be a hippocampusba (Raisman és mtsai., 1965; Laurberg és Sørensen, 1981).



1.Ábra: Összefoglaló sémás rajz a hippocampus és a fascia dentata fontosabb idegelemeinek neuronális kapcsolatairól (Shepherd, 1974 nyomán).
P: piramissejt, Gr: szemcsesejt, B: kosársejt, mf: moharost, alv: alveoláris pálya, perf: perforáns pálya, Sc: Schaffer kollaterális, SO: str. oriens, SP: str. pyramidale, SR: str. radiatum, SL-M: str. lacunosum-moleculare, DF: fascia dentata.

Fontos intrahippocampális kapcsolatot jelentenek az un. asszociációs pályák, amelyek az azonos oldali hippocampus CA3 régió piramiseltjeiből erednek, és a str. radiatumban, valamint a str. oriensben (CA1 és CA3 régiókban) végződnek. A hilus neuronjaiból kiinduló asszociációs rostok viszont a molekuláris réteg belső harmadában végződnek. A hippocampális formáció legfontosabb belső összeköttetését a szemcsesejtek axonjai, az un. moharostok biztosítják. A moharostterminálisok ugyanis a régió inferior egyszerre több piramiseltjének proximális dendritfáin és tuskéin hoznak létre nagy kiterjedésű szinapszisokat (Blackstad és Kjaerheim, 1961; Amaral, 1978). A Schaffer féle kollaterális a régió inferior piramiseltjeiből ered, és a régió superior str. radiatumban a piramiseltjek dendritjeivel axodendritikusan szinaptizálódnak.

A hippocampus mindegyik régiójában a piramiseltjek és a szemcsesejtek axonjai a kosársejtek dendritjeivel szinaptizálódnak. Ugyanakkor a kosársejtek axonjai a piramiseltjek ill. a szemcsesejtek szómáján axoszomatikus szinaptikus kapcsolatot hoznak létre és ezáltal posztzinaptikus gátlást fejtenek ki (Ribak és Anderson, 1980).

A hippocampális formáció efferensei egyrészt az anterior hypothalamikus magok, a mediális hypothalamus és a corpus mammillare felé irányulnak, s ezen projekciók a subiculum különböző részeiből erednek (Swanson és Cowan, 1977). A CA1-3 régiók piramiseltjei rostrális projekciót küldenek a nuclei septii laterale-ba és a septum hátsó

részébe is. A CA1 régió temporális részéből a stria terminális, a nucleus accumbens, a nucleus olfactorius anterior, a taenia tecta és az infralimbikus area felé irányulnak projekciók. A CA1-3 régiók a subiculum, az entorhinális, a perirhinális és a retrospleniális cortex, továbbá a gyrus cinguli felé tendáló efferensei szintén igen jelentősek.

1.3. A nyomelemek lokalizációja a hippocampusban

Maske (1955), Fleischhauer és Horstmann (1957) figyelték meg először, hogy a hippocampus ditizonnal intenzív szinreakciót ad, ami a struktúra magas cinktartalmára utal. Autoradiográfiás (von Euler, 1962), hisztokémiai (McLardy, 1962, 1964; Haug, 1973; Frederickson és mtsai., 1981) és kvantitatív, atomabszorpciós spektrofotometriás (AAS) (Hu és Friede, 1967; Crawford és Connor, 1972; Fjerdingsstad és mtsai., 1974; Danscher és mtsai., 1976), valamint röntgenemissziós spektroszkópiás (Kemp és Danscher, 1979) vizsgálatok nagy száma bizonyítja, hogy a hippocampális formáció, azon belül is az area dentata moharostrendszer, valamennyi más agyterületnél szignifikánsan magasabb mennyiségű nyomelemet, különösen cinket tartalmaz. Elektronmikroszkópos hisztokémiai kutatások (Haug, 1967; Ibata és Otsuka, 1968; Kozma és mtsai., 1978) azt mutatják, hogy a cink jelenléte elsősorban a moharost terminálisok szinaptikus vezikuláival kapcsolatos. Nem eldöntött azonban, hogy a cink a vezikulák belsejében, vagy azok külső felszínén lokalizá-

lódik-e. Jelentős mennyiségű nyomelem lokalizálható ultrastrukturálisan a hippocampus piramis- és szemcsesejtjeinek szómájában, valamint intralizoszomálisan (Brun és Brunk, 1970; Kozma és mtsai., 1978).

Számos fiziológiai kísérlet valószínűsíti, hogy a cink részt vesz a moharost terminálisok transzmissziós folyamatában (von Euler, 1962; McLardy, 1970a,b; Crawford és mtsai., 1973; Hesse, 1979).

Széleskörű kutatások folytak (és folynak ma is) annak eldöntésére, hogy a hippocampus magas nehézfém-, különösen pedig extrém magas cinktartalmát mi indokolja: kapcsolatba hozható-e az különböző metalloenzimek (szénsav-anhidráz, alkalikus foszfatáz, glutamát-dehidrogenáz és más dehidrogenázok) regionális eloszlásával (McLardy, 1962; Parisi és Vallee, 1969; Mellgren és mtsai., 1977), továbbá különböző hippocampális transzmitterek pl. acetilkolin (ACh), γ -aminovajsav (GABA), biogén aminok szintetizáló vagy bontó enzimjeinek (kolinacetil-transzferáz, CAT; acetilkolin-észteráz, AChE; glutaminsav-dekarboxiláz, GAD; monoamin-oxidáz, MAO; stb) topográfiai elrendeződésével (Pohle és Matthies, 1970; Fonnum, 1970; Meyer és mtsai., 1971; Storm-Mathisen és Fonnum, 1971; Ferke és mtsai., 1978), esetleg az enkefalinok hippocampális eloszlásával (Stengaard-Pedersen és mtsai., 1981)?

Felmerül annak a lehetősége is, hogy a cink -- mint a citoskeletális fehérjék, elsősorban a tubulin fő subunit proteinjének fontos alkotórésze -- a hippocampus moharost

terminálisaiban elsődlegesen membránstabilizáló funkciót lát el (Chvapil, 1976; Kress és mtsai., 1981; Bettger és O'Dell, 1981).

1.4. A hippocampus neurotranszmitterei és lokalizációjuk

Kolinerg rendszer

A hippocampus fő kolinerg afferensei a mediális septális magból erednek és közvetlenül a régió inferior piramissejtjei alatt és felett, az area dentata hilusában, valamint a str. oriensben végződnek (Lewis és Shute, 1967; Mosko és mtsai., 1973). Fonnum (1970) biokémiai és Kása (1978) enzimhisztokémiai vizsgálatai szerint a hippocampus infrapiramidális rétege, valamint az area dentata szupragranuláris rétege és a hilus fasciae dentatae rendelkezik a legnagyobb CAT aktivitással. Jelentős azonban a str. oriens és a str. pyramidale CAT aktivitása is. Érdemes megemlíteni, hogy a CAT aktivitás topográfiai elrendeződése a hippocampusban egybeesik az AChE aktivitásával.

CAT pozitív neuront sem a hippocampusban, sem az area dentata-ban nem sikerült kimutatni (Kása, 1978). Így a septohippocampális kolinerg rostok csak a kolinoczeptív piramissejtekkel, a Golgi II típusú sejtekkel, és a szemcse-sejtekkel szinaptizálhatnak.

Aminerg rendszerek

A hippocampális formáció noradrenerg innervációja a locus coeruleusból indul ki (Segal és Bloom, 1974; Swanson és Hartman, 1975) és rostrálisan a mediális előagyi kötegen át, ventrálisan a piriform és az entorhinális cortexen keresztül lép be a hippocampusba (Lindvall és Björklund, 1978). A legtöbb noradrenerg axonterminális az area dentata hilusában, a szupra- és infrapiramidális rétegben, a CA3 régióban és a subiculum molekuláris rétegében található a hippocampális formáción belül (Loy és mtsai., 1980).

A hippocampus dopaminerg innervációja kevésbé ismert és feltérképezett. Ennek elsődleges oka az, hogy az hippocampus endogén dopaminszintje (DA) rendkívül alacsony más agyterületekhez viszonyítva (Browstein és mtsai., 1974). Ujabban Scatton és mtsai. (1980) kutatásai bizonyították, hogy a hippocampális formáció dopaminerg afferensei a substantia nigrából (A9 sejtcsoport) és a ventrális tegmentális areából (A10 sejtcsoport) erednek és a dorsális kötegen áthaladva a fimbrián át lépnek be a hippocampusba. A DA-erg terminálisok pontos lokalizációja még nem ismertes a strukturán belül.

Jelentős viszont a hippocampus szerootonin (5-hidroxi-triptamin, 5-HT) innervációja, amely a közepagyai raphe magokból ered és két pályán át lép be a hippocampusba: egyrészt a dorsális kötegen át (cingulum - fornix - fimbria), másrészt ventrálisan, az amygdalán és az ento-

rhinális cortexen áthaladva (Storm-Mathisen és Guldberg, 1974; Moore és Halaris, 1975). Az 5-HT terminálisok a hippocampusban elsősorban a CA1 régió str. lacunosum-moleculare-ban, valamint a str. radiatumban találhatók; (a CA2 és CA3 régió hasonló rétegeiben kisebb számban fordulnak elő). Az area dentata hilusában, az infragranuláris rétegben viszont rendkívül nagy számban lokalizálhatók 5-HT terminálisok (Moore és Halaris, 1975).

A hippocampális formáció minden részében (régió superior, régió inferior, area dentata) jelentős a hisztaminerg (HA) idegvégződések száma, legmagasabb azonban a subiculumban (Schwartz és mtsai., 1976). A HA afferensek döntő többsége dorsálisan, a mediális előagyi kötegen áthaladva, tehát a fimbrián keresztül lép be a hippocampusba; kisebb részük viszont ventrálisan.

Aminoaciderg rendszer

Hisztokémiai (Storm-Mathisen és Fonnum, 1971), biokémiai (Storm-Mathisen, 1972) és immuncitokémiai (Ribak és mtsai., 1978) vizsgálatok bizonyítják, hogy a GAD, a GABA szintetizáló enzimje, a hippocampus belső neuronjaiban, a kosársejtekben lokalizálható, következésképpen a GABA a kosársejtek gátló transzmitter anyaga.

A Schaffer kollaterális és a perforáns pálya ingerlő transzmittere a glutamát (GLU), míg a commissurális és asszociációs rostok putatív transzmitter anyaga a GLU vagy aszpartát (ASP) (Fonnum és mtsai., 1980; Nitsch és mtsai., 1980).

Egyéb transzmitter rendszerek

Ujabban, immunhisztokémiai és radioimmunológiai módszereket alkalmazva kolecisztokinint (Handelmann és mtsai., 1981; Greenwood és mtsai., 1981) és enkefalint (Stengaard-Pedersen és mtsai., 1981) tartalmazó axonterminálisokat is leírtak a hippocampális formációban.

1.5. Célkitűzések

A fenti irodalmi adatok birtokában további kísérleteket végeztünk, hogy pontosítsuk a cink és más hisztokémiai-
lag demonstrálható nehézfémek (Fe, Cu, Mn) hippocampuson
belüli lokalizációját és tisztázzuk a neuronális folyamat-
ban betöltött szerepét.

Munkánkban a következő feladatok megvalósítását tűztük ki célul:

- 1./ Demonstrálni a normál hippocampus nyomelemeinek szöveti lokalizációját, továbbá a cink és réz differenciált hisztokémiai demonstrálására új módszert kidolgozni,
- 2./ megvizsgálni a cink és más nehézfémek hippocampális szintjének normál ontogenetikus változását, s adatainkat korrelálni a hippocampus magas nyomelemtartalmú neuronális elemeinek morfológiai érésére ill. a transzmitter rendszerek ontogenetikus fejlődésére vonatkozó adatokkal,
- 3./ vizsgálni a krónikus cinkhiány hatását a hippocampális cinktartalomra és annak szubcelluláris eloszlására, továbbá a kolinerg rendszer enzimeinek aktivitására,

4./ a septális deafferentálás és a kémiai léziók hippocampális nyomelemszintre kifejtett hatását hisztokémiai és atomabszorpciós vizsgálatokkal demonstrálni. Ennek alapján megvizsgálni, hogy a hippocampális cinktartalom milyen transzmitterrel mediáló idegvégződésekkel hozható összefüggésbe.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Felhasznált anyagok

A kísérleteinkhez használt CFY törzsű fehérpatkányok hippocampusát altatás nélküli dekapitálást követően távolítottuk el.

A hippocampális nehézfémek szintjének ontogenetikus fejlődés során bekövetkező változását vizsgálva embrionális 17 és 19 napos, továbbá a posztnatális 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 40, 70 és 100 napos korban vettük ki az állatok hippocampusát.

Valamennyi korcsoportot 4-10 szövetmintával reprezentáltuk.

A triklórecetsav (TCA) nyomelemkioldó hatásának vizsgálata céljából a hippocampuson kívül a neocortexet és a kisagyat is kivettük az állatokból.

2.2. Az állatok kezelése

2.2.1. Krónikus cinkhiány előidézése

11, 21 és 30 napos mindkét nembeli CFY törzsű fehér-

patkányokon végeztük kísérleteinket. A kontroll csoport 55.90 µg/g száraz súly cinket tartalmazó normál patkánytápot (Lati, Gödöllő) és csapvizet kapott ad libitum. A kísérletes cinkhiányt az állatok másik csoportjának cinkszegény (7.40 µg/g száraz súly cinket tartalmazó) patkánytápon (ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland) tartásával idéztük elő. Ez utóbbi csoport cinkmentes ivóvizet kapott, amelyben az egyéb kationok koncentrációja közel azonos volt a csapvizével. Az anyák ilyen diétán szoptatták utódaikat, s azok az önálló táplálkozás megkezdésétől ugyanezen a diétán éltek tovább. A cinkhiányos étrendre fogott állatokat műanyag ketrecekben tartottuk.

2.2.2. Műtéti beavatkozások

Sebészeti módszerek

A hippocampus septális afferentációjának megszüntetése céljából felnőtt, him CFY fehérpatkányokon (180-200 g) Nembutal^R (Abott S.A.) (54 mg/kg i.p.) altatás alatt műtétilag unilaterálisan teljes szélességben átmetszettük a fimbriát. 1 ill. 7 nap túlélési idő után vizsgáltuk a fimbria transzsekcio hatását a hippocampus kolinerg enzimjeinek (AChE, CAT) aktivitására, a nyomelemszintekre és a nyomelem festődésre.

Kémiai anyagokkal történő kezelések

6-hidroxidopamin.HBr (6-OHDA.HBr) intracerebroventrikuláris (icv) injektálását megelőzően Schulz és Buresch (1980) módszerét alkalmazva 0.8 mm átmérőjű teflon kanült építettünk be a felnőtt, nőtény CFY fehérpatkányok (150-180 g) oldalkamrájába. A kanülözést követően külön ketrecekben tartottuk az állatokat. A kontroll csoportot 25 µl fiziológiás sóoldattal kezeltük icv., ami 0.1% aszkorbinsavat is tartalmazott. Az adagolást 200 µl-es Hamilton mikroadagolóval végeztük, 5 µl/perc sebességgel. A kezelt csoport 200 µg 6-OHDA-t (szabad bázisra számolva) kapott 25 µl vehiculumban oldva, ami a 6-OHDA gyors autooxidációjának megakadályozása céljából 0.1% aszkorbinsavat is tartalmazott. A túlélési idő 4 nap volt.

Az állatok kainsavval (KA; 2-karboxi-4-izopropenil-3-pirrolidinecetsav) és kolhicinnel történő kezelését a hippocampus dorsális részébe irányított mikroinjekcióval oldottuk meg. Felnőtt, nőtény CFY fehérpatkányokat (200-220 g) Nembutal anaesztézia alkalmazása mellett, 10 µl-es Hamilton mikrofecskendővel unilaterálisan injiciáltunk. A kainsavat (Sigma Chemical Co.) 5 és 10 nmol dózisban, 1 µl mesterséges cerebrospinalis folyadékban oldva 0.5 µl/perc adagolási sebesség mellett adtuk, míg a kolhicint (Alkaloida, Tiszavasvári) 20 µg dózisban, 2 µl fiziológiás sóoldatban oldva kapták az állatok unilaterálisan. A túlélési idő mindkét kísérletben 2 ill. 7 nap volt.



2.3. Hisztokémiai vizsgálatok

2.3.1. A nyomelemek hisztokémiai demonstrálása

Az oldhatatlan szulfidokat képező és argentofil nyomelemek (a d-mező elemei és az átmeneti fémek többsége) hisztokémiai demonstrálására Timm (1958) szulfid-fémezüst impregnációs technikáját alkalmaztuk. A módszer lényege a nyomelemek H_2S -nel fémszulfid (pontosabban protein-fém-SH) formába történő átalakítása (Brunk és mtsai., 1968), majd a fémszulfidok -- mint katalizátorok -- felületén fizikai előhívó (pl. hidrokinon) jelenlétében az ezüstionok fémezüstté történő redukálása (Danscher, 1981).

Az állatokat a következő összetételű oldattal perfundáltuk: 9 g $Na_2S \times 9 H_2O$ és 3 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ 250 ml desztillált vízben oldva (pH: 7.3-7.4). A kivett agyszövetből kriosztáttal horizontális síkban 25 μm vastag metszeteket készítettünk. A posztfixálás 96%-os etanolban (15 perc), az előhívás 25 °C hőmérsékleten, minden alkalommal frissen készített Timm reagensben (pH: 3.8) történt (55-60 perc).

A hippocampus rétegeinek differenciáltabb festődése céljából a metszetek egy részét toluidinkék 1%-os vizes oldatával festettük felül.

A nyomelemek szöveten belüli differenciált hisztokémiai kimutatására (a cink és a réz hisztokémiai kép alapján történő elkülönítésére) a Timm festés azon általunk kidolgozott módosítását alkalmaztuk (Kozma és mtsa., 1981a),

amely a triklórecetsav (TCA) cink- és vasszulfid oldó hatásán alapszik. A Timm festett metszeteket ill. szövetdarabokat 3 ill. 5 percig 15%-os TCA-ban inkubáltuk. A szövetben visszamaradó nyomelemfestődés főleg a réz jelenlétével hozható összefüggésbe.

2.3.2. Az AChE aktivitás fénymikroszkópos lokalizációja

Az acetilkolin-észteráz (AChE, EC 3.1.1.7) aktivitás hisztokémiai demonstrálására Koelle és Friedenwald (1949) acetiltiokolinós (AThCh) módszerének Kása és Csillik (1966) által kidolgozott módosítását, az un. ólom-réz-tiokolin technikát alkalmaztuk.

A frissen eltávolított nagyagyat 8%-os formaldehidben 24 órán át fixáltuk, majd a szövetből 25 μm vastag metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotommal. Az előinkubálást 10^{-4} mol/l etopropazin-HCl-ban végeztük (20 perc) a nem-specifikus kolinészterázok bénítása céljából (Lewis, 1961). Desztillált vizes mosás után a metszeteket 60-120 percig inkubáltuk a következő összetételű oldatban: AThChI (Fluka): 21 mg; 0.1 mol/l CH_3COONa : 6.6 ml; 3.7% glicin) 0.3 ml; 0.1 mol/l CuSO_4 : 0.3 ml; 0.1% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: 0.3 ml. Ezt rövid ideig tartó desztillált vizes mosás, majd a metszetek 2% Na_2S oldatban történő előhívása követte. A tárgylemezre felvett metszeteket dehidráltuk és kanadabalzsammal lefedtük.

2.3.3. Az axonális degeneráció fénymikroszkópos kimutatása

A degenerációs vizsgálatokat fimbria átmetszett és 6-OHDA.HBr-dal kezelt patkányokon Nauta és Gyax (1954) módszerével végeztük el. A módszer a degenerált axonok és terminálisaik szelektív ezüstimpregnációján alapszik. A fimbria átmetszését ill. az icv. 6-OHDA kezelést követően 7 nappal a patkányokból frissen kivett agyat 10%-os neutrális formalinban legalább egy hónapig állni hagytuk, a felhasználást megelőzően. A szövetből 15-25 μm vastag fagyaszott metszeteket készítettünk, amelyeket 15%-os etanolban áztattunk (30 perc). Rövid desztillált vizes mosás után 0.5%-os foszformolibdénsavas kezelés (30 perc) következett, majd 0.5%-os KMnO_4 oldatba tettük át a metszeteket (6 perc). Mosás után 1%-os hidrokinon és 1%-os oxálsav 1:1 térfogatarányú oldatában elszintelenedésig tartottuk a metszeteket (1-2 perc), majd többszöri mosás után 1.5%-os AgNO_3 -os oldatban tettük a metszeteket (AgNO_3 : 0.9 g; deszt. viz: 20 ml; etanol: 10 ml; cc. NH_4OH : 1.8 ml; 2.5% NaOH: 1.5 ml). Ezután redukáló oldatba vittük át a metszeteket és a barnás szín eléréséig ott tartottuk azokat. A redukáló oldat összetétele a következő volt: 45 ml 96%-os etanol, 13.5 ml 10%-os formaldehid, 13.5 ml 1%-os citromsav 400 ml desztillált vízben oldva. Ha a festődés túl világos volt, kevés NaOH-ot, ha viszont túl sötét volt, kevés cc. NH_4OH -ot adtunk az AgNO_3 -os oldathoz. Rövid desztillált vizes mosás után 1%-os $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ oldattal fixáltuk, majd ismét mostuk,

tárgylemezre húztuk és dehidráltuk a metszeteket. Végül a kanadabalzsammal történő fedés következett.

2.4. Biokémiai vizsgálatok

2.4.1. Idegzöveti minták AAS mérésre történő előkészítése

Az állatból kivett hippocampus nedves súlyát rögtön lemértük, majd a kísérlet jellegétől függően vagy mélyhűtőben tároltuk, vagy azonnal feldolgoztuk. A minták száraz súlyát 110 °C-on 20 órán át, súlyállandóságig történő kiszáritás után mértük le. Ezt követte az agyszövet 550 °C-on 16-20 órán át kvarctégelyben történő száraz hamvasztása. A hamut -- a minta súlyától függően -- megfelelő térfogatú (2-3.5 ml) 3 mol/l HNO₃-ban (Merck Suprapur^R) oldottuk fel.

2.4.2. Szubcelluláris frakcionálás és a minták AAS mérésre történő előkészítése

A szubcelluláris frakciók fehérje- és cinkszintjeinek változását normál és cinkhiányos táplálkozás mellett, az önálló táplálkozás megkezdésének időszakában, a posztnatális 20. és 30. napok között vizsgáltuk.

A szubcelluláris frakcionálás menete a Gray és Whittaker (1962) közleményében leirtaktól csak kis mértékben tért el.

6-8 állat hippocampusából jéghideg 0.32 mol/l szaharózban

(BDH Aristar^R) először 10 súly/tf. %-os homogenátumot készítettünk, teflon-üveg homogenizátorral (20 strokes), majd 1300xg 10 percig történő centrifugálással kapott pellet reszuszpendálásával nyertük a nyers magfrakciót (P₁), a szupernatáns (S₁) 17000xg 60 percig való centrifugálásával pedig az S₂ felülúszót, ill. a pellet reszuszpendálásával P₂ un. nyers mitokondriális frakciót kaptuk.

A frakciók fehérjekoncentrációját Lowry és mtsai. (1951) által kidolgozott módszerrel mértük. A frakciókat 2-3 ml cc. HNO₃-val (Merck Suprapur^R) 130 °C-on nedvesen roncsoltuk, a roncsolási maradékot a frakció eredeti térfogatának megfelelő mennyiségű 3 mol/l HNO₃-ban oldottuk fel.

2.4.3. Az AAS mérések kivitelezése, paraméterei

Az előkészített minták cink- és vastartalmának mérése Perkin-Elmer 306 típusú atomabszorpciós spektrofotométeren $\lambda = 213.9$ ill. 248.3 nm hullámhosszon (résszélesség: 0.7 ill. 0.2 nm), levegő-acetilén lángban történt. A réz- és mangántartalmat az alapkészülékhez kapcsolt HGA-500 grafitkemencében, elektrotermál atomizálással határoztuk meg.

A mérések paraméterei a következők voltak:

Cu mérésekor: hullámhossz 324.8 nm, résszélesség 0.7 nm, szárítás hőmérséklete 120 °C ($10 + 15$ sec), termikus előkezelés hőmérséklete 900 °C ($10 + 20$ sec), atomizálás hőmérséklete 2600 °C ($2 + 6$ sec), öblítés és tisztítás hő-

mérséklete 2700 °C (1 + 4 sec). Az atomizálási lépés alatt 50 ml/perc N₂ belső gázáramot alkalmaztunk.

Mn mérésekor: hullámhossz 279.5 nm, résszélesség 0.2 nm, szárítás hőmérséklete 120 °C (10 + 15 sec), termikus előkezelés hőmérséklete 1000 °C (10 + 20 sec), atomizálás 2600 °C-on (2 + 6 sec), öblítés és tisztítás hőmérséklete 2700 °C (1 + 4 sec). Az atomizálási lépés alatt gas stopot alkalmaztunk.

Minden esetben 20 µl mintatérfogatot vittünk be a küvettatérbe és a kapott abszorbanciajeleket az atomizálási lépés alatt Perkin-Elmer 56 típusú gyors regisztrálón rögzítettük.

2.4.4. A CAT aktivitás radiokémiai mérése

A kolinacetyl-transzferáz (CAT, EC 2.3.1.6) aktivitást Fonnum (1969) radioenzimatikus mikromódszerével mértük, ami azon alapul, hogy az enzim a jelzett ACoA-ból és hideg kolinból acetilcsoportján jelzett ACh-t szintetizál. A mérést mikrokémcsövekben, blank alkalmazásával végeztük. Az inkubáló elegy végkoncentrációi a következők voltak: 0.6 mM 1-¹⁴C -ACoA (2.09 GBq/nmol, The Radiochemical Centre, Amersham, England), 300 mM NaCl, 50 mM Na-foszfátpuffer (pH: 7.4), 10 mM kolin-Cl, 20 mM EDTA és 0.1 mM fizosztigmin szulfát (Sigma Chemical Co.). A mikrokémcsövek tartalmát 5 ml 10 mM-os Na-foszfátpufferrel a következő összetételű szcintillációs elegybe mostuk át: 10 mg Na-tetrafenilborát

2 ml acetonitrilben oldva és 20 mg PPO, valamint 0.75 mg POPOP 5 ml toluolban oldva. A minta aktivitását összerázás után Packard Tri Carb folyadékszintillátorban mértük. A CAT aktivitást μmol szintetizált ACh/h/g nedves szövetsúly egységben fejeztük ki.

2.4.5. Az AChE aktivitás spektrofotometriás meghatározása

Az AChE biokémiai meghatározását Ellman és mtsai. (1961) által kidolgozott spektrofotometriás eljárással végeztük. Az enzim az AThChI hidrolizise során tiokolint szabadít fel, ami az 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoesavval (DTNB, Sigma Chemical Co.) reagálva sárga színű terméket eredményez.

A mérés 412 nm-en, 1 cm-es küvettában, Pye Unicam spektrofotométeren történt. A mérendő homogenátum változó mennyiségét (20 vagy 50 μl -t) 2.88 ml 0.1 mol/l foszfát-pufferba (pH: 8) tettük és ehhez 0.1 ml DTNB oldatot adtunk (39.6 mg DTNB és 15 mg NaHCO_3 10 ml 0.1 mol/l foszfát-pufferben oldva). Végül 20 μl AThChI oldatot (21.67 mg AThChI 1 ml deszt. vízben oldva) adtunk a mintához. A nemspecifikus kolinészteráz aktivitás gátlására etopropazin-HCl-ot (10^{-4} mol/l végkoncentrációban) adtunk az elegyhez. Az AChE aktivitást μmol hidrolizált AThChI/h/g nedves szövetsúlyban fejeztük ki.

2.4.6. Biometriai számítások

A biokémiai vizsgálatok kísérleti eredményeit a szamtani középértékkel és az átlagos standard hiba (S.E.M.) megadásával reprezentáltuk.

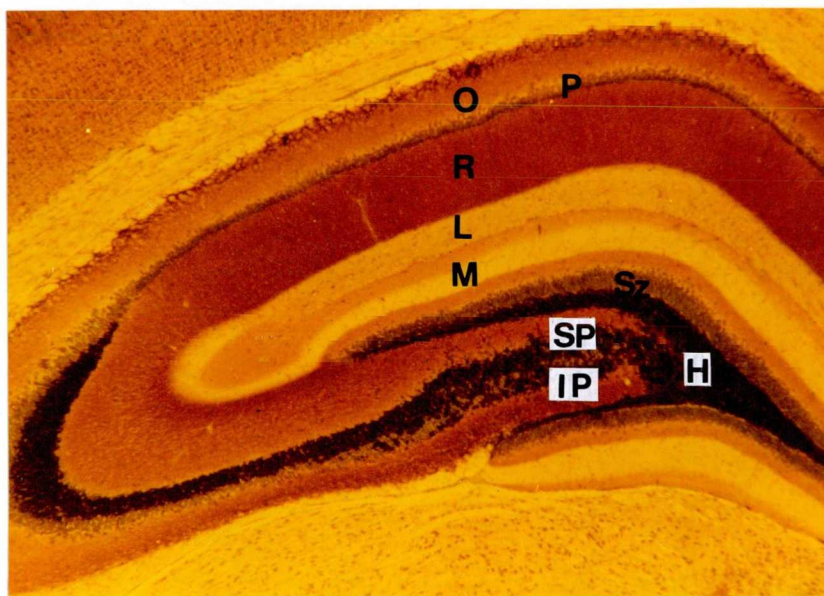
Két kísérletsorozat átlaga közötti különbség szignifikanciájának vizsgálatára minden esetben a Student-féle t-próbát alkalmaztuk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A nyomelemek normál szöveti lokalizációja a hippocampusban

A normál hippocampusban a nehézfémek többsége Timm módszerével az area dentata moharost rendszerében, azaz a hilusban, valamint a CA3-CA4 régió szupra- és infrapiramidális rétegében vizualizálható (2.Ábra). E régiók sötét festődése a moharost terminálisokban lokalizálható nyomelemekkel, főleg cinkkel hozható összefüggésbe. Erősen festődik az area dentata szemcsesejt rétege is, ahol a nyomelemekelsősorban perikaryonálisan lokalizálódnak.

A régió superior piramissejt rétegének intenzív festődése a perikaryonban és az apikális dendritekben jelenlévő nyomelemekre utal. A régió inferiorban a piramissejtek némileg halványabban festődnek, mint a régió superiorban.



2.Ábra: Normál hippocampusban a hilus (H), a supra- és infra-piramidális réteg (SP, IP) moharostjai intenzív nyomelem festődést mutatnak. Erősen festődik a szemcsesejtek (Sz) és a piramissejtek (P) rétege is. Egyéb jelölések: O: str. oriens, R: str. radiatum, L: str. lacunosum, M: str. moleculare.
X 194

Közepes intenzitást mutat a str. radiatum dendritarbo-rizációjának és a str. oriens nyomelem festődése, a régió superiorban és a régió inferiorban egyaránt.

A str. lacunosumban, továbbá a str. moleculare külső és belső rétegében halvány Timm reakció demonstrálható.

A str. moleculare középső rétege normál hippocampusban nem festődik. A subiculumban kizárólag a szemcsesejtek és a piramissejtek festődése jelentős.

3.2. A cink és réz differenciált hisztokémiai kimutatása a hippocampusban

A Timm reakció az oldhatatlan és argentofil szulfidot képező nyomelemek (Zn, Fe, Cu, Mn, Co, Ni stb., azaz az esszenciális fémek) és a rendkívül kis mennyiségben jelenlevő toxikus fémek (Pb, Cd, Hg) együttes kimutatására alkalmas csak. Következésképp szükségesnek tartottuk a Timm festés olyan módosításának kidolgozását, amelynek segítségével a szövetben legnagyobb koncentrációban levő nyomelemek (Zn, Fe és Cu) differenciáltan mutathatók ki.

A Timm reakció általunk bevezetett módosítása a triklórecetsav (TCA) cink- és vasszulfid oldó hatásán alapul. A kontrollként szolgáló, perfundált hippocampus, neocortex és cerebellum cink- és rézsztintje látható az I. Táblázatban. Miután a szövetdarabkákat 5 percig 15%-os TCA oldatban inkubáltuk, a szöveti cinkszint a hippocampus esetében 48%-kal, a neocortexben 33%-kal, a kisagyban pedig 30%-kal csökkent. A változások mindegyike erősen szignifikáns volt. A szövetdarabok réztartalma a TCA kezelés következtében viszont nem változott meg szignifikánsan ($p > 0.05$) és a cinkkel ellentétben az inkubáló oldatban nem volt kimutatható.

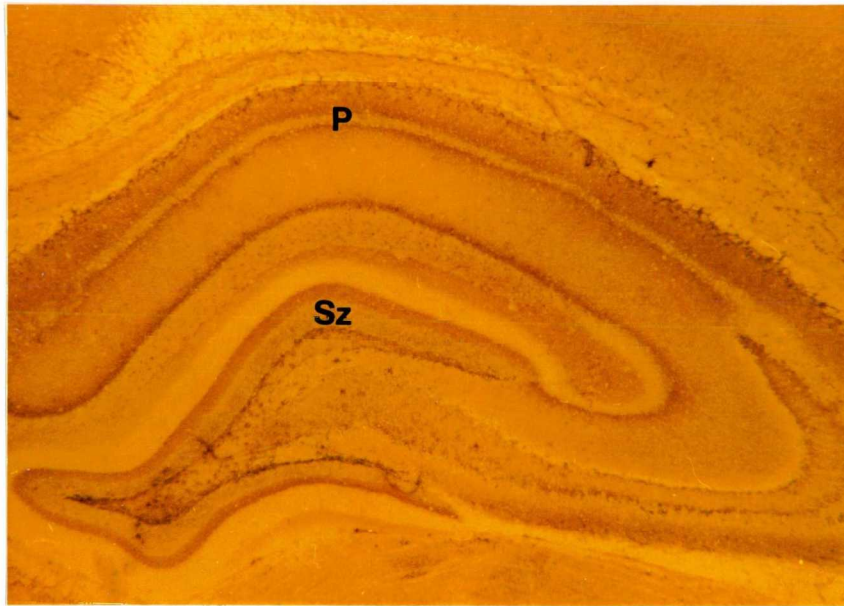
Normál hippocampusban (2.Ábra) a nyomelemek többsége az area dentata moharost rendszerében, a szemcsesejt rétegben és a hippocampus régió superior piramissejt rétegében demonstrálható Timm módszerével. Jelentős a str. radiatum festődése is.

A TCA kezeléssel kombinált, Timm szerint festett metszeten (3.Ábra) -- a szöveti cink és vas jelentős részének kioldása után -- a hippocampus valamennyi rétegében jelentősen csökkent a nyomelem festődés. Legszembetűnőbb a moharost neuropil és a str. radiatum dendritarborizációjának festődés csökkenése. Az area dentata szemcsesejt rétegében és a hippocampus CA1-4 régióinak piramissejtjeiben ugyanakkor továbbra is demonstrálható -- a szövetben visszamaradó rézzel összefüggésbe hozható -- nyomelem festődés, ami perikaryonálisan lokalizálható.

I. TÁBLÁZAT: KONTROLL (PERFUNDÁLT) ÉS TCA-val KEZELT IDEG-SZÖVETEK CINK- ÉS RÉZTARTALMA $\mu\text{g/g}$ SZÁRAZ SZÖVETSÜLYBAN KIFEJEZVE \pm S.E.M.
Zárójelben a kísérletek számát tüntettük fel

Nyomelem	Szövet	Kontroll	1.TCA-val kezelt	2.TCA által kioldott	Kioldás mértéke (kontroll=100%)
Zn	Hippocampus	107 \pm 12(7)	49 \pm 6 ^b (7)	51 \pm 10	48%
	Neocortex	75 \pm 12(7)	47 \pm 4 ^a (7)	25 \pm 3	33%
	Cerebellum	54 \pm 12(6)	37 \pm 3 ^a (6)	16 \pm 2	30%
Cu	Hippocampus	21.3 \pm 3.8(7)	15.0 \pm 1.3 ^c (7)	n.k.	0%
	Neocortex	13.4 \pm 2.1(1)	13.5 \pm 1.1 ^c (6)	n.k.	0%
	Cerebellum	11.6 \pm 1.0(6)	12.7 \pm 0.8 ^c (6)	n.k.	0%

a: $p < 0.001$; b: $p < 0.002$; c: nem szignifikáns; n.k.: nem kimutatható



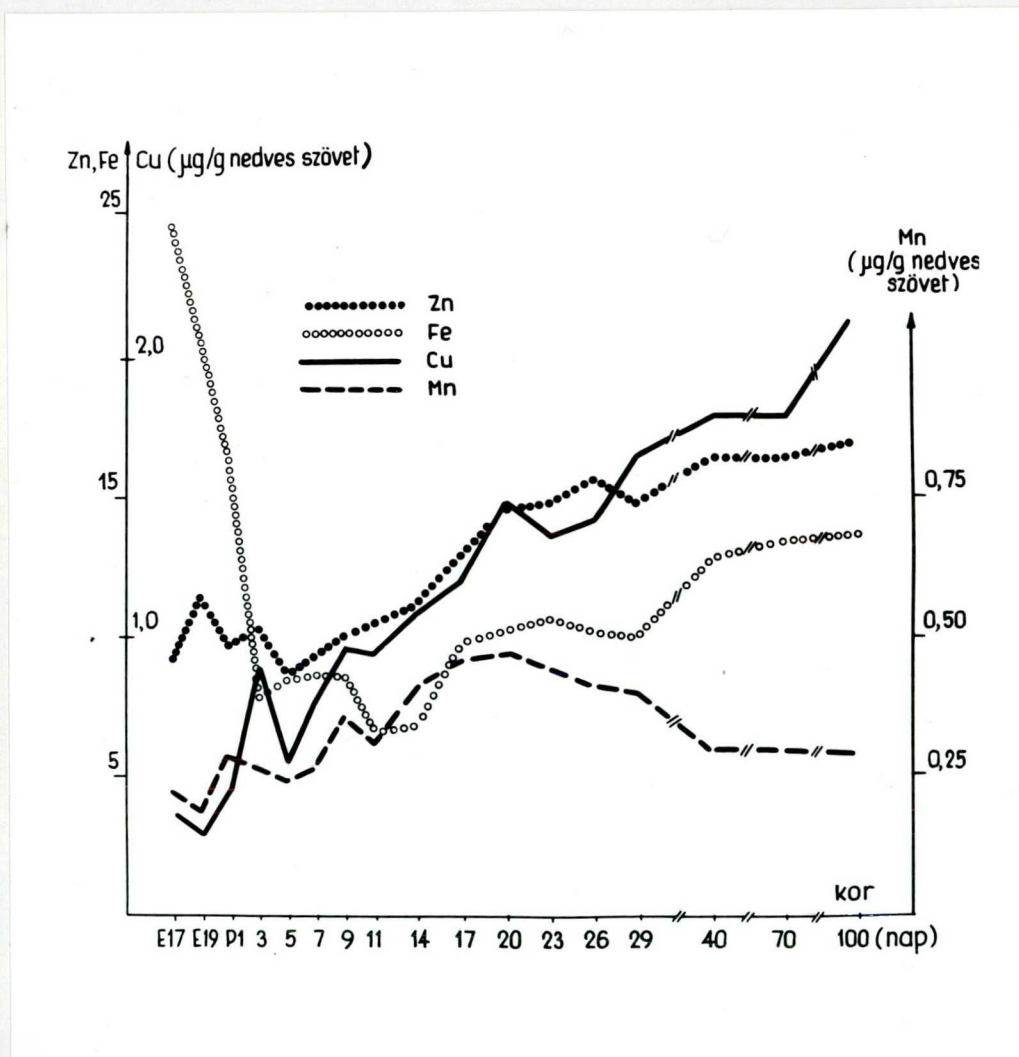
3.Ábra: A TCA kezeléssel kombinált Timm festés megkönnyíti a szöveti réz differenciált kimutatását a hippocampusban. Elsősorban a szemcsesejtek (Sz) és a piramissejtek (P) perikaryonjában jelentős a réz jelenlétére utaló festődés. X 194

3.3. A nyomelemek strukturális lokalizációja és mennyiségük változása normál hippocampusban az ontogenetikus fejlődés folyamán

A nyomelemek hippocampális szerepének tisztázása céljából szükségesnek tartottuk a legnagyobb koncentrációban előforduló nehézfémek szöveti szintjének ontogenetikus változását (az embrionális 17. naptól a posztnatális 100. napig) végigkövetni, s adatainkat igyekeztünk összefüggésbe hozni

a hippocampus magas nyomelemtartalmú neuronális elemeinek morfológiai érésére ill. a transzmitter rendszerek ontogenetikus fejlődésére vonatkozó irodalmi adatokkal.

A normál hippocampus nedves szövetsúlyra vonatkoztatott cinkkoncentrációja az embrionális 17. nap és a poszt-natális 5. nap között fluktuál (4.Ábra), így lényegében nem változik ($p > 0.05$).



4.Ábra: Normál hippocampus cink-, vas-, réz- és mangánszintjének változása az ontogenetikus fejlődés folyamán.

A posztnatális 5. naptól kezdve azonban a felnőttkorig a cinkszint folyamatos emelkedése tapasztalható. A legmeredekebb emelkedés a posztnatális 14. és 20. nap között következik be (+30.5%, $p < 0.001$), bár a 11.-20. napok között ugyancsak nagymértékű a cinkkoncentráció emelkedése (+38.6%, $p < 0.001$). Átmeneti stagnálás után a cinkszint a 29. és 40. napok között mintegy 10.8%-kal emelkedik ($p < 0.001$) és ezáltal megközelíti a felnőttkorra (=100. napra) jellemző értéket.

Az embrionális 17. nap és a posztnatális 3. nap között rendkívül drámai csökkenés következik be a hippocampus vasszintjében (4.Ábra) (-217.7%, $p < 0.001$). Átmeneti stagnálás után a 9. és 11. napok között további 31.4%-kal csökken ($p < 0.001$) a szöveti vaskoncentráció. A 14. naptól kezdve (a felnőttkori érték 50%-áról kiindulva) lépcsőzetesen emelkedve éri el a vasszint a felnőttkorra jellemző értéket. A legerőteljesebb emelkedések periódusai a 14.-17. (+45.3%, $p < 0.001$) és a 29.-40. napok közé tehetők (+26.9%, $p < 0.001$).

A hippocampus részszintjének alakulására az állandó és folytonos emelkedés a jellemző (4.Ábra). Az embrionális 17. napon a hippocampus részszintje felnőttkori értékének mindössze 17.5%-a. A részszint folyamatos emelkedése mellett a posztnatális 3. és 20. napon különösen magas szöveti részszinteket mértünk.

A hippocampális mangánszint alakulására -- más általunk vizsgált nyomelemekkel ellentétben -- a maximumgörbe szerinti lefutás jellemző (4.Ábra). A szöveti mangánszint az embrio-

nális 19. naptól a posztnatális 20. napig folyamatosan emelkedik, s a 20. napon mért érték ($0.471 \pm 0.007 \mu\text{g/g}$ nedves szövetsúly) a felnőttkori értéknél mintegy 64%-kal magasabb ($p < 0.001$). Ettől kezdve azonban a mangánkoncentráció folyamatosan csökken, s a 40. napon megközelíti a felnőttkorra jellemző értéket.

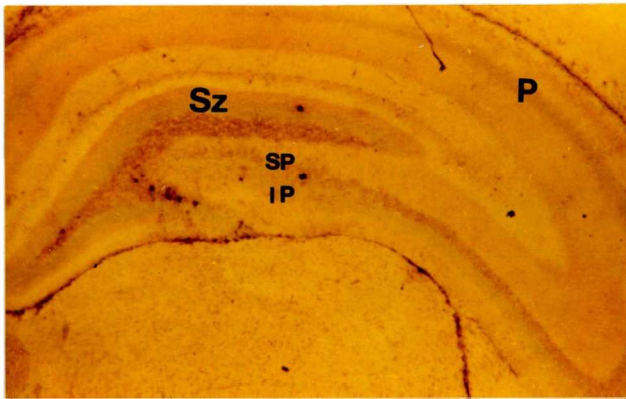
Ha a hippocampális cinkszintet a vizsgált nyomelemek koncentrációinak összegéhez viszonyítottuk, s e viszonyszám alakulását az ontogenetikus fejlődés folyamán vizsgáltuk, azt tapasztaltuk, hogy a cink jelenléte a posztnatális 3. napon, de különösen a 11-14. napok közötti időszakban domináns a hippocampusban. Atomabszorpciós elemzésünk adatai szerint a cink a hippocampus Timm módszerrel festődő nyomelemeinek 57-58%-át teszi ki ebben az időszakban ($p < 0.001$, más életkorhoz viszonyítva).

3.4. Krónikus cinkhiány hatása a hippocampális nyomelem-szintre és szubcelluláris megoszlására, valamint a CAT és AChE aktivitásra

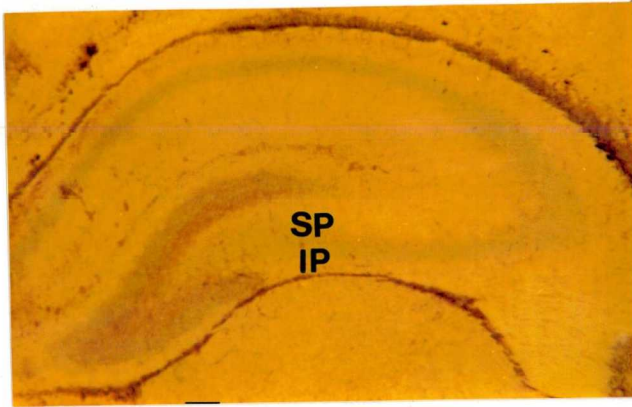
Kísérleteinkben azt kívántuk demonstrálni, hogy az esszenciális cink szervezettől való megvonása milyen hatással van a hippocampus nyomelem festődésére, cinkszintjére és annak szubcelluláris eloszlására, valamint a kolinerg enzimek aktivitására.

3.4.1. A nyomelemek fénymikroszkópos lokalizációja

A 11. napon a normál hippocampusban (5.Ábra) már jól megfigyelhető a piramissejtek és a szemcsesejtek rétegeinek Timm festődése, bár az intenzitásában nem éri el a felnőttkorit. A hilus és a CA3 szinaptikus régiói szintén karakterisztikusan, de a felnőttkorinál jóval halványabban festődnek. Észlelhető a szupra- és infrapiramidális moharostrétegek festődése is a CA4 régióban.



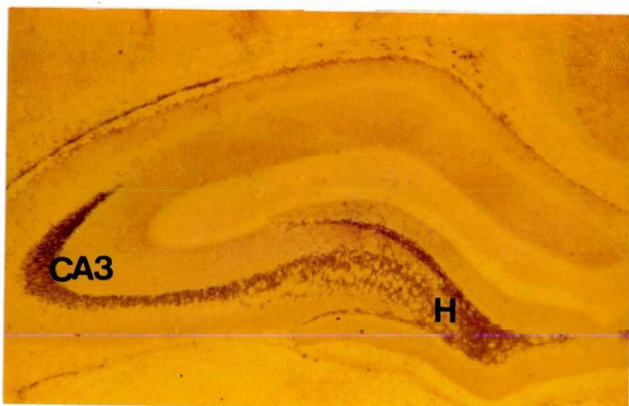
5.Ábra: 11 napos normál hippocampusban a szemcsesejtek (Sz) és a piramissejtek (P) festődése már jól megfigyelhető. A szupra- és infrapiramidális moharostok (SP, IP) halványan festődnek.
X 90



6.Ábra: 11 napos cinkhiányos hippocampusban a szupra- és infrapiramidális moharostok (SP, IP) nem festődnek. X 100



7.Ábra: 21 napos normál hippocampus festődésintenzitása valamennyi régióban megközelíti a felnőttkorit. X 128



8.Ábra: 21 napos cinkhiányos hippocampusban a hilus (H) és a CA3 szinaptikus régiók festődése a kontrollnál gyengébb. X 114

A 11 napos cinkhiányos állat hippocampusában (6.Ábra) szintén megfigyelhető a piramissejtek és a szemcsesejtek Timm reakciója, a hilus és a CA3 régió festődése azonban a kontroll állathoz képest (5.Ábra) gyengébbnek tűnik. Szembeötlő viszont, hogy a cinkhiányos hippocampusban a szupra- és az infrapiramidális moharostok nem festődnek.

21 napos korban a kontroll hippocampus Timm festődése intenzitásában megközelíti a felnőttkorit (7.Ábra). A moharostok és terminálisaik, továbbá a szemcsesejtek és a piramissejtek festődése lényegesen erősebb a 11 napos normál hippocampushoz viszonyítva.

A cinkhiányos hippocampusban, a posztnatális 21. napon, csökkent nyomelem festődés demonstrálható az area dentata hilusában és a CA3 szinaptikus régióban. A szupra- és az infrapiramidális moharostok rétege a kontroll hippocampusnál gyengébben festődik (8.Ábra).

3.4.2. Atomabszorpciós spektrofotometriás vizsgálatok

A cinkhiányos táplálás legszembetűnőbb, primér jele, hogy a teljes agy súlya a posztnatális 20. és 30. napon mintegy 25-26%-kal alacsonyabb, mint a kontrollban (II.TÁBLÁZAT).

II. TÁBLÁZAT: A TELJES AGY NEDVES SÚLYÁNAK VÁLTOZÁSA POSZTNATÁLIS CINKHIÁNYOS TÁPLÁLÁS HATÁSÁRA

Kor (nap)	Kontroll (g)	Zn-hiányos (g)	Változás (%)	Szignifikancia
20	1.363 [±] 0.045(6)	1.004 [±] 0.010(10)	-26.3	p<0.001
30	1.496 [±] 0.037(6)	1.116 [±] 0.015(7)	-25.4	p<0.001

Átlagérték [±]S.E.M. (mintaszám)

A cinkhiányos patkány hippocampusának nedves súlya a posztnatális 20. napon mintegy 24%-kal, a 30. napon már 30%-kal alacsonyabb a megfelelő kontrollhoz képest (III.TÁBLÁZAT). A szöveti súlycsökkenés következtében a hippocampus összfehérje (mg fehérje/hippocampus) és cinktartalma (μg cink/hippocampus) szintén hasonló mértékben, szignifikánsan alacsonyabb a cinkhiányos csoportban (III.TÁBLÁZAT). Ha azonban a normál és a cinkhiányos hippocampus 10%-os homogenátumának cinkszintjeit összehasonlítjuk, megállapítható, hogy nincs szignifikáns eltérés a két csoport cinkkoncentrációi között ($p > 0.05$) (IV.TÁBLÁZAT).

A szubcelluláris frakciók (P_1 , S_2 , P_2) cinkszintjében krónikus cinkhiány hatására a következő eltéréseket tapasztaltuk (IV.TÁBLÁZAT): 20 napos korban csak a cinkhiányos csoport S_2 felülúszójában (un. mikroszóma frakcióban) volt alacsonyabb a cinkszint, a kontrollnál 20%-kal ($p < 0.002$). A P_1 un. nyers magfrakció és a P_2 un. nyers mitokondriális

frakció cinkkoncentrációja mindkét csoportban közel azonos volt. A 30 napos hippocampus P_1 frakciójának cinkszintje azonban a cinkhiányos csoportban a kontrollénál 50%-kal magasabb. Az S_2 és P_2 frakciók cinkszintje között nincs lényeges eltérés, a normál és a cinkhiányos csoportot összevetve.

3.4.3. A kolinerg rendszer enzimjeinek vizsgálata

A kontroll hippocampus AChE aktivitása (III. TÁBLÁZAT) a posztnatális fejlődés 20. és 30. napja között 17%-kal csökken ($p < 0.05$). Cinkhiányban az AChE aktivitás hasonló mértékű csökkenését nem tapasztaltuk ($p > 0.05$). A kontroll és cinkhiányos állat hippocampusának AChE aktivitása között nincs lényeges különbség az önálló táplálkozás megkezdésének időszakában ($p > 0.05$).

A kontroll hippocampus CAT aktivitása a posztnatális 20. és 30. napok között 37%-kal nő ($p < 0.05$). Ebben a periódusban a cinkhiányos csoport hippocampusában 140%-os ($p < 0.01$) CAT aktivitás növekedés következik be, de értéke még így sem haladja meg a 30 napos kontroll csoport CAT aktivitását.

III. TÁBLÁZAT: NORMÁL ÉS CINKHIÁNYOS HIPPOCAMPUS NEDVES SÚLYÁNAK, ÖSSZFEHÉRJE- ÉS CINKTARTALMÁNAK, VALAMINT A CAT ÉS AChE AKTIVITÁS VÁLTOZÁSA AZ ÖNÁLLÓ TÁPLÁLKOZÁS MEGKEZDÉSÉNEK IDŐSZAKÁBAN

Kor (nap)	Vizsgált állat	Nedves súly (mg)	Összfehérje (mg/hippocampus)	CAT ($\mu\text{M}/\text{h}/\text{g}$)	AChE ($\mu\text{M}/\text{h}/\text{g}$)	Cinktartalom ($\mu\text{g}/\text{hippocampus}$)
20	Kontroll	72.21 \pm 1.73(6)	9.21 \pm 0.10	1.70 \pm 0.07	313.3 \pm 8.6	0.910 \pm 0.022
	Zn-hiányos	54.70 \pm 1.57(3) ^x	7.23 \pm 0.15 ^x	0.84 \pm 0.16 ^{xx}	275.0 \pm 11.0 ^{xx}	0.635 \pm 0.027 ^x
30	Kontroll	85.30 \pm 1.69(7)	10.26 \pm 0.19	2.33 \pm 0.18	268.4 \pm 15.6	1.066 \pm 0.026
	Zn-hiányos	59.78 \pm 2.31(4) ^x	8.23 \pm 0.13 ^x	2.02 \pm 0.07	300.6 \pm 3.9 ^{xx}	0.813 \pm 0.018 ^x

^x p < 0.001

^{xx} p < 0.05

\pm S.E.M.

Zárójelben a kísérletek számát tüntettük fel.

IV. TÁBLÁZAT: NORMÁL ÉS CINKHIÁNYOS PATKÁNY HIPPOCAMPUSÁBÓL NYERT FRAKCIÓK CINKSZINTJÉNEK VÁLTOZÁSA AZ ÖNÁLLÓ TÁPLÁLKOZÁS MEGKEZDÉSÉNEK IDŐSZAKÁBAN

Kor (nap)	Frakció	Kontroll	Zn-hiányos	Szignifikancia (p)
20	10% homogenát ^o	1.26 [±] 0.03	1.16 [±] 0.05	>0.05
	P ₁	0.15 [±] 0.01	0.17 [±] 0.02	>0.05
	S ₂	0.56 [±] 0.01	0.45 [±] 0.03	<0.002
	P ₂	0.55 [±] 0.03	0.54 [±] 0.04	>0.05
30	10% homogenát ^o	1.25 [±] 0.03	1.36 [±] 0.03	>0.05
	P ₁	0.14 [±] 0.01	0.21 [±] 0.01	<0.002
	S ₂	0.51 [±] 0.03	0.56 [±] 0.04	>0.05
	P ₂	0.60 [±] 0.01	0.59 [±] 0.01	>0.05

Minden érték µg cink/ml frakcióban kifejezve

^o A 10%-os homogenát cinkszintjét a P₁+S₂+P₂ frakciók cinkszintjének összege reprezentálja

[±]S.E.M.

Kísérletek száma: 4

3.5. A fimbria átmetszését követő nyomelemszint változások a hippocampusban

Kísérletünkben azt kívántuk eldönteni, hogy a hippocampus kolinerg innervációja kapcsolatba hozható-e az extrém magas hippocampális nyomelemszinttel. E célból a fimbriát unilaterálisan átmetszettük és vizsgáltuk e sebészeti beavatkozás AChE és CAT aktivitásra gyakorolt hatását, valamint a hippocampus nyomelemszintjét, hisztokémiai és biokémiai módszerekkel.

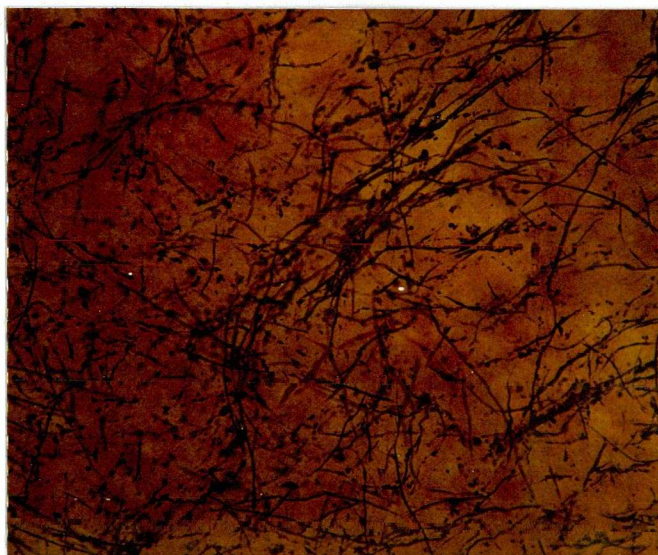
A fimbria unilaterális átmetszése után 7 nappal jól láthatók a degenerált axonok és axonterminálisok az area dentata hilusában, a supra- és infragranuláris rétegben és a CA3 szinaptikus régiókban (9.Ábra).

A biokémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy az unilaterális septális deafferentáció után 7 nappal a műött oldali hippocampus CAT aktivitás 3.76 ± 0.23 $\mu\text{mol/h/g}$ nedves szövet értékről 0.48 ± 0.03 $\mu\text{mol/h/g}$ nedves szövet értékre, szignifikánsan csökkent (-87%, $p < 0.001$) a kontroll, kontralaterális oldalihoz képest. Hasonló mértékben, 403.1 ± 9.7 $\mu\text{mol/h/g}$ nedves szövet normál értékről 79.4 ± 4.7 $\mu\text{mol/h/g}$ nedves szövet értékre csökkent (-80%, $p < 0.001$) ugyanezen időszakban a lézió oldali hippocampus AChE aktivitása is.

Hisztokémiai módszerrel a normál hippocampusban elsősorban az area dentata hilusában és a szupragranuláris rétegben demonstrálható magas AChE aktivitás. Jelentős még a str. pyramidale és a str. granulare AChE festődése is

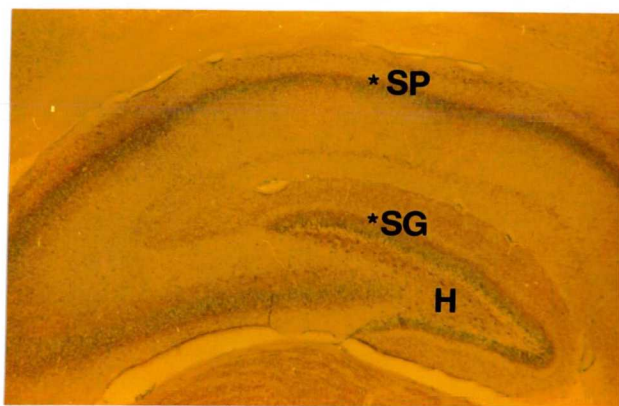
(10.Ábra). A fimbria sebészeti léziójának hatására, 7 nappal a műtét után, elsősorban az area dentata hilusában és a szupragranuláris rétegben csökkent le jelentősen az AChE aktivitásra utaló festődés (11.Ábra).

A kolinerg afferentáció megszüntetésével párhuzamosan nem változik a hippocampus nyomelem festődése. A kontroll, kontralaterális oldali hippocampusra (12.Ábra) jellemző, intenzitásában megegyező Timm festődést látunk a műtött oldali hippocampusban is (13.Ábra). A hippocampus nyomelem festődése egyik régióban, vagy rétegben sem csökken a fimbria átmetszés hatására. A toluidinkékkel felülfestett metszeteken szintén megfigyelhetők a supra- és az infragranuláris réteg, valamint az area dentata hilusának degenerált rostjai.

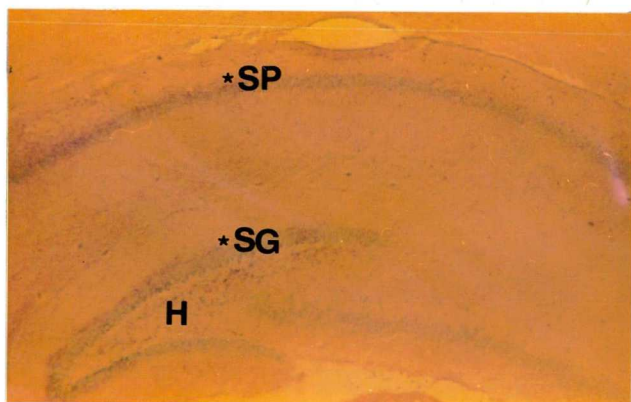


9.Ábra: A fimbria átmetszése által előidézett terminális degeneráció a hippocampus CA3 régiójában. Ezüstimpregnációs módszer.
Túlélés: 7 nap. X 400

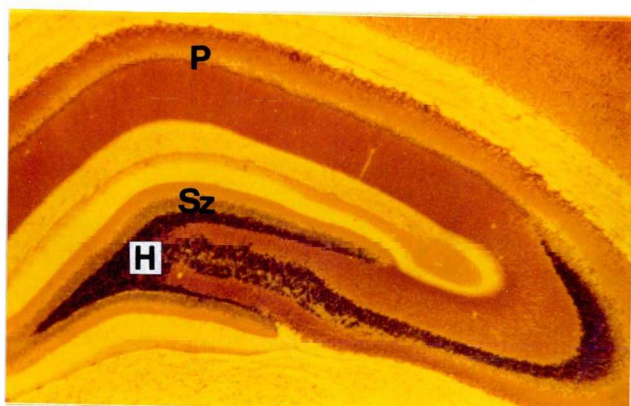




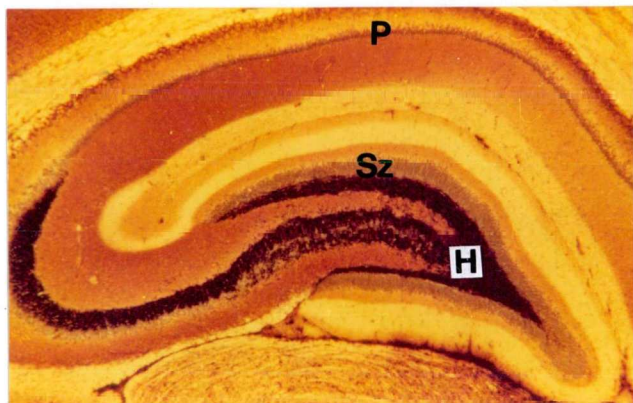
10.Ábra: Normál hippocampusban jelentős AChE aktivitás demonstrálható a hilusban (H), a szupragranuláris (SG) rétegben és a szuprapiramidális (SP) rétegben. X 90



11.Ábra: A fimbria átmetszésének hatására jelentősen csökken a hilus (H), a szupragranuláris (SG) és a szuprapiramidális (SP) réteg AChE aktivitása. Túlélés: 7 nap. X 114



12.Ábra: A kontroll, nem léziós oldali hippocampus nyomelem festődése. Erősen festődik a hilus (H), a szemcsesejt (Sz) és a piramissejt (P) réteg. Túlélés: 7 nap. X 128



13.Ábra: A fimbria átmetszése nem csökkenti a hilus (H), a szemcsesejt (Sz) és a piramissejt réteg (P) intenzív Timm festődését. Túlélés: 7 nap. X 128

Kvantitatív nyomelemszint méréseink -- összhangban Timm módszerével nyert hisztokémiai eredményeinkkel -- szintén azt mutatják, hogy a fimbria átmetszését követően 1 ill. 7 nappal a léziós oldali hippocampus cink- és rézszintje nem változik meg szignifikánsan ($p > 0.05$) a nem léziós oldalához, mint kontrollhoz viszonyítva (V.TÁBLÁZAT).

V.TÁBLÁZAT: SEPTÁLIS DEAFFERENTÁCIÓ HATÁSA A HIPPOCAMPUS CINK- ÉS RÉZSZINTJÉRE

Túlélési idő (nap)	$\mu\text{g/g}$ száraz szövet	Kontroll oldal	Léziós oldal
1	Zn	78.5 ± 1.6 (8)	78.8 ± 1.4 (8)
	Cu	10.2 ± 0.8 (8)	10.3 ± 0.9 (8)
7	Zn	73.9 ± 1.3 (6)	75.5 ± 3.0 (11)
	Cu	11.4 ± 0.5 (5)	10.3 ± 1.3 (9)

Átlagérték \pm S.E.M.

Zárójelben a kísérletek számát tüntettük fel.

3.6. Kémiai anyagok intracerebrális alkalmazása során be- következő nyomelemszint változások a hippocampusban

Kísérleteket végeztünk annak felderítésére, hogy különböző kémiai anyagokkal történő kezelés hatására miképpen változik meg a hippocampus nyomelem festődése ill. nyomelemszintje. 6-OHDA icv alkalmazásával kémiai szimpatektómiát, kainsav és kolhicin intrahippocampális injektálásával pedig a moharost rendszer posztszinaptikus ill. preszinaptikus elemeinek kémiai lézióját idéztük elő (a piramis sejtek ill. a szemcsesejtek szómájának degenerálása révén).

3.6.1. 6-OHDA kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére

200 µg 6-OHDA (szabad bázis) oldalkamrába történő injektálása után 1 héttel a hippocampus area dentata hilusában, a szupra- és az infrapiramidális moharost rétegben, továbbá a molekuláris rétegben terminális degeneráció nyomai láthatók az ezüstimpregnációs metszeteken (14.Ábra).

A vehiculummal icv kezelt, kontroll patkány hippocampusának normális Timm festődésével (15.Ábra) megegyező képet mutat a 6-OHDA kezelt állat hippocampusának nyomelem festődése (16.Ábra). A hippocampális formáció egyik rétegében, vagy régiójában sem következik be szemmel látható nyomelem festődés csökkenés a 6-OHDA-nal előidézett kémiai szimpatektómia hatására.

Atomabszorpciós méréseink szerint a 6-OHDA kezelést követően 4 nappal a kezelt állatok hipocampális cink-, vas- és rézszintjében nem következik be szignifikáns változás ($p > 0.05$) a kontroll hipocampusához viszonyítva (VI.TÁBLÁZAT).

VI.TÁBLÁZAT: 200 μg 6-OHDA icv INJEKTÁLÁSÁNAK HATÁSA A HIPPOCAMPUS NYOMELEMSZINTJÉRE.

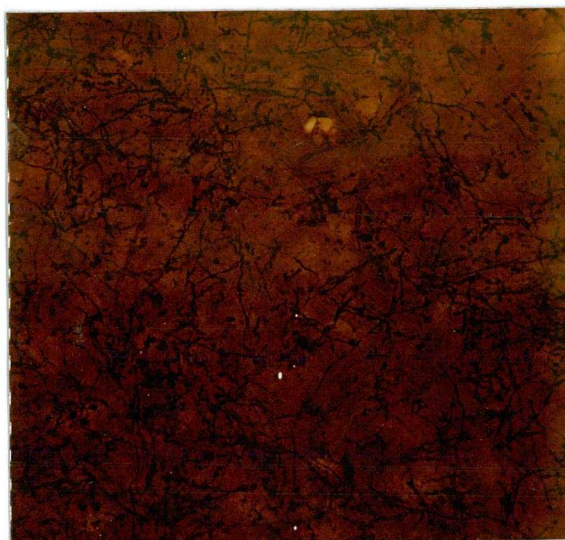
Túlélési idő: 4 nap

Valamennyi érték $\mu\text{g/g}$ száraz súlyban kifejezve

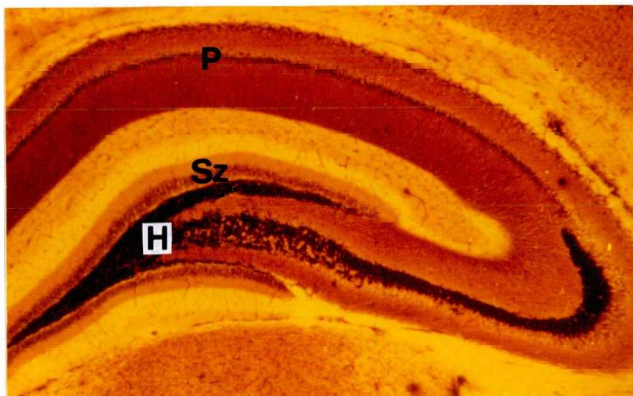
	Zn	Fe	Cu
Kontroll n = 10	85.74 \pm 1.16	63.55 \pm 1.23	10.12 \pm 0.37
Kezelt n = 24	86.04 \pm 1.55	63.66 \pm 1.85	10.28 \pm 0.24

Átlagérték \pm S.E.M.

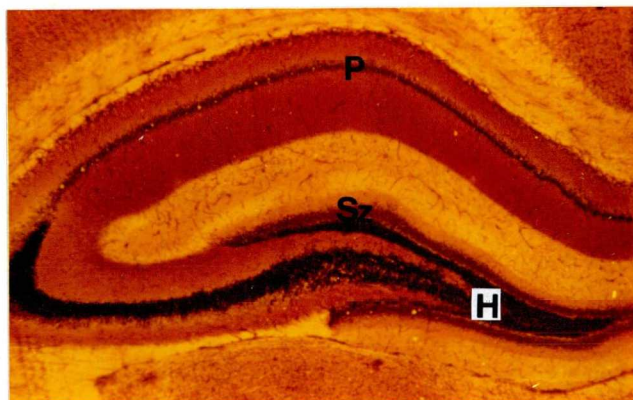
n: kísérletek száma



14.Ábra: 6-OHDA icv kezelés után 7 nappal az area dentata hilusában terminális degeneráció demonstrálható. X 400



15.Ábra: Kontroll, vehiculummal icv kezelt patkány hippocampusában a hilus (H), a szemcse- (Sz) és piramis sejtek (P) normális nyomelem festődést mutatnak. Túlélés: 7 nap. X 100



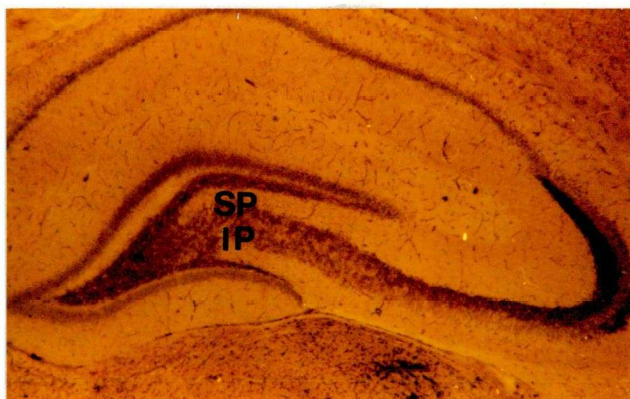
16.Ábra: 6-OHDA kezelés hatására a hilus (H), a szemcse- (Sz) és piramis sejtek (P) Timm festődése a kontrolléval azonos marad. Túlélés: 4 nap. X 114

3.6.2. Kainsav kezelés hatása a hippocampális nyomelemszintre

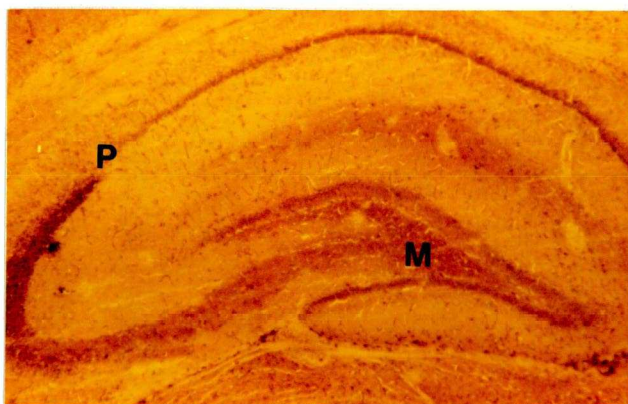
A hippocampus dorsális részébe adott 5 nmol kainsav (KA) hatására -- 2 nappal a kezelés után -- a kontroll, nem injektált oldali hippocampus CA3/4 régiójában csökkent Timm festődés demonstrálható (17.Ábra). Az area dentata szupra- és infrapiramidális moharostjai a normálnál gyengébben festődnek. A piramis sejtek és a szemcsesejtek nyomelem

festődése lényegében nem változik.

A KA injektált hippocampusban elsősorban a CA3/CA4 régiók piramis-sejtjeinek, a hiláris, valamint a szupra- és infrapiramidális moharostok Timm festődése csökkent a nem injektált oldalihoz képest (18.Ábra). Az area dentata szemcsesejtjeinek és a régió superior piramis-sejtjeinek festődése kevésbé változott meg a KA kezelés hatására.



17.Ábra: A nem injektált oldali, kontroll hippocampusban az area dentata szupra- és infrapiramidális (SP, IP) moharostjai a normálnál gyengébben festődnek.
Túlélés: 2 nap. X 100



18.Ábra: Kainsav hatására a CA3-4 régiókban a moharostok (M) és a piramis-sejtek (P) festődése nagymértékben csökkent.
Túlélés: 2 nap. X 114

Hisztokémiai megfigyelésünket nem támasztják alá kvantitativ, AAS nyomelemszint méréseink. 5 nmol KA hatására az injektált hippocampus dorsális részének (kb. 12 mm³ szövet) cink-, vas- és rézszintje sem változik meg szignifikánsan ($p > 0.05$) a nem injektált oldali, kontroll hippocampushoz képest (VII.TÁBLÁZAT). 10 nmol KA intrahippocampális injektálása után 2 nappal a teljes hippocampus cink- és vasszintje lényegében a kontrolléval megegyező marad ($p > 0.05$), azonban a hippocampális rézszint 15%-kal, szignifikánsan ($p < 0.002$) csökken az injektált oldalon.

VII.TÁBLÁZAT: KAINSAV INTRAHIPPOCAMPÁLIS MIKROINJEKCIÓJÁNAK HATÁSA A HIPPOCAMPÁLIS NYOMELEMSZINTEKRE
Túlélési idő: 2 nap

Dózis (nmol)		Nyomelem-szint ($\mu\text{g/g}$ száraz szövet)	Kontroll oldal	Injektált oldal
5	Hippocampus dorsális része	Zn	91.82 \pm 2.85(7)	94.85 \pm 1.99(7)
		Fe	72.26 \pm 2.80(7)	74.04 \pm 3.26(7)
		Cu	11.44 \pm 0.54(7)	11.68 \pm 0.99(6)
10	Teljes hippocampus	Zn	86.00 \pm 1.21(9)	82.04 \pm 1.81(9)
		Fe	75.22 \pm 2.06(7)	76.65 \pm 4.80(7)
		Cu	9.37 \pm 0.24(9)	7.96 \pm 0.34(9)

Átlagérték \pm S.E.M.

Zárójelben a kísérletek számát tüntettük fel.

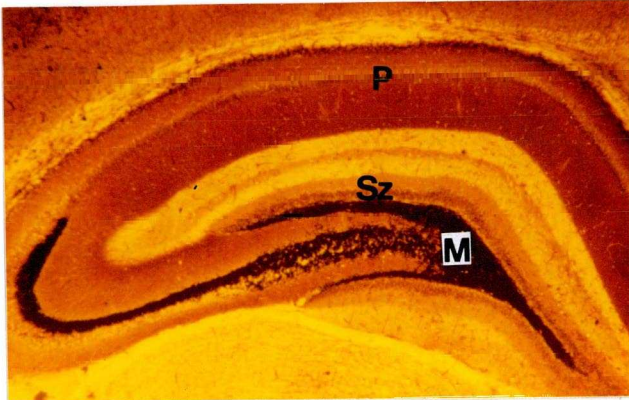


3.6.3. Kolhicin kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére

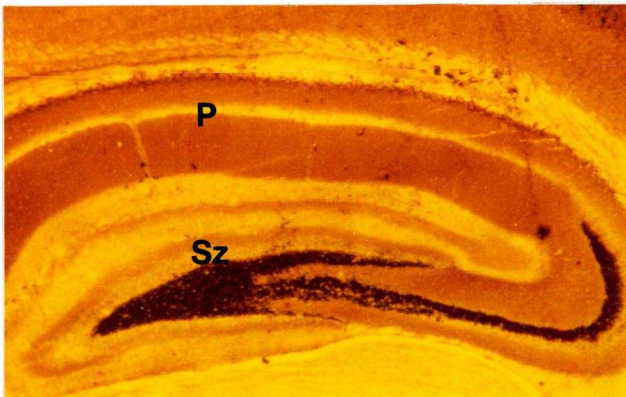
20 µg kolhicin unilaterális intrahippocampális injektlása után 2 nappal a kontroll, kontralaterális oldali hippocampus jellegzetes nyomelem festődése megmarad (19.Ábra).

Az injektlált oldali hippocampusban -- szintén 2 nappal a kezelés követően -- az area dentata szemcsesejtjeinek nagymértékű festődés csökkenése látható, s a moharostok zónája keskenyebbé válik (20.Ábra). Ezzel egyidejűleg azonban a régió superior piramissejt rétegéből teljesen eltűnik a nyomelemekre utaló festődés. 7 nap múlva, miután kolhicin hatására nem degenerálódnak a CA1-CA2 régiók piramissejtjei, az injektlált oldali hippocampusban (21.Ábra) ismét megjelenik a piramissejtek Timm festődése, azonban a nem injektlált oldalinnál gyengébb intenzitással. Ugyanakkor a str. radiatum festődése némileg csökken a normál hippocampushoz képest.

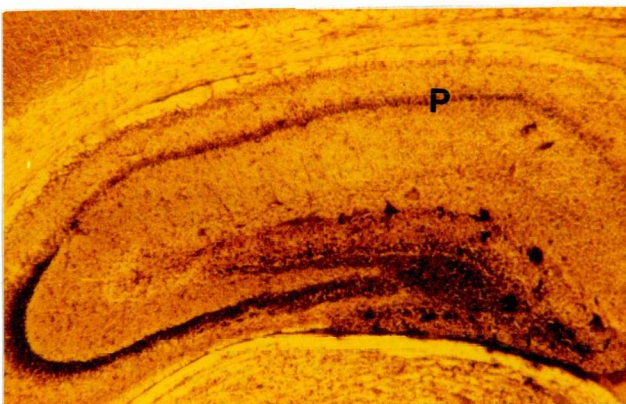
Atomabszorpciós spektrofotometriás vizsgálataink (VIII.TÁBLÁZAT) azt mutatják, hogy a kolhicin intrahippocampális injektlálása után 2 nappal -- amikor a szemcsesejtek és a moharostok festődése csökkent, a régió superior piramissejtjeiből pedig teljesen eltűnt -- az injektlált oldali hippocampus cink-, vas- és rézszintje nem változik meg szignifikánsan ($p > 0.05$) a nem injektlált oldalinnal, mint kontrollhoz képest.



19.Ábra: A nem injektált, kontroll oldali hippocampusban a szemcse- (Sz) és piramissejtek (P), valamint a moharostok (M) intenzíven festődnek. Túlélés: 2 nap. X 100



20.Ábra: Kolhicin hatása a hippocampus nyomelem festődésére. A szemcsesejtek (Sz) és a régió superior piramissejtjeinek (P) festődése csökkent ill. eltűnt. Túlélés: 2 nap. X 128



21.Ábra: Kolhicin hatása a hippocampus Timm festődésére. 7 nap után ismét festődnek a piramissejtek (P). X 128

VIII. TÁBLÁZAT: 20 µg KOLHICIN UNILATERÁLIS INTRAHIPPOCAM-
PÁLIS INJEKTÁLÁSÁNAK HATÁSA A PATKÁNY HIPPO-
CAMPUS NYOMELEMSZINTJÉRE.

Túlélési idő: 2 nap

	Zn	Fe	Cu
Kontroll	16.07 [±] 0.15	14.51 [±] 0.34	2.50 [±] 0.06
Kezelt	16.12 [±] 0.23	14.68 [±] 0.52	2.33 [±] 0.08

Valamennyi érték µg/g nedves szövetben kifejezve [±]S.E.M.
Kísérletek száma: 8

4. MEGBESZÉLÉS

Elvégzett kísérleteink célja az volt, hogy demonstráljuk a hippocampális nyomelemek lokalizációját normál körülmények között felnőtt állatban, valamint az ontogenetikus fejlődés folyamán.

Vizsgáltuk a krónikus cinkhiány, valamint a sebészeti és kémiai léziók hatását a hippocampus nyomelem festődésére és nyomelemszintjére. Ennek alapján azt kívántuk tisztázni, hogy melyik neurotranszmitter rendszerrel hozható összefüggésbe a kiugróan magas szöveti nyomelemszint a hippocampusban.

4.1. A nyomelemek normál szöveti lokalizációja a hippocampusban

Timm (1958) módszerével végzett hisztokémiai megfigyeléseink szerint a hippocampális nyomelemek döntő többsége az area dentata moharost rendszerében lokalizálható. Autoradiográfiás (Crawford és Connor, 1972), cink-ditizonát festésen alapuló (Frederickson és mtsai., 1981) és atomabszorpciós spektrofotometriás (Hu és Friede, 1968) tanulmányok szerint a hippocampális cink főleg ugyanebben a régióban lokalizálható, következésképpen az area dentata hulusának és a CA3-CA4 régiók szupra- és infrapiramidális moharost rétegeinek intenzív Timm festődéséért elsősorban a moharost neuropil magas cinktartalma a felelős.

Az area dentata szemcsesejtjeinek és a régió superior piramissejtjeinek élénk nyomelem festődése ezzel szemben döntően a perikaryonálisan lokalizálható nyomelemeknek tudható be (Kozma és mtsai., 1978).

4.2. A cink és réz differenciált hisztokémiai kimutatása a hippocampusban

Eredményeink szerint (Kozma és mtsai., 1981b) a TCA kezeléssel kombinált Timm módszer újabb lehetőséget kínál a szöveti nehézfémek hisztokémiai vizsgálatához. A TCA ugyan nem oldja ki maradéktalanul a cink- és vasszulfidokat (Kaltenbach és Eger, 1966), mégis e fémek jelentős részének eltávolítása megkönnyíti a réz ugyanazon metszeten történő,

differentiált hisztokémiai lokalizálását.

Nickolson és Veldstra (1972) vizsgálatai azt mutatják, hogy a cink a citoskeletális fehérjék, elsősorban a neurotubulusok fő membrán proteinjének felépítésében fontos szerepet tölt be. Mivel a tubulin subunit protein a szinaptoplazmában koncentrálnak (bár előfordul a szinaptikus plazmamembránhoz kötve, a szinaptikus junctionokban és a szinaptikus vezikulákban is) (Babitch, 1981), feltehető, hogy elsősorban a szinaptoplazmatikusan lokalizálható cink oldódik ki a TCA kezelés hatására.

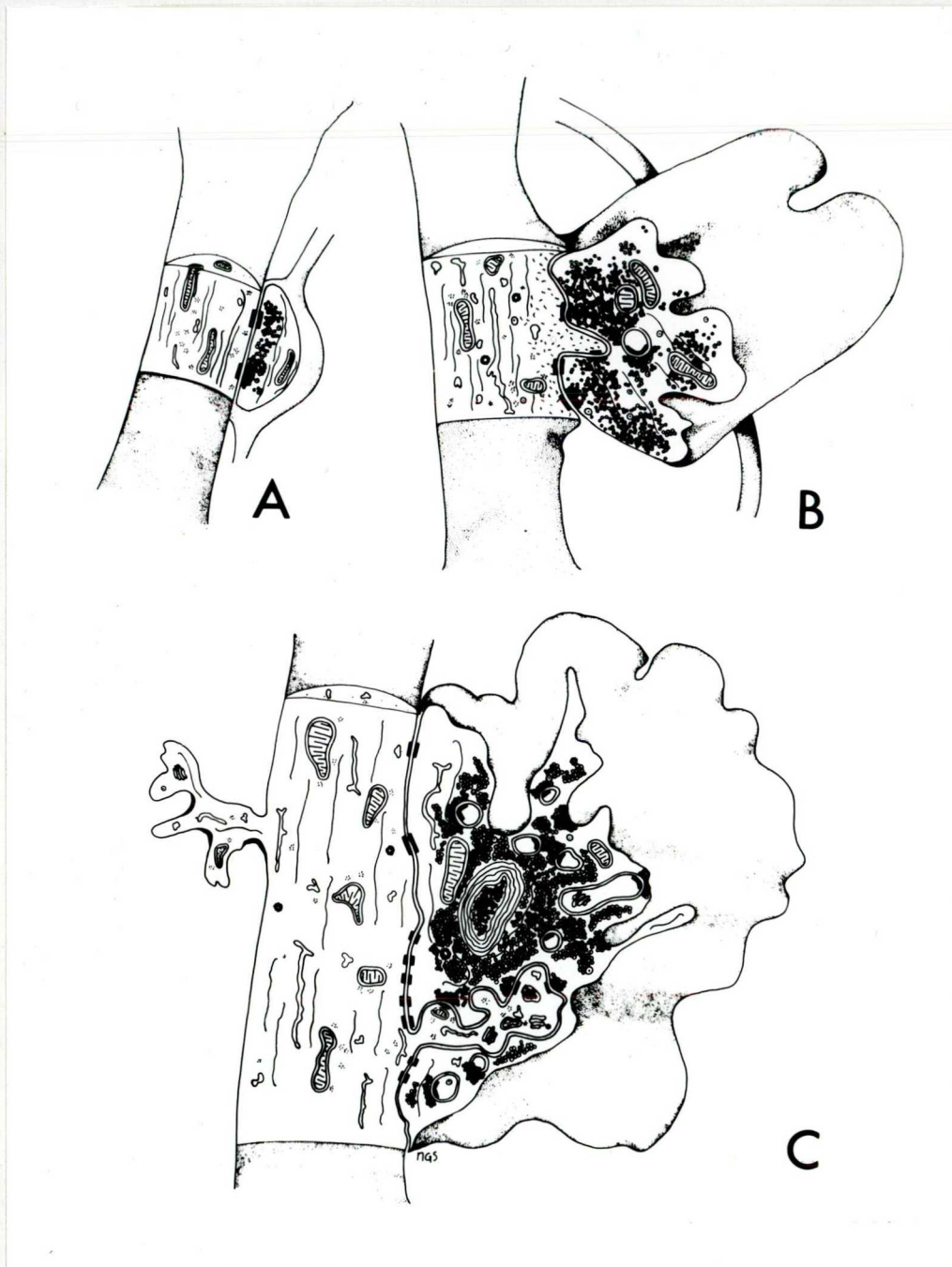
A réz ugyanakkor elsődlegesen a perikaryonális és a dendritikus citoplazmában ill. a mitokondriumokban lokalizálható, tehát a TCA kezelés után a piramissejtek és a szemcsesejtek szómájában visszamaradó festődés valószínűleg a réz jelenlétével hozható összefüggésbe. Az area dentata hilusának TCA kezelés után visszamaradó halvány festődése valószínűleg a NA-erg axonokban és terminálisaikban lokalizálható dopamin- β -hidroxiláz (DBH) aktivitással összefüggő rézre utal (Danscher és mtsai., 1973).

4.3. A nyomelemek strukturális lokalizációja és mennyiségük változása normál hippocampusban az ontogenetikus fejlődés folyamán

Atomabszorpciós spektrofotometriás vizsgálataink szerint a hippocampus cinkszintjében a 11. és 20. posztnatális napok között következik be a legnagyobb mértékű emelkedés (közel 40%-os), ami a moharost rendszer érésével hoz-

ható elsősorban összefüggésbe. Lényeges megjegyezni, hogy a cinkkoncentráció a 20. napon sem éri el még a felnőttkori értékét, hanem további lassú emelkedéssel közelíti meg azt. Crawford és Connor (1972) kvantitatív nyomelemszint méréseik alapján a születés utáni 18.-22. napok közé helyezték a moharost rendszer funkcionális beérését (ebben az időszakban a cinkszint 35%-os emelkedését tapasztalták, a fehérjetartalomra vonatkoztatva). A 22 napos hippocampus cinkszintjét a felnőttkorival azonosnak találták, bár közti időpontra vonatkozó adatuk nincs. Eredményeik ugyanakkor nem korrelálnak a morfológiai (ultrastrukturális) és Timm hisztokémiai módszerével végzett ontogenetikus tanulmányok adataival.

Amaral és Dent (1981) alapos ultrastrukturális tanulmányukban végigkövetik a moharost rendszer morfológiai fejlődését (22.Ábra). Az 1. és 3. napok között (22.A Ábra) kicsi, szférikus moharost expanziókat irtak le, amelyek a piramis-sejtek apikális dendritjein szimmetrikus és aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatokat létesítenek. Méretük a 9. napig növekszik, azonban továbbra is szférikusak maradnak. A 9. naptól (22.B Ábra) megkezdődik a dendritikus citoplazma ujjszerű benövése a moharost terminálisokba, s a dense vezikulák száma egyre növekszik. Az ujjszerű benövéseken aszimmetrikus szinapszisok láthatók. A 14. naptól a 21. napig terjedő periódusban (22.C Ábra) rohamosan nő az invaginációk és ezzel együtt az aszimmetrikus, de különösen a dendritfán látható szimmetrikus kapcsolatok száma.



22.Ábra: A moharost terminálisok morfológiai fejlődése a posztnatális első 3 hét alatt (Amaral és Dent, 1981 nyomán). A: 1.-3. nap között, B: 9.-14. nap, C: 14.-21. napok közötti időszakban.

A dendritikus citoplazmában ekkor akkumulálódnak a különböző sejtalkotók: a tüskeapparátus, a multivezikuláris testek, mitokondriumok, riboszóma, simafelszínű endoplazmás retikulum stb. A 21. napon a moharost terminális képe morfológiailag lényegében megegyezik a felnőttkorival, a moharost expansió a kor előrehaladtával azonban folytatódik felnőttkorban is.

Zimmer és Haug (1978) fénymikroszkópos nyomelem hisztokémiai módszerrel követték nyomon a hippocampus nyomelem festődésének változását posztnatálisan. Eredményeik szerint a moharost terminálisok száma, mérete és festődésintenzitása a 12. és a 18. napok között ugrásszerűen emelkedik, s ezáltal megközelíti a felnőttkorra jellemző képet. Bliss és mtsai. (1974) elektrofiziológiai módszerrel vizsgálták a moharost rendszer funkcionális fejlődését. Megállapították, hogy a moharost terminálisok ill. a szinapszisok a 10. naptól kezdik elnyerni felnőttkori karakterüket, de az érett terminálisokra jellemző 'spike' csoportok csak a 15. naptól kezdve figyelhetők meg.

Összefoglalva a leirtakat, megállapíthatjuk, hogy eredményeink jó egyezést adnak más szerzők morfológiai, hisztokémiai és fiziológiai vizsgálatainak adataival. A cink domináns szerepet tölt be a hippocampus fejlődésében a 11. és 20. napok között. A moharost terminálisok érésének utolsó szakaszában, a posztnatális 11. és 14. napok között különösen magas arányban van jelen a cink a hippocampusban, más nyomelemekhez viszonyítva. A hippocampális cinkszint az area dentata szemcsesejtjeinek és moharost terminálisaik érésével

párhuzamosan, az első 3 posztnatális hét alatt (Altman és Bayer, 1975; Hine és Das, 1974) közelíti meg felnőttkori értékét.

Bizonyos fokú korreláció tapasztalható a cinkszint ontogenetikus változása és a kolinerg szinaptogenezis folyamata között a hippocampusban. A CAT aktivitás a 11. napon még a gyrus dentatus valamennyi rétegében alacsony és a felnőttkori értéket a 16.-17. napok körül bekövetkező gyors emelkedéssel közelíti meg (Nadler és mtsai., 1974). (E gyors változást nem követi az AChE aktivitás hasonló mértékű megnövekedése). Nem találtunk viszont összefüggést a cinkszint ontogenetikus változása és a hippocampus NA-erg innervációjának kialakulása között (Loy és Moore, 1979).

A vaskoncentrációk alakulását vizsgálva szembetűnő, hogy az embrionális 17. napon mért érték (ami a felnőttkori értéket is meghaladja) a posztnatális 3. napig több mint 200%-kal csökken. Ez arra utalhat, hogy az embrio hippocampusában a hisztogenezis folyamata magas vasszintek mellett indul meg, amit intrauterin körülmények között az anya vérkeringése biztosít számára. A Timm módszer alkalmazatlan a születés utáni első napok rendkívül magas vasszintjének demonstrálására, mivel a hemoglobinban és a mitokondriális citokrómokban levő vas a szulfid-ezüst impregnációs technikával kimutathatatlan (Danscher és Zimmer, 1978).

A születés utáni 3. naptól kezdve azután fokozatosan éri el a hippocampus felnőttkori vaskészletét, ami összhangban van Hallgren és Sourander (1958) eredményeivel.

A hippocampusban elsősorban a citokróm-oxidáz, a MAO, továbbá a DBH aktivitásával hozható összefüggésbe a réz jelenléte, mivel az részt vesz ezeknek az enzimeknek a felépítésében vagy aktiválásában (Scheinberg és Sternlieb, 1975).

Eredményeink azt mutatják, hogy a hippocampus rézszintje az ontogenetikus fejlődés folyamán fokozatosan emelkedve éri el a felnőttkorra jellemző értéket, összehangban Kofod (1970) adataival. Szignifikáns korrelációt tapasztaltunk a hippocampális rézszint és az endogén NA szint ontogenetikus változása között (Loy és Moore, 1979).

A hippocampus mangánszintje a születés utáni első 3 hét alatt folytonosan emelkedik, majd ettől kezdve csökken. A mangánszint valószínűleg kapcsolatba hozható az agyi glutaminsav metabolizmussal, mivel Balakrishnan és Villafranca (1978) kutatásai azt mutatják, hogy a Mn^{2+} a glutamin-szintetáz enzim felépítésében, tehát a glutaminsav \rightarrow glutamin átalakítás folyamatában részt vesz. Crawford és Connor (1973), Iversen és Storm-Mathisen (1976), valamint Storm-Mathisen és Iversen (1979) szerint a glutamát a moharost terminálisok egy részének transzmitter anyaga. Nem lehet véletlen, hogy a mangánnak a moharost terminálisok érési stádiumában (a poszt-natális 11. és 20. napok között) meghatározó szerepe van. Vizsgálataink szerint ebben az időszakban a mangánszint a felnőttkori értéknél 64%-kal magasabb, ami arra utalhat, hogy a mangán a moharost terminálisok működésének beindulásához elengedhetetlenül szükséges.

4.4. Krónikus cinkhiány hatása a hippocampális nyomelem-
szintre és szubcelluláris megoszlására, valamint a
CAT és AChE aktivitásra

Fénymikroszkópos hisztokémiai eredményeink szerint a 11 és 21 napos hippocampus Timm festődése cinkhiányban a megfelelő korú normál hippocampusénál gyengébb. Elsősorban a moharost neuropil (főleg a supra- és infragranuláris moharost réteg) és a CA3 szinaptikus régió Timm reakciója halványabb a cinkhiányos hippocampusban, a kontrollhoz viszonyítva. Más rétegek festődése között nem tapasztalható ilyen fokú intenzitásbeli különbség, a két csoportot összevetve. Dreosti és mtsai (1981) szerint is a korai posztnatális cinkhiány elsősorban a moharostok nyomelem festődését csökkenti. Buell és mtsai. (1977) viszont nem találtak lényegi eltérést a 21 napos kontroll és cinkhiányos hippocampus Timm festődése között.

Timm módszerével végzett hisztokémiai vizsgálataink szerint a kísérletes cinkhiány elsősorban a kisagyi neurohisztogenezisben okoz zavart, de hatással van más idegi strukturák (pl. nagyagykéreg piramissejtjei) nyomelemeinek intracelluláris elrendeződésére is (Kozma és Szerdahelyi, 1982). Atomabszorpciós vizsgálataink arról is tanúskodnak, hogy a cinkhiány csak olyan területen képes megzavarni a neuronális strukturák normális ontogenetikus fejlődését (pl. kisagyban), amelynek fejlődése éppen az adott időszakban erőteljes ill. érzékeny a nem megfelelő táplálási behatásokkal szemben (Szerdahelyi és mtsai., 1982).

A posztnatálisan kialakított cinkhiány az általános növekedésben való lemaradás mellett a központi idegrendszerben reverzibilis biokémiai változásokat és neurológiai rendellenességeket idéz elő; azonban irreverzibilis idegrendszeri károsodásokat is okozhat, attól függően, hogy a nem kielégítő táplálás az adott idegi strukturát fejlődésének melyik szakaszában éri (Warkany és Petering, 1973; Fosmire és mtsai., 1975; Golden és Golden, 1981).

A cinkhiány agyi fehérjeszintézist gátló hatása a teljes agy és a hippocampus súlyában bekövetkező mintegy 25-30%-os redukcióban nyilvánul meg, összhangban Sandstead és mtsai. (1972); Prohaska és mtsai. (1974); Fosmire és mtsai. (1975) eredményeivel. Bár a hippocampus homogenátumának és a belőle nyert szubcelluláris frakciók fehérje koncentrációjában nincs lényeges eltérés a kontroll és a cinkhiányos csoport között (Szerdahelyi és mtsai., 1982), mégis a teljes hippocampusra vonatkoztatott fehérjetartalom szignifikánsan csökkent a szövet súlycsökkenése következtében. A hippocampus homogenátumának cinkszintje sem változik a cinkhiány következtében és a cinktartalom csökkenése csak a szövet teljes súlyára vonatkoztatva válik szembetűnővé. Ezt támasztják alá Prohaska és mtsai. (1974), valamint Dreosti és mtsai. (1981) eredményei is.

Eltérést találtunk viszont a cinktartalom szubcelluláris megoszlásában a kontroll és a cinkhiányos csoport között. 20 napos korban csupán az S₂ felülúszóban mértünk a kontrollénál mintegy 20%-kal alacsonyabb cinkszintet.

Ez a citoplazmatikusan lokalizálható cinktartalom cinkhiány hatására bekövetkező csökkenését valószínűsíti. A P_1 és P_2 frakciók cinkszintje a 20. napon viszont cinkhiányban sem tér el lényegesen a kontrollétól. A 30 napos S_2 és P_2 frakciók cinkszintje mindkét vizsgált csoportban közel azonos. A P_1 un. nyers magfrakció cinkkoncentrációja azonban cinkhiányban mintegy 50%-kal magasabb a kontrollénál. E tény különösen érdekessé válik, ha figyelembe vesszük, hogy a moharostok axonvégződéseinek nagy dimenziójuk következtében a P_1 nyers magfrakcióban ülepednek ki (Crawford és Connor, 1972). Megfigyelésünk azt valószínűsíti, hogy cinkhiányban a neuronális cinktartalom a perikaryonban és/vagy a moharost terminálisokban feldúsul.

Eredményeink szerint a krónikus cinkhiány -- habár lényegében nem változtatja meg a hippocampális cinkszintet -- mégis változást képes előidézni a cinktartalom szubcelluláris eloszlásában és ennek következtében megváltozhat a moharostok neuronális működése is (Hesse, 1979).

Az önálló táplálkozás megkezdésének időszakában a hippocampus AChE aktivitására már nincs befolyással a posztnatálisan létrehozott cinkhiány. Sereni és mtsai (1966), valamint a Gambetti és mtsai. (1972) azt találták, hogy a posztnatális táplálási behatásokra nem változik szignifikánsan a cerebrum AChE aktivitása, viszont az enzim teljes aktivitása csökken. Kizárólag a kisagyban figyelték meg az AChE aktivitás szignifikáns csökkenését is a posztnatális 24. napon, ami e régió táplálkozási behatásokkal szembeni nagyobb érzékenységére utal.

4.5. A fimbria átmetzésének hatása a hippocampus nyomelem-szintjére

A fimbria átmetzésével azokat a kolinerg afferens rostokat is átmetzettük, amelyek a septum mediális magjából erednek és amelyek a gyrus dentatus hilusában, továbbá közvetlenül a régió inferior piramissejt rétege felett és alatt végződnek (Raisman, 1966; Lewis és mtsai., 1967). Enzimhisztokémiai módszerrel is demonstráltuk az AChE aktivitás csökkenését a fimbria transzsekcio után 7 nappal, az area dentata hilusában és a szupragranuláris rétegben, összhangban mások eredményeivel (Shute és Lewis, 1966; Mellgren és Srebro, 1973; Mosko és mtsai., 1973; Matthews és mtsai., 1974). Az AChE aktivitás a septális deafferentálás hatására mintegy 80%-kal, a CAT aktivitás 87%-kal szignifikánsan csökkent a léziós oldali hippocampusban. Más szerzők, biokémiai módszert alkalmazva, a kolinerg enzimek aktivitásának hasonló mértékű, erőteljes csökkenését írják le (Storm-Mathisen, 1970; Oderfeld-Nowak és mtsai., 1974).

A hippocampus kolinerg axonterminálisainak az area dentata hilusában és a szupragranuláris rétegben a septális deafferentálás hatására bekövetkező degenerációja hisztokémiai vizsgálataink szerint a hippocampus egyik régiójában sem okoz festődéscsökkenést vagy kiesést. Atomabszorpciós eredményeink szintén azt bizonyítják, hogy a kolinerg deafferentálás nem változtatja meg szignifikánsan a hippocampális cink- és rézszintet.

Korábban Haug és mtsai. (1971) arról számoltak be, hogy az area dentata mechanikus léziójával előidézett anterográd degeneráció után 24 órával a moharostok Timm festődésében némi redukció következett be. Megfigyeléseinket azonban nem egészítették ki kvantitatív nyomelemszint mérésekkel.

Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a hippocampus extrém magas cinktartalma nem kolinerg axonterminálisokban lokalizálódik, tehát a moharost terminálisok túlnyomó része nem kolinerg elem (Szerdahelyi és mtsai., 1980).

A fimbria átmetszésével a hippocampális formációt nemcsak kolinerg afferensétől fosztottuk meg, hanem a struktúra fő DA-, 5-HT- és HA-erg innervációját is megszüntettük (részletesen lásd az 1.2. pontban). A cink és réz hippocampális szintjét tehát nem befolyásolja a hippocampus legfontosabb DA-, 5-HT- és HA-erg afferentációjának megszüntetése.

4.6. Kémiai anyagok intracerebrális alkalmazása során bekövetkező nyomelemszint változások a hippocampusban

Különböző kémiai ágensek (6-OHDA, kainsav, kolhicin) által létrehozott léziók hippocampális nyomelemszintre gyakorolt hatását, s ezzel párhuzamosan a nyomelem festődés változását vizsgáltuk.

4.6.1. 6-OHDA kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére

200 µg 6-OHDA (szabad bázis) icv injektálásával a centrális szimpatikus neuronok kémiai lézióját idéztük elő (Laverty és Taylor, 1970). Az icv alkalmazott 6-OHDA a központi idegrendszer valamennyi régiójában -- így a hippocampusban is -- a katekolaminok (NA, DA) gyors és hosszan tartó deplécióját idézik elő, az 5-HT szint érintetlenül hagyása mellett (Burkard és mtsai., 1969; Ungerstedt, 1970). A NA depléció a NA-erg idegvégződések degenerációjával jár, míg a DA-szint redukcióját nem követi a DA-erg axonterminálisok degenerációja (Bloom és mtsai., 1969).

A 6-OHDA kezelés után 7 nappal a degenerált axonok és axonterminálisok metszeteinken jól demonstrálhatók, elsősorban az area dentata hilusában, a szupra- és infrapiramidális rétegben, ahol a NA terminálisok nagy számban lokalizálhatók (Swanson és Hartman, 1975).

A centrális NA-erg neuronok degenerációját és az endogén NA-szint szükségszerű csökkenését nem követte a hippocampusban a nehézfémek (Zn, Fe, Cu) szintjének redukciója. Eredményeink így nem támasztják alá Colburn és Maas (1965); Rajan és mtsai. (1971) in vitro vizsgálatokon alapuló feltevéseit, miszerint az általunk is vizsgált nehézfémek (elsődlegesen a vas és a réz) a NA-nal és ATP-tal terner komplexet képezve részt vesznek a katekolaminok raktározásában és transzportjában, tehát a biogén aminok metabolizmusában és az általunk mediált neurotranszmissziós folyamatában is.

4.6.2. Kainsav kezelés hatása a hippocampális nyomelemszintre

A kainsav (KA) egy glutamát-analóg savas aminosav, amelynek neurotoxikus és neuroexcitatórikus hatása közismert (Olney és mtsai., 1974; Olney, 1978). Korábban úgy vélték, hogy a KA a GLU-receptorokhoz kötődve (Herndon és Coyle, 1977; McGeer és mtsai., 1978; Nadler, 1979) fejti ki az injiciálás helye közelében szelektíven a sejttestekre ható degeneráló hatását, miközben az afferens rostokat (és terminálisait), valamint az áthaladó rostokat megkíméli (Schwarcz és Coyle, 1977; Coyle és mtsai., 1978; Nadler, 1979). Ujabb kutatások azonban azt valószínűsítik, hogy a KA saját kötőhelyekkel rendelkezik (Schwarcz és Köhler, 1980; Krammer és mtsai., 1980; Henke és mtsai., 1981; Slevin és Coyle, 1981) és hogy nekrotikus hatása nem minden esetben szelektív, azaz csak a perikaryonra irányuló (Nadler és mtsai., 1981). Foster és mtsai. (1981) szerint a KA hippocampuson belüli fő kötőhelyei a CA3 régióban, a moharost terminálisok zónájában lokalizálódnak.

Kísérleteinkben az intrahippocampálisan adott KA (5 nmol) hatására a kontroll oldal CA3/4 régiójában is a Timm festődés csökkenését tapasztaltuk, normál hippocampushoz viszonyítva (Nadler és mtsai., 1978a). A kezelt oldali hippocampus nyomelem festődése legnagyobb mértékben a CA3/CA4 régió piramissejtjeinek rétegében, a szupra- és infrapiramidális, valamint a hiláris moharostokban csökkent.

A szemcsesejtekre és a régió superior piramisajtjeire kisebb mértékben hatott a KA mikroinjekció, Köhler és mtsai. (1978), Olney és mtsai. (1979), továbbá Nadler és mtsai. (1980) megfigyeléseivel összhangban.

Atomabszorpciós eredményeink -- hisztokémiai megfigyelésünkkel ellentétben -- azt mutatják, hogy 5 nmol KA még az injektált hippocampus dorsális részének cink-, réz- és vasszintjét sem képes befolyásolni, tehát a Timm festődés redukciójával párhuzamosan nem következik be a nyom-
elemek kiürülése a hippocampális formációból. 10 nmol KA is csupán a rézszint 15%-os, azonban mégis szignifikáns csökkenését volt képes előidézni (Szerdahelyi és mtsai., 1981).

Hasonló dózisban adott KA a hippocampális neurotranszmitter szinteket is befolyásolni képes. A hippocampus ASP, GLU, TAU és GABA szintje KA hatására mintegy 60-80%-kal csökken az injektált oldalon (Fonnum és Walaas, 1978; Schmid és mtsai., 1980), 2 nappal a kezelést követően. Az ACh szint ezzel szemben 100%-kal megnő a KA-injektált hippocampusban; a CAT aktivitás azonban változatlan marad (Schwarcz és mtsai., 1978). Mindez azzal lenne magyarázható, hogy az elhalt piramisajtkek helyén a kolinerg és katekolaminerg afferensek és terminálisaik burjánzása indul meg (Smiatowski és Smiatowska, 1981).

A KA által indukált lézió a hippocampusban a nem neuronális elemek (glia) proliferálódását is előidézi (Murabe és mtsai., 1982). Mivel korábbi vizsgálatokból (Ferde és



mtsai., 1978) ismeretes, hogy etanol hatására a kisagyi Purkinje sejtek nyomelem festődése a környező gliasejtekre transzlokálódik, feltehető, hogy KA hatására is a nyomelemek gliasejtekre történő transzlokációja következik be. Valószínűleg a neuroglia proliferálódása idézi elő, hogy KA hatására a moharost rendszer posztszinaptikus elemeinek (CA3 és CA4 régiók piramissejtjeinek) degenerációja ellenére sem csökken kényegesen a hippocampus nyomelemszintje.

Mivel a KA hatására -- a moharostok degenerációja következtében -- a moharost rendszer nyomelem festődés csökkenésével párhuzamosan az endogén GLU szint is nagymértékben csökken, feltehető, hogy a szemcsesejtek és terminálisaik transzmitteranyaga a GLU.

4.6.3. Kolhicin kezelés hatása a hippocampus nyomelemszintjére

A kolhicin intrahippocampális injekciójával patkányban a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek (tehát a moharost rendszer preszinaptikus elemeinek) degenerációját lehet előidézni (Goldschmidt és Steward, 1978), aminek következtében a szemcsesejtek és a moharostok Timm festődése csökken (Nadler és Cuthbertson, 1980), fénymikroszkópos hisztokémiai megfigyeléseinkkel összhangban. 2 nappal a kezelés után a régió superior piramissejtjeinek nyomelem festődése eltűnt, majd

a 7. napon ismét megjelent. AAS vizsgálataink azt mutatják, hogy 2 nappal a kolhicin intrahippocampális injektálása után -- amikor a szemcsesejt réteg festődése csökkent, a moharost neuropil zóna keskenyebb lett és a régió superior piramissejtjeiből teljesen eltűnt a nyomelemekre utaló festődés -- az injektált oldali hippocampus nyomelemszintje lényegében változatlan maradt (Szerdahelyi, 1982).

A kolhicin hatására bekövetkező Timm festődés redukció -- akárcsak a KA kezelés során -- nem jár együtt a nyomelemek hippocampális formációból történő kiürülésével. Ennek valószínű magyarázata az lehet, hogy a kolhicin (ill. a KA) hatására degenerálódó idegi struktúrák nyomelemtartalma más neuronális vagy nem neuronális szövetalkotókra, esetleg a hippocampus más rétegeibe tevődik át. Bár a piramissejt réteg, a granuláris réteg és a moharost rendszer festődéscsökkenésével párhuzamosan más rétegek festődése nem erősödik láthatóan, mégis a nyomelemek intrahippocampális transzlokációját alátámasztja az a tény, hogy a Timm festődés nem képes hűen nyomon követni a nyomelemek lokalizációjának megváltozását. A nyomelemek transzlokációja ugyanis maga után vonhatja a szövethez kötődésük kémiai karakterének megváltozását, amitől hisztokémiai kimutathatóságuk függ (Haug és Danscher, 1971). Másrészt a Timm reakció és a valódi nyomelemszint között nincs abszolút korreláció, az intenzív festődés ugyanis szükségszerűen magas nyomelemszintre utal, e megállapítás megfordítottja viszont nem feltétlenül igaz (Danscher és mtsai., 1976; Danscher és

Zimmer, 1978). Otsuka és Kawamoto (1966) autoradiográfiás vizsgálatai is bizonyítják, hogy a hippocampus magas nyomelemtartalmú régiói mellett más rétegek is képesek a ^{65}Zn megkötésére.

A kolhicin hippocampális piramissejtek nyomelem festődésére gyakorolt hatását az is magyarázhatja, hogy hatására a Timm módszerrel festődő nehézfémeket kötő strukturák ill. fehérjék konformációs változáson mennek keresztül (Detrich és mtsai., 1981) és a nyomelemek hisztokémiai kimutathatósága azáltal hiúsul meg, hogy a HS^- ionok számára hozzáférhetetlenné válnak (Brunk és mtsai., 1968). Mivel a kolhicin a tubulin fő subunit proteinjének szulfhidril csoportjaihoz kötődik (Nickolson és Veldstra, 1972; Weisenberg és mtsai., 1968) és a cink kötőhelyei ugyanezek a strukturák (Edström és Mattsson, 1975; Kress és mtsai., 1981), valószínű, hogy a cink-kolhicin kompetitív interakciója felelős elsősorban a régió superior piramissejtjeinek átmenetileg eltűnő Timm festődéséért.

Eredményeink megerősítik továbbá azon korábbi elképzelésünket (Kozma és mtsai., 1981b), hogy a Timm módszerrel végzett hisztokémiai megfigyelések csakis kvantitatív nyomelemszint mérésekkel kombinálva értékelhetők teljes biztonsággal.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk célja az volt, hogy a cink (és más nehézfémek) hippocampális szintjét ill. azok normál és cinkhiányos állapotban vizsgált ontogenetikus fejlődését megpróbáljuk kapcsolatba hozni a struktúra fontosabb transzmitter rendszereivel. Vizsgálataink eredménye az alábbiakban összegezhető:

- 1./ Módszert dolgoztunk ki a cink és réz szöveten belüli differenciált hisztokémiai kimutatására és lokalizálására.
- 2./ Ontogenetikus vizsgálataink szerint a cinkszint poszt-natálisan bekövetkező, ugrásszerű megnövekedése a moharost rendszer beérésével egyidőben következik be. A cinkszint és a CAT aktivitás ontogenetikus változása között szintén korreláció valószínűsíthető. A hippocampális rézszint és az endogén NA szint ontogenetikus alakulása közötti hasonlóság a réz katekolaminok metabolizmusában betöltött szerepére utalhat. A mangán valószínűleg ugyancsak szükséges a moharost terminálisok egy részénél, működésük beindulási szakaszában.
- 3./ A krónikus cinkhiány nem képes a hippocampális cinkszint megváltoztatására (a struktúra cinktartalma azonban szignifikánsan csökken); viszont feltételezhető, hogy cinkhiányban megváltozik a cink szubcelluláris eloszlása.
- 4./ A septális (kolinerg) deafferentálás utáni változatlan nyomelemszint azt mutatja, hogy a hippocampus magas cinktartalma valószínűleg nem kolinerg axonterminálisokban lokalizálódik. A fimbria átmetszésével a hippocampust fő DA-erg, 5-HT-erg és HA-erg afferenseitől is megfosztottuk; a hippocampális nyomelemszint és a nyomelem festődés ennek ellenére lényegében változatlan maradt. A kémiai szimpatéktómia ugyancsak nem képes a hippocampális nyomelemszintet befolyásolni, így feltehető, hogy a moharost

terminálisok transzmittere nem a NA. Kainsav hatására az area dentata moharostjainak degenerációja következtében -- a nyomelem festődés csökkenésével párhuzamosan -- az endogén GLU szint is nagymértékben csökken, ami valószínűsíti, hogy a szemcsesejtek és terminálisaik transzmitteranyaga a GLU. Valószínűleg a KA kezelés hatására proliferálódott gliába történő nyomelem áttevődés miatt nem csökkent mégsem a hippocampális nyomelemszint.

- 5./ A moharost rendszer pre- és posztszinaptikus elemeire ható kémiai léziók által a hippocampus magas nyomelem-tartalmú régióiban előidézett negatív Timm reakció nem jelenti a nyomelemek hippocampális formációból történő kiürülését. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy nincs abszolút összefüggés a nyomelem festődés és az aktuális nyomelemszint között.



6. IRODALOMJEGYZÉK

- ALTMAN, J. and BAYER, S. (1975) Postnatal development of the hippocampal dentate gyrus under normal and experimental conditions. In: *The Hippocampus*, Vol.1. (Eds.: R.I. Isaacson and K.H. Pribram) Plenum Press, New York, pp. 95-122
- AMARAL, D.G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. comp. Neurol.* 182, 851-914
- AMARAL, D.G. and DENT, J.A. (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. comp. Neurol.* 195, 51-86
- BABITCH, J.A. (1981) Synaptic plasma membrane tubulin may be an integral constituent. *J. Neurochem.* 37, 1394-1400
- BALAKRISHNAN, M.S. and VILLAFRANCA, J.J. (1978) Distance determinations between the metal ion sites of *Escherichia coli* glutamine synthetase by paramagnetic resonance using Cr(III)-nucleotides as paramagnetic substrate analogues. *Biochemistry* 17, 3531-3533
- BETTGER, W.J. and O'DELL, B.L. (1981) A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.* 28, 1425-1438
- BLACKSTAD, T.W. and KJAERHEIM, A. (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J. comp. Neurol.* 117, 133-159
- BLISS, T.V.P., CHUNG, S.H. and STIRLING, R.V. (1974) Structural and functional development of the mossy fibre system in the hippocampus of the post-natal rat. *J. Physiol. (Lond.)* 239, 92P-94P
- BLOOM, F.E., ALGERI, S., GROPPETTI, A., REVUELTA, A. and COSTA, E. (1969) Lesions of central neopinephrine terminals with 6-OH-dopamine: biochemistry and fine structure. *Science* 166, 1284-1286

- BROWSTEIN, M., SAAVEDRA, J.M. and PALKOVITS, M. (1974)
Norepinephrine and dopamine in the limbic system of the
rat. *Brain Research* 79, 431-436
- BRUN, A. and BRUNK, U. (1970) Histochemical indications for
lysosomal localization of heavy metals in normal rat
brain and liver. *J. Histochem. Cytochem.* 18, 820-827
- BRUNK, U., BRUN, A. and SKÖLD, G. (1968) Histochemical
demonstration of heavy metals with the sulfide-silver
method. A methodological study. *Acta histochem.* 31,
345-357
- BUELL, S.J., FOSMIRE, G.J., OLLERICH, D.A. and SANDSTEAD, H.H.
(1977) Effects of postnatal zinc deficiency on
cerebellar and hippocampal development in the rat.
Exp. Neurol. 55, 199-210
- BURKARD, W.P., JALFFRE, M. and BLUM, J. (1969) Effect of
6-hydroxydopamine on behavior and cerebral amine content
in rats. *Experientia (Basel)* 25, 1295-1296
- CAJAL, S. Ramón Y. (1911) *Histologie du système nerveux de
l'homme et des vertébrés*, Vol. II. A. Maloine, Paris,
pp. 733-761
- CHVAPIL, M. (1976) Effect of zinc on cells and membranes.
Med. Clin. North Am. 60, 799-812
- COLBURN, R.W. and MAAS, J.W. (1965) Adenosine triphosphate-
-metal-norepinephrine ternary complexes and catecholamine
binding. *Nature (Lond.)* 208, 37-41
- COYLE, J.T., MOLLIVER, M.E. and KUCHAR, M.J. (1978) In situ
injection of kainic acid: a new method for selectively
lesioning neuronal cell bodies while sparing axons of
passage. *J. comp. Neurol.* 180, 301-324
- CRAWFORD, I.L. and CONNOR, J.D. (1972) Zinc in maturing rat
brain: hippocampal concentration and localization.
J. Neurochem. 19, 1451-1458

- CRAWFORD, I.L. and CONNOR, J.D. (1973) Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fibre pathway. *Nature (Lond.)* 244, 442-443
- CRAWFORD, I.L., DOLLER, H.J. and CONNOR, J.D. (1973) Diphenylthiocarbazono effects on evoked waves and zinc in the hippocampus. *Pharmacologist* 15, 197
- CUNNANE, S.C. and HORROBIN, D.F. (1980) Parenteral linoleic and γ -linolenic acids ameliorate the gross effects of zinc deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 164, 583-588
- DANSCHER, G. (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 71, 1-16
- DANSCHER, G., FJERDINGSTAD, E.J., FJERDINGSTAD, E. and FREDENS, K. (1976) Heavy metal content in subdivisions of the rat hippocampus (zinc, lead, and copper). *Brain Research* 112, 442-446
- DANSCHER, G., HAUG, F.-M.Š. and FREDENS, K. (1973) Effect of diethyldithiocarbamate (DEDTC) on sulphide silver stained boutons. Reversible blocking of Timm's sulphide silver stain for "heavy" metals in DEDTC treated rats (light microscopy). *Exp. Brain Res.* 16, 521-532
- DANSCHER, G. and ZIMMER, J. (1978) An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry* 55, 27-40
- DETRICH, H.W., III., WILLIAMS, R.C., Jr., MacDONALD, T.L., WILSON, L. and PUETT, D. (1981) Changes in the circular dichroic spectrum of colchicine associated with its binding to tubulin. *Biochemistry* 20, 5999-6005

- DREOSTI, I.E., MANUEL, S.J., BUCKLEY, R.A., FRASER, F.J. and RECORD, I.R. (1981) The effect of late prenatal and/or early postnatal zinc deficiency on the development and some biochemical aspects of the cerebellum and hippocampus in rats. *Life Sci.* 28, 2133-2141
- EDSTRÖM, A. and MATTSSON, H. (1975) Small amounts of zinc stimulate rapid axonal transport in vitro. *Brain Research* 86, 162-167
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. Jr. and FEATHERSTONE, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetyl-cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95
- EULER, C. von (1962) On the significance of the high zinc content in the hippocampal formation. In: *Physiologie de l'hippocampe.* (Ed.: P. Passouant), Coll. Intern. du C.N.R.S. no. 107., Paris, Ed. du Centre Nat. Rech. Scie., pp. 135-145
- FELLER, D.J. and O'DELL, B.L. (1980) Dopamine and norepinephrine in discrete areas of the copper-deficient rat brain. *J. Neurochem.* 34, 1259-1263
- FERKE, A., BÁNSÁGHY, K. and KOZMA, M. (1978) Investigation of neural zinc content and acetylcholinesterase activity in the central and peripheral nervous system. *Acta Pharm. Hung.* XLVIII. 48., Suppl. 89-91
- FERKE, A., KOZMA, M., BÁNSÁGHY, K. and KÁSA, P. (1979) Histochemical and atomic absorption demonstration of trace metal mobilization in the central nervous system and liver of the rat. *Histochemistry* 59, 295-303
- FJERDINGSTAD, E., DANSCHER, G. and FJERDINGSTAD, E.J. (1974) Zinc content in hippocampus and whole brain of normal rats. *Brain Research* 79, 338-342
- FLEISCHHAUER, K. and HORSTMANN, E. (1957) Intravitale Dithizonfärbung homologer Felder der Ammonsformation von Säugern. *Z. Zellforsch.* 46, 598-609

- FONNUM, F. (1969) Radiochemical microanalysis for the determination of cholinacetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Biochem. J.* 115, 465-472
- FONNUM, F. (1970) Topographical and subcellular localization of choline acetyltransferase in rat hippocampal region. *J. Neurochem.* 17, 1029-1037
- FONNUM, F., KARLSEN, R.L., MALTHE-SØRENSEN, D., SKREDE, K.K. and WALAAS, I. (1980) Localization of neurotransmitters, particularly glutamate, in hippocampus, septum, nucleus accumbens and superior colliculus. In: *Development and Chemical Specificity of Neurons, Progress in Brain Research Vol. 51*, (Eds.: M. Cuénod, G.W. Kreutzberg and F.E. Bloom), Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, pp. 167-191
- FONNUM, F. and WALAAS, I. (1978) The effect of intrahippocampal kainic acid injections and surgical lesions on neurotransmitters in hippocampus and septum. *J. Neurochem.* 31, 1173-1181
- FOSMIRE, G.J., AL-UBAIDI, Y.Y. and SANDSTEAD, H.H. (1975) Some effects of postnatal zinc deficiency on developing rat brain. *Pediat. Res.* 9, 89-93
- FOSTER, A.C., MENA, E.E., MONAGHAN, D.T. and COTMAN, C.W. (1981) Synaptic localization of kainic acid binding sites. *Nature (Lond.)* 289, 73-75
- FREDERICKSON, C.J., HOWELL, G.A. and FREDERICKSON, M.H. (1981) Zinc dithizonate staining in the cat hippocampus: relationship to the mossy-fiber neuropil and postnatal development. *Exp. Neurol.* 73, 812-823
- GAMBETTI, P., AUTILIO-GAMBETTI, L., GONATAS, N.K., SCHAFFER, B. and STIEBER, A. (1972) Synapses and malnutrition. Morphological and biochemical study of synaptosomal fractions from rat cerebral cortex. *Brain Research* 47, 477-484



- GOLDEN, M.H.N. and GOLDEN, B.E. (1981) Trace elements. Potential importance in human nutrition with particular reference to zinc and vanadium. *Br. Med. Bull.* 37, 31-36
- GOLDSCHMIDT, R. and STEWARD, O. (1978) Destruction of granule cells in the dentate gyrus and cerebellar cortex of adult rats following injections of colchicine. *Neurosci. Abstr.* 4, 221
- GRAY, E.G. and WHITTAKER, V.P. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat. (Lond.)* 96, 79-88
- GREENWOOD, R.S., GODAR, S.E., REAVES, T.A., Jr. and HAYWARD, J.N. (1981) Cholecystokinin in hippocampal pathways. *J. comp. Neurol.* 203, 335-350
- HALLGREN, B. and SOURANDER, P. (1958) The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J. Neurochem.* 3, 41
- HANDELMANN, G., MEYER, D.K., BEINFELD, M.C. and OERTEL, W.H. (1981) CCK-containing terminals in the hippocampus are derived from intrinsic neurons: an immunohistochemical and radioimmunological study. *Brain Research* 224, 180-184
- HAUG, F.-M.Š. (1967) Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie* 8, 355-368
- HAUG, F.-M.Š. (1973) Heavy metals in the brain. A light microscope study of the rat with Timm's sulphide silver method. Methodological considerations and cytological and regional staining patterns. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 47, Fasc. 4, 1-71
- HAUG, F.-M.Š., BLACKSTAD, T.W., SIMONSEN, A.H. and ZIMMER, J. (1971) Timm's sulfide silver reaction for zinc during experimental anterograde degeneration of hippocampal mossy fibers. *J. comp. Neurol.* 142, 23-32

- HAUG, F.-M.Š. and DANSCHER, G. (1971) Effect of intravital dithizone treatment on the Timm sulfide silver pattern of rat brain. *Histochemie* 27, 290-299
- HENKE, H., BEAUDET, A. and CUÉNOD, M. (1981) Autoradiographic localization of specific kainic acid binding sites in pigeon and rat cerebellum. *Brain Research* 219, 95-105
- HENKIN, R.I., PATTEN, B.M., RE, P.K. and BRONZERT, D.A. (1975) A syndrome of acute zinc loss. Cerebellar dysfunction, mental changes, anorexia, and taste and smell dysfunction. *Arch. Neurol.* 32, 745-751
- HERNDON, R.M. and COYLE, J.T. (1977) Selective destruction of neurons by a transmitter agonist. *Science* 198, 71-72
- HESSE, G.W. (1979) Chronic zinc deficiency alters neuronal function of hippocampal mossy fibers. *Science* 205, 1005-1007
- HINE, R.J. and DAS, G.D. (1974) Neuroembryogenesis in the hippocampal formation of the rat. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* 144, 173-186
- HJORTH-SIMONSEN, A. and JEUNE, B. (1972) Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. comp. Neurol.* 144, 215-232
- HU, K.H. and FRIEDE, R.L. (1968) Topographic determination of zinc in human brain by atomic absorption spectrophotometry. *J. Neurochem.* 15, 677-685
- IBATA, Y. and OTSUKA, N. (1969) Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide-silver technique. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 171-175
- IVERSEN, L.L. and STORM-MATHISEN, J. (1976) Uptake of (³H)glutamic acid in excitatory nerve endings in the hippocampal formation of the rat. *Acta physiol. scand.* 96, 22A-23A

- KALTENBACH, Th. und EGER, W. (1966) Beiträge zum histochemischen Nachweis von Eisen, Kupfer und Zink in der menschlichen Leber unter besonderer Berücksichtigung des Silbersulfid-Verfahrens nach Timm. Acta histochem. 25, 329-354
- KÁSA, P. (1978) Distribution of cholinergic neurones within the nervous system revealed by histochemical methods. In: Synaptic Transmission (Ed.: D. Biesold), Leipzig, pp. 45-55
- KÁSA, P. and CSILLIK, B. (1966) Electron microscopic localization of cholinesterase by a copper-lead-thiocholine technique. J. Neurochem. 13, 1345-1349
- KEMP, K. and DANSCHER, G. (1979) Multi-element analysis of the rat hippocampus by proton induced X-ray emission spectroscopy (phosphorus, sulphur, chlorine, potassium, calcium, iron, zinc, copper, lead, bromine and rubidium). Histochemistry 59, 167-176
- KOELLE, G. B. and FRIEDENWALD, J. S. (1949) Histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 617-619
- KOFOD, B. (1970) Iron, copper and zinc in rat brain. Eur. J. Pharmacol. 13, 40-45
- KOZMA, M., FERKE, A. and KÁSA, P. (1978) Ultrastructural identification of neural elements containing trace metals. Acta histochem. 62, 142-154
- KOZMA, M. and SZERDAHELYI, P. (1982) Zinc deficiency-induced trace element concentration and localization changes in the central nervous system of albino rat during postnatal development. I. Optical microscopic histochemical examinations. Acta histochem. 70, 54-61
- KOZMA, M., SZERDAHELYI, P. és KÁSA, P. (1981a) A cink és réz hisztokémiai kimutatása a központi idegrendszer különböző neuronjaiban. Kisérletes Orvostudomány 33, 245-250

- KOZMA, M., SZERDAHELYI, P. and KÁSA, P. (1981b) Histochemical detection of zinc and copper in various neurons of the central nervous system. *Acta histochem.* 69, 12-16
- KÖHLER, C., SCHWARCZ, R. and FUXE, K. (1978) Perforant path transections protect hippocampal granule cells from kainate lesion. *Neurosci. Lett.* 10, 241-246
- KRAMMER, E.B., LISCHKA, M.F. and SIGMUND, R. (1980) Neurotoxicity of kainic acid: evidence against an interaction with excitatory glutamate receptors in rat olfactory bulbs. *Neurosci. Lett.* 16, 329-334
- KRESS, Y., GASKIN, F., BROSNAN, C.F. and LEVINE, S. (1981) Effects of zinc on the cytoskeletal proteins in the central nervous system of the rat. *Brain Research* 220, 139-149
- LAATSCH, R.H. and COWAN, W.M. (1966) Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. *J. Comp. Neurol.* 128, 359-396
- LAURBERG, S. and SØRENSEN, K.E. (1981) Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fascie dentatae and subfield CA3). *Brain Research* 212, 287-300
- LAVERTY, R. and TAYLOR, K.M. (1970) Effects of intraventricular 2,4,5-trihydroxyphenylethylamine (6-hydroxydopamine) on rat behaviour and brain catecholamine metabolism. *Br. J. Pharmac.* 40, 836-846
- LEWIS, P.R. (1961) The effect of varying conditions in the Koelle technique. *Bibliotheca Anat.* 2, 11-20
- LEWIS, P.R. and SHUTE, C.C.D. (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90, 521-540

- LEWIS, P.R., SHUTE, C.C.D. and SILVER, A. (1967) Confirmation from choline acetylase analyses of a massive cholinergic innervation to the rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 191, 215-224
- LINDVALL, O. and BJÖRKLUND, A. (1978) Organization of the catecholamine neurons in the rat CNS. In: *Handbook of Psychopharmacology Vol. 9.* (Eds.: L.L. Iversen, S.D. Iversen and S.H. Snyder), Plenum Press, New York, pp. 192-194
- LORENTE de NÓ, R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neur. (Leipzig)* 46, 113-177
- LOY, R. and MOORE, R.Y. (1979) Ontogeny of the noradrenergic innervation of the rat hippocampal formation. *Anat. Embryol.* 157, 243-253
- LOY, R., KOZIELL, D.A., LINDSEY, J.D. and MOORE, R.Y. (1980) Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *J. comp. Neurol.* 189, 699-710
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- MASKE, H. (1955) Über den topochemischen Nachweis von Zinc im Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Naturwissenschaften* 42, 424
- MATTHEWS, D.A., NADLER, J.V., LYNCH, G.S. and COTMAN, C.W. (1974) Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. I. Histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity. *Dev. Biol.* 36, 130-141
- McGEER, P.L., McGEER, E.G. and HATTORI, T. (1978) Kainic acid as a tool in neurobiology. In: *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology* (Eds.: E.G. McGeer, J.W. Olney and P.L. McGeer), Raven Press, New York, pp. 123-138

- McLARDY, T. (1962) Zinc enzymes and the hippocampal mossy fibre system. *Nature (Lond.)* 194, 300-302
- McLARDY, T. (1964) Second hippocampal zinc-rich synaptic system. *Nature (Lond.)* 201, 92-93
- McLARDY, T. (1970a) Intravital nontoxic sulfide loading of synaptic zinc in hippocampus. *Exp. Neurol.* 28, 416-419
- McLARDY, T. (1970b) Memory consolidation in rats with sulfide-loaded hippocampal zinc-rich synapses. *Exp. Neurol.* 29, 468-472
- MELLGREN, S.I. and SREBRO, B. (1973) Changes in acetylcholinesterase and distribution of degenerating fibres in the hippocampal region after septal lesions in the rat. *Brain Research* 52, 19-36
- MELLGREN, S.I., HARKMARK, W. and SREBRO, B. (1977) Some enzyme histochemical characteristics of the human hippocampus. *Cell Tiss. Res.* 181, 459-471
- MEYER, U., RITTER, J. und WENK, H. (1971) Zur Histochemie der Körnerzellneurone der Hippocampusformation der Ratte. *Acta histochem.* 41, 193-209
- MOORE, R.Y. and HALARIS, A.E. (1975) Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J. comp. Neurol.* 164, 171-184
- MORGAN, R.F. and O'DELL, B.L. (1977) Effect of copper deficiency on the concentrations of catecholamines and related enzyme activities in the rat brain. *J. Neurochem.* 28, 207-213
- MOSKO, S., LYNCH, G. and COTMAN, C.W. (1973) The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat. *J. comp. Neurol.* 152, 163-174
- MURABE, Y., IBATA, Y. and SANO, Y. (1982) Morphological studies on neuroglia. IV. Proliferative response of non-neuronal elements in the hippocampus of the rat to kainic acid-induced lesions. *Cell Tissue Res.* 222, 223-226

- NADLER, J.V. (1979) Kainic acid; neurophysiological and neurotoxic actions. *Life Sci.* 24, 289-300
- NADLER, J.V. and CUTHBERTSON, G.J. (1980) Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways. *Brain Research* 195, 47-56
- NADLER, J.V., PERRY, B.V. and COTMAN, C.W. (1978a) Preferential vulnerability of hippocampus. In: *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology* (Eds.: E.G. McGeer, J.W. Olney and P.L. McGeer), Raven Press, New York, pp. 219-237
- NADLER, J.V., MATTHEWS, D.A., COTMAN, C.W. and LYNCH, G.S. (1974) Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. II. Quantitative changes in choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Dev. Biol.* 36, 142-154
- NADLER, J.V., PERRY, B.W., GENTRY, C. and COTMAN, C.W. (1980) Degeneration of hippocampal CA3 pyramidal cells induced by intraventricular kainic acid. *J. comp. Neurol.* 192, 333-359
- NADLER, J.V., PERRY, B.W., GENTRY, C. and COTMAN, C.W. (1981) Fate of the hippocampal mossy fiber projection after destruction of its postsynaptic targets with intraventricular kainic acid. *J. comp. Neurol.* 196, 549-569
- NADLER, J.V., WHITE, W.F., VACA, K.W., PERRY, B.W. and COTMAN, C.W. (1978b) Biochemical correlates of transmission mediated by glutamate and aspartate. *J. Neurochem.* 31, 147-155
- NAUTA, W.J.A. and GYGAX, P.A. (1954) Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technique. *Stain Techn.* 29, 91-93
- NICKOLSON, V.J. and VELDSTRA, H. (1972) The influence of various cations on the binding of colchicine by rat brain homogenates. Stabilization of intact neurotubules by zinc and cadmium ions. *FEBS Letters* 23, 309-313

- NITSCH, C., KIM, J.-K. and SHIMADA, C. (1980) The commissural fibers in rabbit hippocampus: synapses and their transmitter. In: Development and Chemical Specificity of Neurons, Progress in Brain Research Vol. 51, (Eds.: M. Cuénod, G.W. Kreuzberg and F.E. Bloom), Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, pp. 193-201
- ODERFELD-NOWAK, B., NARKIEWICZ, O., BIAŁOWAS, J., DABROWSKA, J., WIERASZKO, A. and GRADKOWSKA, M. (1974) The influence of septal nuclei lesions on activity of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the hippocampus of the rat. *Acta neurobiol. exp.* 34, 583-601
- OLNEY, J.W. (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic Acid as a Tool in Neurobiology (Eds.: E.G. McGeer, J.W. Olney and P.L. McGeer), Raven Press, New York pp. 95-121
- OLNEY, J.W., FULLER, T. and DE GUBAREFF, T. (1979) Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. *Brain Research* 176, 91-100
- OLNEY, J.W., RHEE, V. and HO, O.L. (1974) Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Research* 77, 507-512
- OTSUKA, N. und KAWAMOTO, M. (1966) Histochemische und autoradiographische Untersuchungen der Hippocampusformation der Maus. *Histochemie* 6, 267-273
- PAPAVASILIOU, P.S., MILLER, S.T. and COTZIAS, G.C. (1968) Functional interaction between biogenic amines, 3'-5'-cyclic AMP and manganese. *Nature (Lond.)* 220, 74-75
- PARISI, A.F. and VALLEE, B.L. (1969) Zinc metalloenzymes: Characteristics and significance in biology and medicine. *Amer. J. clin. Nutr.* 22, 1222-1228
- POHLE, W. und MATTHIES, H. (1970) Die Topohistochemie von Transmittersystemen in Kortex und Hippokampus des Kaninchens. *Acta biol. med. germ.* 25, 447-454

- PROHASKA, J.R. and WELLS, W.W. (1975) Copper deficiency in the developing rat brain: evidence for abnormal mitochondria. *J. Neurochem.* 25, 221-228
- PROHASKA, J.R., HOWES, M.A. and LUECKE, R.W. (1974) Effect of dietary zinc level on rat brain development. *Fed. Proc.* 33, 699
- QUIK, M. and SOURKES, T.L. (1977) The effect of chronic iron deficiency on adrenal tyrosine hydroxylase activity. *Can. J. Biochem.* 55, 60-65
- RAISMAN, G. (1966) The connexions of the septum. *Brain* 89, 317-348
- RAISMAN, G., COWAN, W.M. and POWELL, T.P.S. (1965) The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain* 88, 963-996
- RAJAN, K.S., DAVIS, J.M. and COLBURN, R.W. (1971) Metal chelates in the storage and transport of neurotransmitters: interactions of metal ions with biogenic amines. *J. Neurochem.* 18, 345-364
- RIBAK, C.E. and ANDERSON, L. (1980) Ultrastructure of the pyramidal basket cells in the dentate gyrus of the rat. *J. comp. Neurol.* 192, 903-916
- RIBAK, C.E., VAUGHN, J.E. and SAITO, K. (1978) Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Research* 140, 315-332
- SANDSTEAD, H.H., GILLESPIE, D.D. and BRADY, R.N. (1972) Zinc deficiency: effect on brain of the suckling rat. *Pediat. Res.* 6, 119-125
- SCATTON, B., SIMON, H., LE MOAL, M. and BISCHOFF, S. (1980) Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neurosci. Lett.* 18, 125-131
- SCHEINBERG, I.H. and STERNLIEB, I. (1975) Wilson's disease. In: *Biology of Brain Dysfunction.* (Ed.: G.E. Gaull), Vol. 3. Plenum Press, New York, pp. 247-264

- SCHMID, R., MEEK, H.J. and COSTA, E. (1980) The effect of kainic acid on the hippocampal content of putative transmitter amino acids. *Brain Research* 200, 355-362
- SCHULZ, H. und BURESCH, S. (1980) Eine einfache und schnelle Methode zur Implantation von Metallkanülen in das Hirnventrikelsystem der Ratte. *Acta biol. med. germ.* 39, K15-K17
- SCHWARCZ, R. and COYLE, J.T. (1977) Striatal lesions with kainic acid: neurochemical characteristics. *Brain Research* 127, 235-249
- SCHWARCZ, R. and KÖHLER, C. (1980) Evidence against an exclusive role of glutamate in kainic acid neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 19, 243-249
- SCHWARCZ, R., ZACZEK, R. and COYLE, J.T. (1978) Micro-injections of kainic acid into the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 50, 209-220
- SCHWARTZ, J.C., BARBIN, G., GARBARG, M., POLLARD, H., ROSE, C., VERDIERE, M. (1976) Neurochemical evidence for histamine acting as a transmitter in mammalian brain. In: *Adv. in Biochem. Psychopharmacology* Vol. 15 (Eds.: E. Costa, E. Giacobini and R. Paoletti), Raven Press, New York, pp. 111-126
- SEGAL, M. and BLOOM, F.E. (1974) The action of norepinephrine in the rat hippocampus. II. Activation of the input pathway. *Brain Research* 72, 99-114
- SERENI, F., PRINCIPI, H., PERTETTI, L. and SERENI, L.P. (1966) Undernutrition and the developing rat brain. I. Influence on acetylcholinesterase and succinic acid dehydrogenase activities and on norepinephrine and 5-OH tryptamine tissue concentrations. *Biol. Neonate (Basel)* 10, 254-265
- SHEPHERD, G.M. (1974) The synaptic organization of the brain. An introduction, Oxford University Press, New York, pp. 259-297

- SHUTE, C.C.D. and LEWIS, P.R. (1966) Electron microscopy of cholinergic terminals and acetylcholinesterase-containing neurones in the hippocampal formation of the rat. *Z. Zellforsch.* 69, 334-343
- SLEVIN, J.T. and COYLE, J.T. (1981) Ontogeny of receptor binding sites for (³H)glutamic acid and (³H)kainic acid in the rat cerebellum. *J. Neurochem.* 37, 531-533
- SMIAŁOWSKI, A. and SMIAŁOWSKA, M. (1981) The effect of epileptiform discharges evoked by intrahippocampal injection of kainic acid on cholinergic and catecholaminergic hippocampal afferents. *Neuroscience* 6, 2519-2528
- STENGAARD-PEDERSEN, K., FREDENS, K. and LARSSON, L.-I. (1981) Enkephalin and zinc in the hippocampal mossy fiber system. *Brain Research* 212, 230-233
- STORM-MATHISEN, J. (1970) Quantitative histochemistry of acetylcholinesterase in rat hippocampal region correlated to histochemical staining. *J. Neurochem.* 17, 739-750
- STORM-MATHISEN, J. (1972) Glutamate decarboxylase in the rat hippocampal region after lesions of the afferent fibre systems. Evidence that the enzyme is localized in intrinsic neurones. *Brain Res.* 40, 215-235
- STORM-MATHISEN, J. and FONNUM, F. (1971) Quantitative histochemistry of glutamate decarboxylase in the rat hippocampal region. *J. Neurochem.* 18, 1105-1111
- STORM-MATHISEN, J. and GULDBERG, H.C. (1974) 5-Hydroxytryptamine and noradrenaline in the hippocampal region: effect of transection of afferent pathways on endogenous levels, high affinity uptake and some transmitter-related enzymes. *J. Neurochem.* 22, 793-803

- STORM-MATHISEN, J. and IVERSEN, L.L. (1979) Uptake of (^3H)glutamic acid in excitatory nerve endings: light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neuroscience* 4, 1237-1253
- SWANSON, L.W. and COWAN, W.M. (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. comp. Neurol.* 172, 49-84
- SWANSON, L.W. and HARTMAN, B.K. (1975) The central adrenergic system, immunofluorescence study of the localization of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine- β -hydroxylase as a marker. *J. comp. Neurol.* 163, 467-506
- SZERDAHELYI, P. (1982) Lack of correlation between trace metal staining and trace metal content of the rat hippocampus following colchicine microinjection. *Histochemistry*, in press
- SZERDAHELYI, P., KOZMA, M. and KÁSA, P. (1982) Zinc-deficiency-induced trace element concentration and localization changes in the central nervous system of albino rat during postnatal development. II. Atomic absorption spectrophotometric examinations. *Acta histochem.* 70, 173-182
- SZERDAHELYI, P., VÁNYAI, É., BÁNSÁGHY, K. and KÁSA, P. (1980) Trace element content in the rat hippocampus after septal lesion. *Proc. 20th Hung. Annu. Meet. Biochem., Siófok*, pp. 121-122
- SZERDAHELYI, P., VÁNYAI, É., BÁNSÁGHY, K. és KÁSA, P. (1981) Kainsav indukált lézió hatása patkány hippocampus nyomelemtartalmára. *Magyar Élettani Társaság XLVI. Jubileumi Vándorgyűlése, Budapest*, pp. 203-204
- TAMIR, H., KLEIN, A. and RAPPORT, M.M. (1976) Serotonin binding protein: enhancement of binding by Fe^{2+} and inhibition of binding by drugs. *J. Neurochem.* 26, 871-878

- TIMM, F. (1958) Zur Histochemie der Schwermetalle.
Das Sulfid-Silber Verfahren. Dtsch. Z. ges. gerichtl.
Med. 46, 706-711
- UNGERSTEDT, U. (1970) 6-Hydroxydopamine induced degeneration
of central monoamine neurons. Eur. J. Pharmacol. 5,
107-110
- WARKANY, J. and PETERING, H.G. (1973) Congenital
malformations of the brain produced by short zinc
deficiencies in rats. Am. J. Ment. Def. 77, 645-653
- WEISENBERG, R.C. BORISY, G.G. and TAYLOR, E.W. (1968) The
colchicine-binding protein of mammalian brain and its
relation to microtubules. Biochemistry 7, 4466-4479
- ZIMMER, J. and HAUG, F.-M.Š. (1978) Laminar differentiation
of the hippocampus, fascia dentata and subiculum in
developing rats, observed with Timm sulphide silver
method. J. comp. Neurol. 179, 581-618

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet Dr. Kása Péter professzor Urnak, a SZÖTE Központi Kutatólaboratórium Vezetőjének, hogy munkám elvégzését mindvégig szorgalmazta, értékes észrevételeivel, szakmai tanácsaival irányította és segítette.

Köszönettel tartozok Zab Sándorné laboratóriumi asszisztens lelkiismeretes és odaadó munkájáért és Dr. Ugryn Bélánénak a szép kivitelű gépelési munkáért.

Köszönetet mondok továbbá a SZÖTE Központi Kutatólaboratórium minden dolgozójának, hogy munkámat pozitív hozzáállásukkal segítették.