

SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

KOLINERG - ÉS GABA-ERG RENDSZER IMMUNHISZTOKÉMIAI
LOKALIZÁCIÓJA EGÉR FELSŐ NYAKI GANGLIONJÁBAN

Doktori értekezés

Készítette: Dobó Endre



Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem
Központi Kutatólaboratórium

1989

B 5156



E 3.615

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRÓDALMI ÁTTEKINTÉS, CÉLKITŰZÉSEK	4
2.1. Szimpatikus idegrendszer anatómiája	4
2.2. Szimpatikus ganglionok szerkezete	6
2.3. Szimpatikus ganglionok neurokémiája	9
2.3.1. Kolinerg rendszer elemei	9
2.3.2. Katekolaminok	11
2.3.3. GABA	14
2.3.4. Neuropeptidek	17
2.4. Célkitűzések	21
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
3.1. Felhasznált reagensek és vegyszerek	22
3.1.1. Immunreagensek	22
3.1.2. Laboratóriumi vegyszerek	23
3.2. Állatok	24
3.2.1. Vizsgált állatok jellemzői:	
törzs, nem, kor	24
3.2.2. Műtéti beavatkozások	24
3.3. Módszerek	25
3.3.1. ChAT immuncitokémia	25
3.3.2. GABA immunhisztokémia	29
3.3.3. GAD immuncitokémia	31
4. EREDMÉNYEK	33
4.1. ChAT-pozitív struktúrák lokalizációja	33
4.1.1. Fénymikroszkópos megfigyelések	33

4.1.2. Decentralizálás hatása a ChAT immunreaktivitásra	35
4.1.3. ChAT immunreaktivitás elektronmikroszkópos analízise	35
4.2. GABA-pozitív struktúrák lokalizációja	39
4.2.1. Fénymikroszkópos megfigyelések	39
4.2.2. Decentralizálás hatása a GABA immunreaktivitásra	40
4.2.3. GABA immunreaktivitás elektronmikroszkópos analízise	40
4.3. GAD-pozitív struktúrák lokalizációja	42
4.3.1. Fénymikroszkópos megfigyelések	42
4.3.2. GAD immunreaktivitás elektronmikroszkópos analízise	44
5. MEGBESZÉLÉS	46
5.1. GCS kolinerg innervációja (struktúrái)	46
5.1.1. ChAT-immunreaktív rostok ganglionáris megoszlása	47
5.1.2. GCS kolinerg innervációja	48
5.1.3. ChAT-immunreaktív axonok eredete	50
5.1.4. Kolinerg átfutó rostok?	51
5.1.5. Elektronmikroszkópos vizsgálat	52
5.2. GCS GABA-erg struktúrái	53
5.2.1. GABA-erg idegrostok ganglionáris megoszlása	54
5.2.2. GABA-erg rostok eredete	57
5.2.3. GABA-erg neuronok	59

5.3. GCS kolinerg - és GABA-erg rendszerének kapcsolata	60
6. ÖSSZEFOGLALÁS	64
7. IDÉZETT IRODALOM	67
8. A TÉMAKÖRREL KAPCSOLATOS SAJÁT ELŐADÁSOK ÉS KÖZLEMÉNYEK	85
9. KÜSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	87

Rövidítések

AADC = DOPA-dekarboxiláz (EC 4.1.1.26)

ACh = acetilkolin

AChE = acetilkolinészteráz (EC 3.1.1.7)

ChAT = kolinacetiltranszferáz (EC 2.3.1.6)

CSC = nyaki szimpatikus ganglion komplex

CST = nyaki szimpatikus törzs

DAB = diaminobenzidin

DBH = dopamin-béta-hidroxiláz (EC 1.14.2.1)

GABA = gamma-aminovajsav

GABA-T = GABA transzamináz (EC 2.6.1.19)

GAD = glutaminsav dekarboxiláz (EC 4.1.1.15)

GCS = ganglion cervicale superius

HRP = tormaperoxidáz

mAChR = muszkarin típusú acetilkolin receptor

nAChR = nikotin típusú acetilkolin receptor

PB = nátrium-foszfát puffer, pH = 7,4

PBS = foszfát-pufferelt izotóniás sóoldat

TB = Trisz-HCl puffer, pH = 7,6

TBS = Trisz-pufferelt sóoldat

TH = tirozin-hidroxiláz (EC 1.14.16.2)

ZSO = zselatin oldat

1. BEVEZETÉS

A legutóbbi évtizedben az immunhisztokémia nagy hatással volt a neurobiológia fejlődésére. Bár az immunhisztokémiát eredetileg nem neurobiológiai kutatásokra, hanem mikrobiológiai antigének és auto-antitestek kimutatására, illetve a későbbiekben különböző hormonok lokalizálására fejlesztették ki. Magát az elvet, hogy egy megfelelően jelölt antitestet hisztokémiai reagensként lehetne használni, 1934-ben ismerte föl Marrack. Az elmúlt 50 év alatt kidolgozott igen sok immunhisztokémiai módszerrel és technikával ma több kötetet kitevő irodalom foglalkozik (pl. Bullock and Petrusz, 1982; Bullock and Petrusz, 1983; Bullock and Petrusz, 1985; Cuello, 1983; Sternberger, 1979).

Az immunhisztokémiai technikák fejlődésével párhuzamosan egyre több biológiailag fontos molekulát sikerült izolálni, amelyek ellen immunizálással mono- vagy poliklonális antitesteket állítottak elő. Az immunhisztokémia jelentős előnye más biológiai vizsgálatokban használatos analitikai módszerekkel szemben kettős: (1) Általános módszerként alkalmazható a kémiaiilag legkülönbözőbb anyagok azonosítására: a kis molekulasúlyú aminosavaktól a nagyobb molekulasúlyú zsírsavakon át az óriás molekulasúlyú nukleinsavakig. (2) Érzékenysége a legmodernebb műszeres technikákéval vetekszik, sőt gyakran azokat fölül is múlja. Elég csak arra gondolni, hogy immuncitokémiai módszerekkel

egyetlen sejtben, vagy akár egyetlen axonterminálisban ki lehet mutatni egy adott molekula, vagy molekularészlet (epitop) jelenlétét.

Az immunhisztokémia előnyeit jól ki lehet használni kicsiny szervek vagy szövetek morfológiai vizsgálatában, így az autonóm idegrendszer ganglionjainak kutatásában is. Immunhisztokémia alkalmazásával nyert eredmények alapján egyre több biológiailag aktív anyagról (Schultzberg et al., 1983; Schultzberg and Lindh, 1988) tételezik fel, hogy szerepük lehet a ganglionok idegi működésében.

Az utóbbi évtizedben a szimpatikus ganglionok immunhisztokémiai vizsgálataiban a hangsúly úgy tűnik áthelyeződött a neuropeptidek kimutatására, elfeledkezvén néhány klasszikus neurotransmitter rendszerekről, pl. az acetilkolinról (ACh) vagy a gamma-amino-vajsavról (GABA). Az acetilkolinról már sok-sok évtizede ismert, hogy döntő szerepe van a ganglionáris transzmisszióban, ennek ellenére morfológiai lokalizációjáról eddig még csak közvetett bizonyítékok állnak rendelkezésre. Ezért vizsgálatainkban a talán leginkább kutatott szimpatikus ganglionban, a ganglion cervicale superiusban (GCS) a kolinerg funkció morfológiai alapjait igyekeztük feltárni a kolinerg rendszer markerének tekintett kolinacetil-transzferáz (ChAT) immuncitokémiai demonstrálásával. Kísérleti állatnak laboratóriumi

egeret választottuk.

A kolinerg rendszerhez hasonlóan a GABA-erg rendszer morfológiai vizsgálatában is bizonyos elmaradások észlelhetők. Csak az utóbbi 2-3 évben, részben kutatócsoportunk munkáján keresztül, vannak immunhisztokémiai adatok arra vonatkozólag, hogy a GABA-erg rendszernek is jelentős feladata lehet a szimpatikus ganglionok idegi szabályozásában. Minthogy azonban korábbi vizsgálataink a patkány GCS-re vonatkoztak, ezért indokoltnak találtuk az egér GCS excitatórikus kolinerg rendszere mellett az ezzel neurokémiai kapcsolatot mutató (Farkas et al., 1986) inhibitórikus jellegű GABA-erg rendszerét is megvizsgálni, immunhisztokémiai módszerekkel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS, CÉLKITÜZÉS

2.1. Szimpatikus idegrendszer anatómiája

Vizsgálataink során elért eredményeink megértéséhez elengedhetetlenül fontos a szimpatikus ganglionok szerkezetének ismerete. Ezért röviden összefoglaljuk az erre vonatkozó irodalmi adatokat.

A szimpatikus preganglionáris neuronok a gerincvelő medio-laterális szarvában helyezkednek el a 8. cervikális és a 2. lumbális szegmentumok között. Axonjaik az elülső gyökérekén keresztül lépnek ki, majd a gerincvelői ideg ventrális ágán át az ún. ramus communicans albi útján a gerincvelő közelében lévő paravertebrális dúclánchoz jutnak. Itt a rostok nagyobb része átkapcsolódik. A posztganglionáris rostok jó része az ún. ramus communicans griseuson át visszatér a gerincvelői idegbe. Azok a preganglionáris rostok, amelyek nem a paravertebrális dúcokban kapcsolódnak át, tovább futnak a nervus splanchnicusokat képezve. Az itt haladó rostok egy jelentékeny része a zsigerek közelében található paravertebrális idegdúcok valamelyikében (ganglion coeliacum, ganglion mesentericum superius és inferius) végződnek, vagy a mellékvese velőállományának adrenalint és noradrenalint termelő sejtjeit közvetlenül idegzik be, vagy egyes zsigereket ingerülettel ellátó fonatokban található ganglionáris sejteken szinaptizálnak.

A szimpatikus dúclánc bilaterálisan többé-kevésbé

szimmetrikus. A koponyaalaptól a keresztcsontig terjed. Első idegdúca a felső nyaki ganglion (GCS), amely patkányban és egérben az artéria carotis elágazásában fekszik. Általában orsó alakú, de lehet csaknem lekerekített is. Két posztganglionáris törzse közül az egyik a ganglion rostrális pólusából indul, és az arteria carotis internát követi (ICN), a másik a ganglion oldalából ered, és az arteria carotis externa felé halad (ECN), ahol plexust képez. Preganglionáris törzse tulajdonképpen az ún. nyaki szimpatikus törzs (CST), amelyet kaudális irányban követve - az arteria carotis mentén - a sorban következő idegdúc is könnyen kipreparálható, amelyet - patkányban - Bowers és Zigmond nyaki szimpatikus ganglionnak (CSC) nevezett el (1981). Feltehetőleg az ő nomenklatúrájukat érdemes az egér esetében is alkalmazni. A szabálytalan, elnyúlt alakú CSC az első - és második bordafejnél helyezkedik el. Patkányban a ganglion cervicale medius, a ganglion cervicale inferius és az első torakális ganglion egyesüléséből jött létre. Az GCS-hez hasonlóan a CSC posztganglionáris rostjainak számottevő része sem csatlakozik vissza a mozgató idegekhez, hanem azoktól függetlenül érik el a célszerveket.

Akárcsak az előbb említett ganglionokat, a többi paravertebrális gangliont is - vertikális irányban - a szimpatikus törzs köti össze. Elvileg a thorakális, lumbális és szakrális régiókban a gerincvelői

szegmentumoknak megfelelően egy-egy idegdúc van, amelyeket azonban, különösen a lumbo-szakrális régióban nem lehet egyértelműen elkülöníteni, oly mértékben összeolvadtak.

2.2. Szimpatikus ganglionok szerkezete

A szimpatikus ganglionok szövettani felépítésére vonatkozó ismeretek elsősorban humán és néhány rágcsáló faj (patkány, nyúl) GCS fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatából származik (ld. Dail and Barton, 1983; Gabella, 1976; Matthews, 1983). A többi ganglion hisztológiai leírásai alapján megállapítható, hogy a szimpatikus ganglionok általános szöveti és sejttani felépítése sok azonosságot és hasonlóságot mutat. Megjegyzendő azonban, hogy kisebb-nagyobb különbségek vannak az GCS, a CSC és a többi paravertebrális idegdúcok, illetve a paravertebrális és prevertebrális dúcok szerkezetében.

A ganglionokat vastag kötőszöveti burok (kapszula) veszi körül, amely folytonos a be- és kilépő idegek kötőszöveti burkát képező hasonló rétegeivel. A kapszulát vékony epineurium, vastagabb perineurium és finom endoneurium alkotja (Dail and Barton, 1983). A külső kötőszöveti burokból számos szeptum lép a ganglionok belsejébe, minek következtében a sejtek kisebb-nagyobb csoportja különül el. A ganglionáris neuronokat gliasejtek (főként szatellita sejtek) ölelik

körbe, szinte tökéletes tokot képezve körülöttük. A gliális tok nemcsak a perikaryonok felszínét, hanem a sejt nyúlványok csaknem teljes felületét is befedi. A szatellita sejtek külső felületét bazális lamina határolja, ezért a perikaryonok nincsenek direkt kapcsolatban a kötőszöveti elemekkel (Gabella, 1975). A szatellita sejtek közvetlenül érintkeznek az idegrostok Schwann-sejtes hüvellyével (Matthews and Nelson, 1975).

Egér GCS becsült neuron száma mintegy 15 000 (Levi-Montalcini and Booker, 1960). Összehasonlításképpen az ember GCS kb. 900 000 (Ebbeson, 1968a,b), míg a patkány GCS kb. 32 000 (Levi-Montalcini and Booker, 1960) neuront tartalmaz. A ganglionok alapvető sejtje az ún. ganglionáris neuron. Patkányban a ganglionáris sejtek átmérője átlagosan 25-40 μm , de lehet akár 50 μm is (Tamarind és Quilliam, 1971). Az ezüst impregnációs kísérletek tanulsága szerint a ganglionáris neuronok multipolárisok (De Castro, 1932). Tengeri malac GCS ganglionáris sejtjeinek átlagosan 13 dendritje van (McLachlan, 1974). A viszonylag vastag dendritek gazdagon elágaznak. Ember GCS ganglionáris neuronjait dendritjeik hosszúsága, elágazási gyakorisága és a dendritágak lefutása alapján három csoportba osztják (Cajal, 1911). Egyes irodalmi utalások alapján valószínű, hogy hasonló csoportosítás lehetséges más emlős faj esetében is (McLachlan, 1974). Gyakran a dendritek a sejttest közelében lévő valamely perikaryon

vagy perikaryonok körül képeznek szoros hálót ("pericellular dendritic nest") (Cajal, 1911). Azonban az is gyakori, hogy két vagy több ganglionáris neuron dendritjei egy közös glomerulusban ágaznak el sokszorosán, amelyekbe preganglionáris axonok ugyancsak adnak le kollaterálisokat (De Castro, 1932). Delorenzi (1931) és McLachlan (1974) szerint ilyen glomerulus ritka a kis rágcsálókban.

Az ezüst impregnációs festések alapján nem lehet egyértelműen megkülönböztetni az axonokat a dendritektől, mégis általánosan elfogadott az a nézet, hogy a ganglionáris sejtek axonjai vékonyabbak, nem mutatnak elágazást, és egy ún. elsődleges (primér) dendrit eredéséből indulnak (Cajal, 1911; De Castro, 1932; Dail et al., 1980).

A szimpatikus ganglionok másik alapvető neuron típusa az ún. SIF ("small intensely fluorescent") sejtek. Az elnevezés onnan ered, hogy e sejtek intenzív, formaldehid-indukált fluoreszcenciát mutatnak (Erankö and Harkonen, 1963, 1965; Norberg et al., 1966). Elektronmikroszkóppal vizsgálva ezek a sejtek jellegzetes, nagy granulált vezikulákat tartalmaznak, ezért granuláris sejteknek is nevezik őket. Patkány GCS-ben Erankö és Soinila (1981) 400-1000 SIF sejtet számlált. A SIF sejtek lekerekített alakúak, átmérőjük 10-15 μm (Chiba and Williams, 1975). Morfológiailag két SIF sejt típust különítenek el aszerint, hogy vannak-e

nyúlványaik avagy nincsenek (Norberg et al., 1966, Siegrist et al., 1966). A nyúlvánnyal rendelkező neuronok zömében izoláltan helyezkednek el, míg a nyúlvánnyal nem rendelkezők általában kisebb-nagyobb csoportokba rendeződnek, rendszerint kapillárisok körül. E sejteket, hasonlóan a ganglionáris neuronokhoz, szintén szatellita sejtek ölelik körbe, ha azonban csoportban helyezkednek el, akkor közöttük hiányozhat a szatellita "tok", ilyen esetben a köztük lévő távolság mindössze 15-20 nm (Siegrist et al., 1968). A SIF sejtek élettani funkciója még ma sem tisztázott, csupán feltételezések vannak arra, hogy a SIF sejtek miképpen befolyasolhatják a pre- és posztganglionáris neuronok közötti kapcsolatot. Az utóbbi években általánosan elfogadott elképzelés szerint a nyúlványos SIF sejtek interneuronok, a nem-nyúlványos SIF sejtek pedig endocrin sejtek (Williams et al., 1975, Chiba et al., 1977).

2.3. Szimpatikus ganglionok neurokémiaja

2.3.1. Kolinerg rendszer elemei

Biokémiai, elektrofiziológiai, farmakológiai és hisztokémiai bizonyítékok hosszú sora mutatja, hogy az eddig vizsgált valamennyi emlős paravertebrális ganglion kolinerg innervációt kap (ld. Kharkevich, 1980). Kolinergnek tekintjük azokat a neuronokat, amelyek ingerület átvivő anyaga acetilkolin (ACh), míg



azokat a neuronokat, amelyeket a kolinerg neuronok innerválnak kolinoczeptivnek nevezzük.

Patkány GCS-ben a kolinerg rendszer valamennyi elemét már azonosították: A ganglion magas kolinacetiltranszferáz (ChAT) aktivitást mutat (Hebb és Waites, 1956; Kása et al., 1985; Thoenen et al., 1972). Nagy koncentrációban tartalmaz ACh-t (Feldberg, 1943; Kása et al., 1985; MacIntosh, 1963). A nyaki szimpatikus törzs elektromos ingerlésére a ganglion ACh tartalmának jelentős része fölszabadítható (Birks and MacIntosh, 1961; Feldberg and Gaddum, 1934; Sacchi et al., 1978). Az acetilkolin kötő receptorok (muszkarin (mAChR)- és nikotin típusú receptorok (nAChR)) jelenlétét ugyancsak igazolták (mAChR: Burt, 1978; nAChR: Smolen, 1983; Toldi et al., 1983). Biokémiai mérések szerint az GCS magas acetilkolinészteráz (AChE) aktivitást mutat (Gisiger et al., 1978; Kása et al., 1985; Klingman and Klingman, 1969).

Az GCS kolinerg rendszerének elemei közül szinte kizárólag csak az AChE lokalizációjáról vannak ismereteink. Fény- és elektronmikroszkópos hisztokémiai vizsgálatok szerint az AChE preszinaptikusan is, posztzinaptikusan is megtalálható (Eränkő, 1972; Holmstedt and Sjöqvist, 1959; Kása and Csarnovszky, 1967). Minthogy az AChE nemcsak a kolinerg és a kolinoczeptív neuronokban fordulhat elő, hanem más szöveti elemekben is (Carvalheira and Pearse, 1967),

ezért az AChE nem tekinthető a kolinerg rendszer markerének.

Az GCS kolinerg rendszerének morfológiai azonosítására kézenfekvőnek látszik magának az ACh-nak hisztokémiai kimutatása. Sajnos mindeközéig nem találtak olyan általánosan elfogadott módszert, amellyel ez lehetséges volna. Megjegyzendő, hogy nemrégiben Geffard és munkatársai leírtak egy immunhisztokémiai módszert, amellyel az ACh-t mutattak ki rovar és patkány idegrendszerben (Geffard et al., 1985a, b), azonban a módszer specifitását sokan kifogásolják. Ezért hisztokémiai szempontból a kolinerg rendszer markerének a ChAT identifikálását tartják. Leggyakrabban a ChAT neuronális lokalizációjára az enzim immunhisztokémiai kimutatását alkalmazzák (Kása, 1986). Annak ellenére, hogy a ChAT immunhisztokémia sikeres alkalmazásával a központi idegrendszer kolinerg struktúráiról már igen sok információ gyűlt össze, a szimpatikus ganglionokban a kolinerg struktúrákról csak a klasszikus elektronmikroszkópiai leírások alapján vannak elképzelések (ld. Matthews, 1983).

2.3.2. Katekolaminok

Az első szimpatikus ingerületáttevő anyagot, a noradrenalint von Eulernek 1946-ban sikerült azonosítani, csaknem húsz évvel az ACh biológiai szerepének felismerése után (Dale and Dudley, 1929). Az

azóta eltelt több, mint négy évtizedben néhány más monoaminról is bebizonyosodott, hogy szerepük van a szimpatikus idegrendszer működésében. Ezek közül a három legfontosabb monoamint, az adrenalint, noradrenalint és a dopamint összefoglalóan katekolaminoknak nevezik.

A katekolaminok közös prekursora az L-tirozin, amelyet a tirozin-hidroxiláz (TH) L-dihidroxi-fenilalaninná (DOPA) alakít, amelyből a DOPA-dekarboxiláz (aromás aminosav-dekarboxiláz, AADC) hatására keletkezik a dopamin. A dopaminból a dopamin béta-hidroxiláz (DBH) katalíziseként jön létre a noradrenalin. A noradrenalint egy metil-transzferáz enzim alakítja át adrenalinná.

A perifériás szimpatikus idegrendszerben a noradrenalin a legfontosabb transzmitter. Analitikai kémiai meghatározások szerint a paravertebrális ganglionokban és a posztganglionáris neuronok idegvégződéseiben nagy mennyiségű noradrenalin található (Holzbauer and Sharman, 1972; Koslow et al., 1972). Macska GCS-ben az idegvégződésekben mintegy 300-szor több noradrenalin mérhető, mint a neuronok sejttestében (Dahlström and Hagendal, 1966). Biokémiai vizsgálatokkal a noradrenalin bioszintézis valamennyi enzimét sikerült azonosítani különböző szimpatikus ganglionokban (Holzbauer and Sharman, 1972).

A katekolaminok szöveti kimutatása többféle hisztofluoreszcens technikával is lehetséges. A

ganglionáris neuronok szómája és a SIF sejtek magas fluoreszcenciát mutatnak. A neuropilben, feltehetőleg a ganglionáris neuronok és a SIF sejtek nyúlványaiban, ugyancsak magas a katekolamin tartalom. A ganglion sejtek fluoreszcenciájának intenzitásában nagy különbség fedezhető fel, sőt néhány sejt nem mutat fluoreszcenciát. A legerősebben a SIF sejtek fluoreszkálnak (Dail and Barton, 1983). A fluoreszcens hisztokémiai technika alkalmas megválasztásával az egyes katekolaminok fluoreszcens származékai megkülönböztethetők egymástól (Björklund et al., 1968; Björklund, 1983). A ganglionáris neuronok döntő többsége noradrenergik, míg a SIF sejtek dopaminergik (Björklund et al., 1970; Libet and Ownman, 1974).

A katekolamin tartalmú (katekolaminerg) morfológiai elemek immunhisztokémiai módszerekkel is azonosíthatók, vagy közvetlenül a transzmitterek, vagy az azokat szintetizáló enzimek kimutatásával. A katekolaminerg rendszer markerekének a TH-t tartják. Mivel ez az enzim felelős mind a dopamin, és rajta keresztül, mind a noradrenalin képzéséért, TH immunhisztokémia segítségével nem lehet különbséget tenni a dopaminerg és a noradrenerg sejtek között. TH-immunhisztokémia alkalmazásával a ganglionáris neuronok is, és a SIF sejtek is immunpozitívnak adódtak (Pickel et al., 1975; Kondo et al., 1988). Dopamin-antitest alkalmazásával azonban csak a SIF sejtek jelölődtek (Sakai et al.,

1989). A noradrenerg rendszer morfológiai markerének a DBH-t tekintik. DBH immunhisztokémiai festéssel a patkány GCS-ben szinte valamennyi ganglionéris neuron immunreaktivitást mutatott, míg a SIF sejteknek csupán 5%-a (König and Heym, 1978). A dopamin és a noradrenerg bioszintézisében szerepet játszik az AADC is, azonban, mivel nem szubsztrát specifikus, nem markere a katekolaminerg rendszernek. A DOPA-n kívül szubsztrátja még más monoamin is, többek között az 5-hidroxitriptofán, a szerotonin prekuzora is (Christenson et al., 1970).

Ugyancsak immunhisztokémiai - immunfluoreszcens-technikákkal sikerült kimutatni két másik biológiailag aktív monoamint, a szerotonint és a hisztamint is a patkány GCS-ben. A serotonint SIF sejtekben (Verhofstadt et al., 1981), míg a hisztamint ganglionéris neuronokban lokalizálták (Háppölä et al., 1985).

2.3.3. GABA

A központi idegrendszerben számos aminosavról ismeretes, hogy neurotranszmitterként (is) működnek (Ottersen and Storm-Mathisen, 1984). Azonban jelenleg még nincsenek irodalmi adataink arra vonatkozólag, hogy ezeknek az aminosavaknak - a GABÁ-t kivéve - hasonlóan fontos ingerület átvivő feladatuk lenne a szimpatikus idegrendszerben.

Az utóbbi években egyre több irodalmi adat utal arra, hogy a GABÁ-nak is szerepe lehet a ganglionok idegi működésében. Különböző emlős fajok más-más szimpatikus ganglionján végzett elektrofiziológiai kísérletek szerint az exogén (intra-arteriálisan alkalmazott) GABA csökkenti a ganglionáris transzmissziót (Adams és Brown, 1975; Brown és Constantini, 1976; DeGroat, 1970; Kimura et al., 1977).

A GABA-erg rendszer elemeinek ganglionáris jelenlétét különböző módszerekkel igazolták. Bertilsson és munkatársai mutatták ki elsőként a GABÁ-t patkány GCS-ben (Bertilsson et al., 1976). Tömeg spektrográfiai eredményeik szerint a GCS GABA tartalma a ganglion noradrenalin mennyiségének nagyságrendjével azonos. Waniewski és Suria (1977) magas nyomású folyadék kromatográfiai módszerrel (HPLC) ugyancsak igazolta a patkány GCS magas GABA tartalmát. A GABÁ-t szintetizáló enzimet, a glutaminsav dekarboxilázt (GAD), és a GABÁ-t hatástalanító enzimet, a GABA transzaminázt (GABA-T) biokémiai technikák segítségével azonosították a ganglionban (Erdő és Kiss, 1986). Neurokémiai módszerekkel sikerült GABA receptorokat ($GABA_A$ és $GABA_B$) elkülöníteni a ganglionban (Salcar et al., 1986; Bowery et al., 1978; Farkas et al., 1986).

A GABA-erg rendszer elemeinek morfológiai kimutatása immuncitokémiai módszerekkel lehetséges. A GABA-erg rendszer markerének magát a GABÁ-t és az azt

szintetizáló enzimet tekintik. GAD immuncitokémia alkalmazásával lokalizálták az enzimet patkány GCS-ben. Kenny és Ariano (1986) néhány kicsiny neuront GAD-immunpozitívnak talált. Véleményük szerint e neuronok nem SIF sejtek. Ezzel szemben Häppölä és munkatársai (1987a), ugyancsak GAD-antitest alkalmazásával, néhány ganglionáris neuront és SIF sejtet találtak pozitívnak. Viszont a fenti szerzők egyike sem mutatott ki GAD-immunpozitív rostot. GABA immuncitokémia segítségével a kicsiny interneuronok GABA-erg volta valószínűsíthető (Wolff et al., 1986; Kása et al., 1988; Dobó et al., 1989). Megfigyeléseink szerint azonban az sem kizárt, hogy a SIF sejtek között is vannak neuronok, amelyek GABA-immunreaktívak. A GABA immuncitokémiai vizsgálatok azonban nem tudták megerősíteni azt, hogy a nagy principális neuronok is GABA-ergek lennének (Kása et al., 1988; Dobó et al., 1989; Wolff et al., 1989).

A GABA-erg rostok ganglionáris jelenlétére is a GABA immunhisztokémiai eredmények utalnak (Kása et al., 1988; Wolff et al., 1989). A patkány GCS-ben igen sok GABA-immunpozitív rost található, amelyek heterogén megoszlást mutatnak. A rostok gyakran igen sűrű hálózatot hoznak létre, amelyek az egyes principális neuronokat körbe fogják. Úgy tűnik, hogy a ganglionban vannak olyan nagy neuronok, melyek egyáltalán nem kapnak GABA-immunreaktív innervációt, míg vannak olyanok, amelyeket az immunpozitív rostok rendkívül

gyakori arborizációval vesznek körül. A legtöbb GABA-immunjelölt nyúlvány a ganglion kraniális részén figyelhető meg. A gazdagon innervált ganglionáris neuronok (a neuronok mintegy 5%-a) főként az GCS azon régiójában helyezkednek el, ahonnan a principális neuronok az arteria carotis interna felé küldik axonjaikat (Wolff et al., 1989). A denervációs kísérletek tanulsága szerint a GABA-immunreaktív axonok döntő többsége preganglionáris eredetű (Dobó et al., 1989).

A teljesség kedvéért megjegyezhető, hogy a GABA-erg rendszer elemei közül a GABA-T nemcsak immuncitokémiai módszerrel, hanem hisztokémiai technikákkal is kimutatható (Van Gelder, 1965; Vincent et al., 1980; Nagai et al., 1983), azonban a GABA-T nem tekinthető GABA-erg markernek, mivel nem kizárólag a GABA-erg rendszerben lokalizálható (Nagai et al., 1984).

2.3.4. Neuropeptidek

Sokáig kizárólag az ACh-t és a NA-t tekintették neurotranszmitternek az autonóm idegrendszerben. Az utóbbi 15-20 évben azonban egyre több irodalmi adat gyűlt össze arra vonatkozólag, hogy egyéb, a központi idegrendszerben már bizonyítottan fontos reguláló szereppel rendelkező, kémiaailag jól definiált anyagokkal, a néhány aminosavból álló neuropeptidekkel, a periférikus idegi működésben ugyancsak számolni kell

(ld. Dun, 1983). A biológiailag aktív peptidek neurokémiai vizsgálatának fölgyorsulása a peptidek szintetikus előállításának fejlődésével magyarázható. A szintetikus peptidek elérhetőségének köszönhetően egyre több neuroaktív peptid ellen sikerült antitesteket produkálni, amelyek alkalmazásával, rádióimmunvizsgálati és immunhisztokémiai módszerekkel, számos neuropeptid ganglionáris jelenlétét sikerült igazolni.

Jelenleg több, mint húszt neuropeptidet azonosítottak néhány emlős különböző szimpatikus ganglionjában. Az immuncitokémiai eredmények szerint az egyes neuropeptidek előfordulása, valamint megoszlása nagymértékben különbözhet ugyanazon faj para- és a prevertebrális ganglionjaiban. A prevertebrális ganglionokban pl. figyelemreméltó P anyag ("substance P" (SP)) lokalizálható (Hökfelt et al., 1977c), ezzel szemben a GCS-ben csak kisebb mennyiségben található (Robinson et al., 1980).

Emlős paravertebrális ganglion principális neuronjainak - részben eltérő, részben azonospopulációiban számos neuropeptidet identifikáltak, így APP-t ("avian pancreatic polypeptide") (Lundberg et al., 1980; Lundberg et al., 1982), CGRP-t ("calcitonin gene-related peptide") (Lindh et al., 1987), enkefalinokat (Häppölä et al., 1987b; Schultzberg et al., 1979), galanint (Kummer, 1987), NPY-t

("neuropeptide Y") (Lundberg et al., 1983; Lundberg et al., 1984; Kondo et al., 1988), szomatostatint (Hökfelt et al., 1977a), PHI-t ("peptide histidine isoleucin amid") (Sasek and Zigmond, 1989), vazopresszint (Hanley et al., 1984) és VIP-et ("vasoactive intestinal polypeptide") (Hökfelt et al., 1977b; Lundberg et al., 1979).

A ganglionáris neuronokban azonosított peptidek közül a CGRP-t (Lee et al., 1985), az enkefalint (Schultzberg et al., 1978; Schultzberg et al., 1979; Kondo et al., 1988), PHI-t (Sasek and Zigmond, 1989) és a VIP-et (Hökfelt et al., 1977b) rostokban is kimutatták. Ezen peptideken kívül CCK-t ("cholecystokinin") (Larsson and Rehfeld, 1979), bombesint (Schultzberg, 1983) és SP-t (Hökfelt et al., 1977c) immunreaktivitást mutató rostokat találtak a ganglionokban.

A neuropeptidek immuncitokémiai vizsgálata, úgy tűnik, jelenleg még előbbre tart, mint a velük kapcsolatos elektrofiziológiai és neurokémiai kutatások. Egyrésztük feltehetőleg excitatórikus jellegű, mint pl. a SP (Jan et al., 1980; Dun and Karczmar, 1981), míg másrésztük, mint pl. az enkefalinok (Konishi et al., 1979; Dun and Karczmar, 1981) inhibítórikus hatást gyakorolnak a ganglionáris transzmisszióra. A szimpatikus ganglionokban identifikálható peptidek neurokémiájáról - tudomásunk szerint - még nincsenek

adatok. Nem ismeretes hogyan bioszintetizálódnak, hogyan és hol raktározódnak, milyen viszonyok között szabadulnak föl és miképpen inaktiválódnak.

2.4. Célkitűzések

Az említett irodalmi adatok birtokában kutatásainkban az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. ChAT immuncitokémia alkalmazásával:

- a. Milyen a kolinerg axonok megoszlása az egér GCS-ben?
- b. Vannak-e kolinerg interneuronok a GCS-ben?
- c. Lépnak-e ki kolinerg rostok a ganglionból?
- d. Milyen szinaptikus kapcsolatban vannak a kolinerg axonok a ganglionális neuronokkal?

2. GABA immunhisztokémia alkalmazásával:

- a. Mi jellemző a GABA-immunreaktív struktúrák megoszlására az egér GCS-ben?
- b. Találhatók-e a ganglionban GABA-immunjelölt interneuronok?
- c. Vannak-e immunpozitív szinapszisok a ganglionban? Amennyiben vannak, milyen a szinapszisok jellege?
- d. Van-e különbség az egér és a patkány GCS GABA-immunreaktív innervációja között?

3. GAD immuncitokémia alkalmazásával:

GABA immunhisztokémiai megfigyeléseink igazolhatók-e GAD-antitest alkalmazásával?

4. Feltételezhető-e a kolinerg - és a GABA-erg rendszer markereinek együttes előfordulása, azaz vajon ko-expresszállódhat-e az ACh és a GABA?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált reagensek és vegyszerek

3.1.1. Immunreagensek

Kísérleteink során a következő immunreagensekkel (antitestekkel illetve antiszérumokkal) dolgoztunk:

Primér antitestek

Anti-CHAT: patkány monoklonális anti-patkány ChAT (Levcy et al., 1983; Ab8; Dr. B. Wainer ajándéka).

Anti-GABA: (a) affinitás kromatográfiával tisztított nyúlban termelt anti-GABA (Wenthold et al., 1986; Dr. R. J. Wenthold ajándéka). (b) nyúlban termelt anti-GABA (Storm-Mathisen et al., 1983; Storm-Mathisen ajándéka).

Az antigén mindkét esetben marha szérumalbuminhoz glutáraldehiddel konjugált GABA volt.

Anti-GAD: birkában termelt anti-patkány GAD (Oertel et al., 1981; Oertel ajándéka).

Szekunder antitestek

Anti-patkány IgG: nyúlban termelt anti-patkány IgG (HUMAN).

Anti-nyúl IgG: (a) magunk készített affinitás kromatográfiával tisztított patkányban termelt anti-nyúl IgG (Krenács et al., 1988).

(b) kecskében termelt anti-nyúl IgG (HUMAN).

(c) kecskében termelt anti-nyúl IgG ((H+L) NORDIC).

Anti-birka IgG: nyúlban termelt anti-birka IgG ((H+L) NORDIC), amely antitest a tapasztalatok szerint

intenzív kereszt-reakciót mutat a kecske IgG-vel.

Peroxidáz anti-peroxidáz (PAP):

Valamennyi PAP reagenst (patkány -, nyúl -, kecske PAP) a NORDIC-től vettük.

3.1.2. Laboratóriumi vegyszerek

A felhasznált vegyszerek és reagensek:

3,3'-diaminobenzidin-4HCl (Sigma)

Durcupan AMC kit (Fluka)

Entellan (Merck)

Etanol (Reanal)

Glutáraldehid (Reanal)

Mertiolát (Reanal)

Nátrium-dihidrogén-foszfát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck)

Nátrium-hidroxid (Reanal)

Nátrium-klorid (Merck)

Nikkel-klorid ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Reanal)

Czmiumtetroxid (Fluka)

Ólom-acetát (Merck)

Paraformadehid (Merck)

Pikrinsav (Merck)

Pronáz (Serva)

Timol (Reanal)

Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán (Merck)

Triton X-100 (Sigma)

Uranyl-acetát (Fluka)

Zselatin (Merck)

Xilol (Reanal)

3.2. Állatok

3.2.1. Vizsgált állatok jellemzői: törzs, nem, kor

Kísérleteinkhez mindkét nembeli, felnőtt, 25-32 g-os CFLP törzshöz tartozó albinó egereket használtunk. Az állatokat 12 óra fény - 12 óra sötét ciklusban tartottuk. Az egerek normál patkánytápot (Lati, Gödöllő) és csapvizet kaptak ad libitum.

3.2.2. Műtéti beavatkozások

Vizsgálni kívántuk, hogy a GCS decentralizációja milyen hatást gyakorol a ganglion ChAT - illetve GABA immunhisztokémiai festődésére. Az állatokat Nembutal^R-al (Abott S.A.) altattuk (50 mg/kg). A bal oldali arteria carotist feltártuk, majd az GCS azonosítása után a CST-t átmetszettük, a gangliontól 3-5 mm-re. Néhány mg penicillint szórtunk a műtéti területre, majd a sebet összevartuk. Az egereket 4-14 nap túlélési idő után áldoztuk föl az immunhisztokémiai kísérletekhez. A preganglionáris exotómia hatásainak tesztelésére minden esetben a kontralaterális (jobb) oldali ganglion szolgált.

Néhány egér esetében álműtétet hajtottunk végre, amikor is az arteria carotist ugyan feltártuk, de a CST-t nem vágtuk át.

3.3. Módszerek

3.3.1. ChAT immuncitokémia

A szövet preparálása

Az egereket éteres altatás után az aortán keresztül történő perfúzióval fixáltuk. A vért 3-4 ml izotóniás sóoldattal (PBS) mostuk ki, amely 0,9% NaCl-ot és 0,01 M nátrium-foszfát puffert (PB; pH = 7,4) tartalmazott. Ezt követően 8-10 ml fixálóval folytattuk a perfúziót. A fixáló 8% frissen depolimerizált formaldehidet, 0,1% glutáraldehidet, 0,8% pikrinsavat és 0,12 M PB-t tartalmazott. Hogy elkerüljük a túlfixálást, a fixálót 15 ml 0,12 M PB-vel mostuk ki az állatokból. Valamennyi oldat szobahőmérsékletű volt. A perfúziót 1 ml/perc sebességgel végeztük.

A ganglionokról óvatosan eltávolítottuk kapszulát, majd 37 °C-os - még éppen folyós - zselatin oldatba (ZSO) helyeztük a mintákat. (A zselatin oldat 30 g zselatint, 30 ml glicerint, 0,2 g timolt és 140 ml 0,12 m-os PB-t tartalmazott.) Ezt követően a zselatint hűtőszekrényben megdermesztettük. A ganglionokat, a körbevevő 1-2 mm-es zselatinnal együtt, kivágtuk úgy, hogy a ganglionoknak kb. 4-6 mm-es "zselatin talpa" maradjon. A mintát tartalmazó blokkokat 30%-krioprotektáló hatású - nádcukrot és 0,1% nátrium-azidot tartalmazó 0,05 M Trisz-HCl pufferbe (TB; pH = 7,6) tettük egy éjszakára.

Az anyagokból, széndioxid gázos fagyasztás után, 25

μ m-os metszeteket készítettünk kriosztáttal. A kriosztát hőmérsékletét -18 és -23 °C között tartottuk. A metszeteket $0,9\%$ NaCl-ot és $0,1$ M TB-t tartalmazó oldatban (TBS) gyűjtöttük.

Immuncitokémiai protokoll

Immuncitokémiai módszerként lényegében egy immunperoxidáz technikát alkalmaztunk, amelyet Sternberger és munkatársai fejlesztettek ki (Sternberger et al., 1970; Sternberger, 1979).

A metszeteket normál disznósavóban inkubáltuk két órát. Ezután a metszetek inkubálását az alábbi immunreagensekben folytattuk: (1) $1:150$ -es hígítású anti-ChAT-ban $36-40$ órát 4 °C-on, (2) $1:5$ hígítású nyúl anti-patkány IgG-ben 1 órát szobahőmérsékleten, (3) $1:250$ hígítású patkány PAP-ban 1 órát szobahőmérsékleten, majd a (2) és (3) lépéseket még kétszer megismételtük. Az antitesteket normál disznósavóban hígítottuk, amelyet $0,01\%$ mertioláttal egészítettünk ki, hogy a hosszú inkubálások alatti óhatatlanul bekövetkező bakteriális szaporodást megakadályozzuk. Az anti-patkány IgG oldatához adtunk még 20% normál egérsavót is.

Az egyes inkubálások között a metszeteket háromszor 20 percig TBS-ben mostuk. Az utolsó lépést (a harmadik (3)!) követő öblítés után a szövethez kötődő immunperoxidáz kimutatására $3,3'$ -diaminobenzidin

sósavas sóját (DAB) használtunk kromogénként. Az előhívó oldat 0,05% DAB-ot, 0,1% $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -ot, 0,01% H_2O_2 -ot és 0,05 M TB-t tartalmazott. Az oldatot mindig frissen állítottuk össze, és elkészítése után szűrtük. A metszeteket 15-20 percig hívtuk elő, majd 0,05 M TB-ben öblítettük.

Fénymikroszkópos vizsgálathoz a metszeteket 0,5% zselatint és 0,05% timolt tartalmazó 0,05 M TB-ből húztuk föl tárgylemezre, majd levegőn megszáritottuk. Ezután a metszeteket fölszálló (30, 50, 70, 80, 90, 96 és 100%) alkoholos sorban dehidráltuk, xilolban derítettük, és Entellánnal lefedtük.

Elektronmikroszkópos előkészítés

A kiválasztott metszeteket az előhívást követően 0,13 M PB-ben öblítettünk, majd 0,13 M PB-ben oldott 1% OsO_4 -dal kezeltünk 1-2 órát sötétben. Ezután ismét PB-es mosás, majd 10-10 perces fölszálló alkoholos sorban történő dehidráálás következett. A 70%-os alkohol telített uranil-acetátot tartalmazott, és a kezelési idő ekkor 30 perc volt. Dehidráálás után az alkoholt fokozatosan propilénoxidra cseréltük ki 20 perces alkohol-propilénoxid 1:1 arányú oldatával, majd kétszer 20-20 perces tiszta propilénoxiddal történő kezeléssel.

Beágyazó anyagként Durcupánt használtunk, melyet az alábbi komponensekből (A/M, C, D és B) a gyártó cég szerint állítottunk össze: 12,5 g A/M + 0,55 g C + 0,23

g D + 10 g B. Propilénoxidból a metszeteket gyors mozdulattal a Durcupan egy-egy cseppjébe tettük, melyeket előzőleg tárgylemezre borított műanyag fóliára (Folpack) cseppentettünk. A metszeteket egy éjszakán át, szobahőmérsékleten infiltráltuk a Durcupan cseppekben. Ezután a cseppeket egy második Folpackkal takart tárgylemezzel lefedtük, és 56 °C-ra állított termosztátban polimerizáltuk 2-2 és fél napig. A második tárgylemezt eltávolítottuk, és a metszeteket magába foglaló Durcupan lapocskákat a beágyazó anyaggal feltöltött zselatin kapszulákkal leborítottuk. Ezután újabb 3 napos polimerizálás következett 56 °C-on.

A második polimerizálás után a gyantát letörtük a tárgylemezről, és a gyantába zárt metszetből vékony, arany színű metszeteket metszettünk. Az ultravékony metszeteket Formvárral fedett egylyukú gridekre úsztattuk föl, és levegőn rászárítottuk. A metszeteket előbb vizes telített uranil-acetáttal, majd ólom-acetáttal kontrasztoltuk. Az eképpen előkészített metszeteket Zeiss EM 10 elektronmikroszkóppal, 80 kV gyorsító feszültség mellett vizsgáltuk.

Az immunfestés kontrollálására vagy kihagytuk a primér antitestet, vagy helyettesítettük 1:1000 higítású normál patkánysavóval. Az immuncitokámiát ezekben az esetekben is a fentiek szerint végeztük el.

3.3.2. GABA immunhisztokémia

A szövet preparálása

Az egereket éteres altatás után a szívkamra megnyitásával elvéreztettük. A GCS-eket kipreparáltuk, és azonnal szobahőmérsékletű, 5% glutáraldehidet és 0,12 M PB-t tartalmazó fixálóba helyeztük 60-90 percre. Az immerziós rögzítés után a ganglionokat 4 °C-os TBS-ben mostuk 12-24 órán át, hogy blokkoljuk a szövethez kötődő szabad aldehid csoportokat. Időközben a ganglionokról eltávolítottuk a kötőszöveti burkot. Ezután a GCS-eket 24 órán át infiltráltuk 37 °C-on tartott ZSO-ban. Az infiltrálás után a mintákat magába foglaló zselatint hűtőszekrényben megdermesztettük, és a már említett módon a ganglionokat körbevágtuk. A zselatinos blokkokat 30% nádcukrot tartalmazó 4% formaldehid 0,1 M PB-os oldatában utófixáltuk 16 órán át 4 °C-on. A fixálási idő letelte után a formaldehidet ugyancsak 30% nádcukrot tartalmazó 0,05 M TB-vel távolítottuk el a blokkokból, ami szobahőmérsékleten 2-3 óra alatt következhet be. Ez utóbbi lépést azért kellett beiktatni, mert a formaldehid jelenléte rendkívül alacsony metszési hőmérsékletet tenne szükségessé.

10 µm-es kriosztát metszeteket készítettünk, amelyeket ezúttal sem szárítottuk tárgylemezre, hanem mint szabad úszó (= "free floating") anyagokat TBS-be gyűjtöttük. A metszeteket ezután a *Streptomyces griseus*

egyik fehérje bontó enzimével, pronázzal kezeltük, amely az antitesteknek a szöveti antigénhez való hozzáférhetőségét biztosítja (Dobó et al., megjelenés alatt). A metszeteket TBS-ben oldott 0,1% pronázzal kezeltük szobahőmérsékleten 15-20 percig, majd TBS-ben kétszer öblítettük. Ezt követően került sor a GABA immuncitokémia alkalmazására.

Immuncitokémiai protokoll

Immunfestési módszerünk az ún. egy hidas (= "single bridge") PAP technika volt, szemben a ChAT immunhisztokémiai azonosítására használt három hidas PAP technikával, ami azt jelenti, hogy a kötő-szekunder - antitestet csak egyszer alkalmaztuk.

A metszeteket normál disznósavóval kezeltük 2 órát szobahőmérsékleten, majd a következő immunreagensekben inkubáltunk 37 °C-on: (1) 1:150 higítású anti-GABÁ-val (a) vagy 1:30 higítású anti-GABÁ-val (b) 6-8 órán át; (2) 1:10 higítású patkány anti-nyúl IgG-vel vagy 1:30 higítású kecske anti-nyúl IgG-vel 1,5 órát; (3) 1:250 higítású nyúl PAP-pal 1,5 órán át. Az immunreagenseket normál disznósavóban higítottuk. A szekunder antitesteket 10% normál egérsavóval egészítettük ki. Az inkubálások között a metszeteket TBS-sel mostuk. Az immunperoxidáz reakciót a már említett DAB-nikkel előhívóval tettük láthatóvá, azzal a különbséggel, hogy 0,01% H₂O₂ helyett csupán 0,005%-ot használtunk. Az

optimális előhívási idő 10-15 perc volt.

Ezután a metszeteket a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a ChAT immunhisztokémiánál leírtak szerint készítettük elő.

Az anti-GABA antitestek specifitását ellenőriztük. A ganglion metszeteivel együtt inkubáltunk olyan nitrocellulóz lapocskákat, amelyekre dializált patkány agyi homogenáthoz glutáraldehiddel konjugált különböző aminosavakat abszorbeáltak (Ottersen et al., 1986; Storm-Mathisen ajándéka). Az egyes foltok konjugált aszparaginsavat, béta-alanint, GABÁ-t, glicint, glutaminsavat valamint taurint.

Az immunfestés specifitását is megvizsgáltuk. A kontroll metszetek esetén vagy kihagytuk az anti-GABA antitesteket, vagy helyettesítettük ezeket 1:1000 hígítású normál nyúlsavóval, egyébként a festést a leírtak szerint végeztük el.

3.3.3. GAD immuncitokémia

A szövet preparálása

Az állatokat éteres altatás után perfúziósan fixáltuk az aortán keresztül az alábbiak szerint: (1) a vért 3-4 ml PBS-sel mostuk ki; (2) majd 8-10 ml frissen készített fixálóval folytattuk a perfúziót, amely 4% formaldehidet és 0,12 M PB-t tartalmazott; (3) végül a fixálót 15 ml 0,12 M PB-vel mostuk ki az állatokból, hogy elkerüljük a szövetek túlfixálását. A CCS-eket

kipreparáltuk, majd a ChAT immuncitokémiánál részletezett módon metszeteket készítettük.

Immuncitokémiai protokoll

Immunfestési módszerként ezúttal is az ún. egy hidas PAP technikát alkalmaztuk.

A szabad úszó 25 μm vastag fagyasztott metszeteket normál disznósérumban előinkubáltuk szobahőmérsékleten 2 órán át. Ezt követően az alábbi inkubálásokkal folytattuk a procedúrát: (1) 1:2000 higítású anti-GAD 4 $^{\circ}\text{C}$ -on 36-50 órát; (2) 1:20 higítású nyúl anti-birka IgG szobahőmérsékleten 3 órát; (3) 1:200 higítású kecske PAP szobahőmérsékleten 3 órán át. Valamennyi antitestet normál disznósavóban higítottuk, amelyet 0,1% Triton X-100-zal egészítettük ki. A második immunreagenst 10% normál egérsavóval egészítettük ki.

Az immunreakciók vizualizálását, a metszetek előkészítését a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a ChAT immuncitokémia leírásánál részletezett módon végeztük.

A GAD immunhisztokémia kontrolljában a primér antitestet kihagytuk, és az immunfestést az előzőek szerint hajtottuk végre.

4. EREDMÉNYEK

4.1. ChAT-pozitív struktúrák lokalizációja

4.1.1. Fénymikroszkópos megfigyelések

Az egér GCS-ben renkívül sok ChAT-immunreaktív axon található. Az axonok heterogéneen oszlanak meg a ganglionban. A legintenzívebb festődés a ganglion rosztrális pólusában és a CST belépési helyénél látható: (1A és 1B ábrák).

A CST-ben igen nagy számú vastag, intenzíven jelölődő rost fut. A rostok itt nem elágazóak, egyenletesen vastagok, varikózusszerű kiöblösödés nem figyelhető meg rajtuk (1B ábra). Az immunreaktív axonok a CST-ből a ganglionba lépve kisebb-nagyobb kötegekre válnak szét. A kötegek egy része, a ganglion hossz tengelyével párhuzamosan, a rosztrális pólus felé tart (1A ábra). A kötegeket elhagyó axonok fokozatosan elágaznak, egyre vékonyabb rostokat képezve (1C, 1D és 1E ábrák).

A ganglion belsejében, a mediális és kaudális részekben, a ChAT-immunreaktivitás helyenként foltszerűen jelenik meg (2A ábra). E foltokat az immunpozitivitást nem mutató principális neuronok ölelik körbe. A vékonyabb axonokon gyakoriak a megvastagodások, varikozitások (2B és 2D ábrák). A varikozitások többségét vagy egyes ganglionáris neuronok közvetlen közelségében, sokszor felszínükkel szorosan érintkezve (2B és 2D ábrák), vagy a neuronok



által közre fogott glomerulusszerű szerkezetben található meg (2A és 2C ábrák). Szerencsés esetben megfigyelhető, hogy a varikozitások olyan sűrűn követik egymást az axonokon, hogy a köztük lévő távolság kisebb egy átlagos varikozitás átmérőjénél is. Nagy nagyítással az is megállapítható, hogy a foltszerűen megjelenő immunpozitív glomerulusok tulajdonképpen a rostok sokszoros arborizációjának következtében létrejövő axonfonadékok (2C ábra).

A GCS rostrális pólusában található a legtöbb festődő axon, és itt lokalizálható a legtöbb varikozitás is. E pólusban olyan sűrű az axonháló, hogy a finomabb részletek tanulmányozására nincs lehetőség.

Fénymikroszkóposan úgy tűnik, hogy vannak ganglionáris neuronok, amelyeket a ChAT-pozitív axonok rendkívül intenzíven innerválnak, és vannak olyan neuronok, amelyek látszólag nem kapnak kolinerg innervációt.

A ganglionáris neuronok a ChAT-antitesttel nem jelölődtek. Továbbá nem sikerült immunreaktív interneuronokat sem kimutatni.

Különös gondot fordítottunk a ganglion posztganglionáris törzseinek ChAT immuncitokémiai festődésére. Az ECN-ben és ICN-ben csak igen ritkán találtunk immunpozitív rostot. E rostok vékonyak, nem elágazóknak tűntek. Varikozitást nem mutattak (3B és 3C ábrák).

4.1.2. Decentralizálás hatása a ChAT immunreaktivitásra

A ganglion preganglionáris denervációját követő 5-11. napon ChAT-immunreaktivitást nem észleltünk (2F ábra). Ugyanakkor a kontralaterális (jobb oldali) ganglionokban a fentiekhez hasonló festődést kaptunk.

4.1.3. ChAT immunreaktivitás elektronmikroszkópos analízise

ChAT immunhisztokémia alkalmazása után a metszetek egy részét elektronmikroszkópos vizsgálatokra beágyasztuk. Alkalmos beágyazás után a ganglion ChAT immunfestésére jellemző területeket fénymikroszkóp alatt kiválasztottuk, kivágtuk a metszetekből és újra ágyasztuk.

Az ún. pre-embedding elektronmikroszkópos immuncitokémia gyakran visszatérő problémája az ultrastruktúrában bekövetkező bizonyos károsodások. A ChAT minél megbízhatóbb (érzékenyebb) immuncitokémiai kimutatására alkalmazott három-hidas PAP technika sajnálatos módon nem kedvezett a ganglion ultrastruktúrális vizsgálatának. Minthogy, azonban, célunk nem az egér GCS finomszerkezetének leírása, hanem a ganglion kolinerg rendszerének elektronmikroszkópos analízise volt, véleményünk szerint a választott technika megfelelőnek bizonyult célunk eléréséhez.

ChAT immunhisztokémiával festett metszetekkel

kapcsolatos fénymikroszkópos megfigyeléseinket az elektronmikroszkópos vizsgálat messzemenőleg igazolta; immunreaktivitást kizárólag axonokban találtunk, amelyek a neuropil glomerulusszerű szerkezetében tömörülnek (4. ábra). Az immunpozitív rostok döntő zömében mielinhüvely nélküliek (5B ábra), de ritkán immunreaktivitást ismertünk föl mielinhüvellyel rendelkező axonokban is (5A ábra). Az intenzíven jelölődő varikozitások vagy idegvégződéses jelentékeny része preszinaptikusnak adódott. A képződő szinapszisok asszimmetrikus típusúaknak bizonyultak. A ChAT-immunpozitív terminálisok kisebb hányada principális ganglionáris neuron perikaryonján képez szinapszist, vagy közvetlenül annak felszínén (5C ábra), vagy inkább a szómáról kinövő tüskén (5D ábra). Mindkét esetben a preszinaptikus terminális ugyan nagy felületen érintkezik a posztszinaptikus neuron membránjával, a posztszinaptikus membránmegvastagodás csak kicsiny területre terjed ki. Az ozmiofil megvastagodás sokszor a szómatüske csúcsához közel található (5D ábra).

A ChAT-immunreaktív varikozitások vagy terminálisok nagyobb hányada dendriten, primér dendriten (5E ábra) vagy szekundér dendriten szinaptizál (5F és 5G ábrák). Az axo-dendritikus szinapszisok kisebb része a dendrit törzsén közvetlenül (5E és 5G ábrák), nagyobb része dendrittüskén jött létre (6. ábra). A dendrittüskék alakja igen változatos lehet.

Szerencsés esetben látható, hogy egyetlen metszeten belül egy pozitív axon kettő vagy annál több szinapszist (ún. "en passant" szinapszisok) is képezhet (5G ábra). Sorozat metszeteken megfigyelhető, hogy egy pozitív axon ugyanazon a dendrittüskén több pontban is szinaptizálhat (6B-C ábrák). Esetenként az immunjelölt preszinaptikus terminális csaknem teljesen körbefog egy dendrittüskét, de a posztszinaptikus membrán-megvastagodás nem terjed ki a túske egész felületére (6A és 6H ábrák). A szinaptikus kapcsolat létesülhet a túske apexén (6A és 6C ábrák), vagy a túske oldalán (6D és 6H ábrák), vagy annak bázisán (6F ábra). Máskor egy-egy pozitív terminálist egy szekundér dendrit nyúlványa növi körbe. Ilyenkor a szinaptikus junkció nagyobb felületen alakulhat ki (6E ábra). Az axo-dendritikus szinapszisok érdekes jelensége az, amikor az immunpozitív terminális egyszerre szinaptizál a dendrit törzzsel és a dendritből kinyúló tüskével (6G ábra).

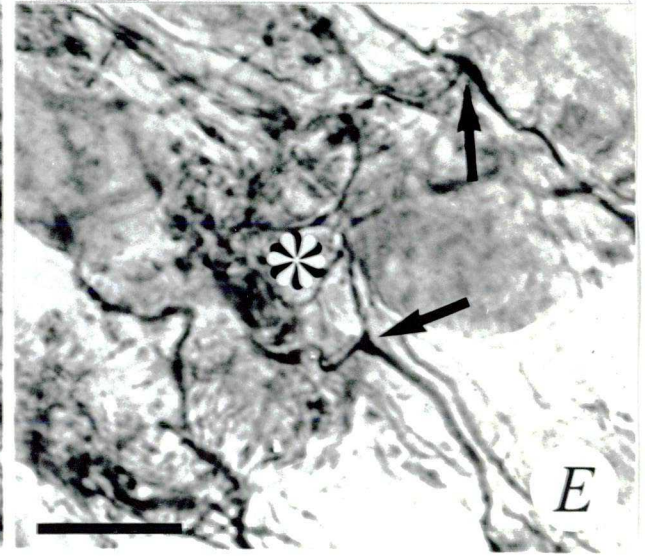
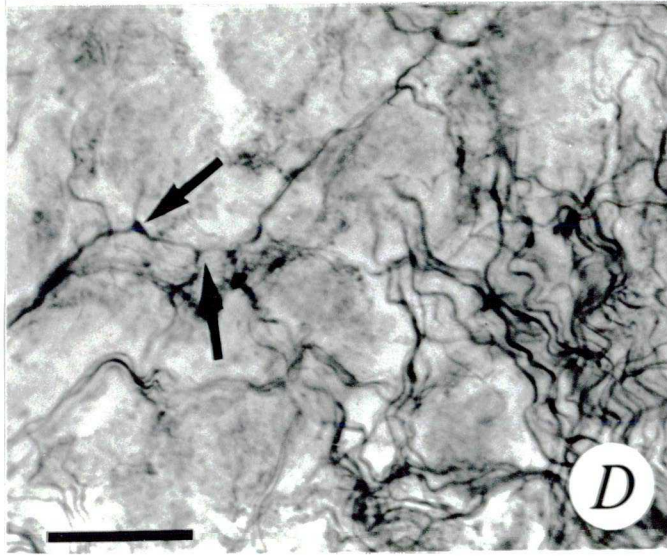
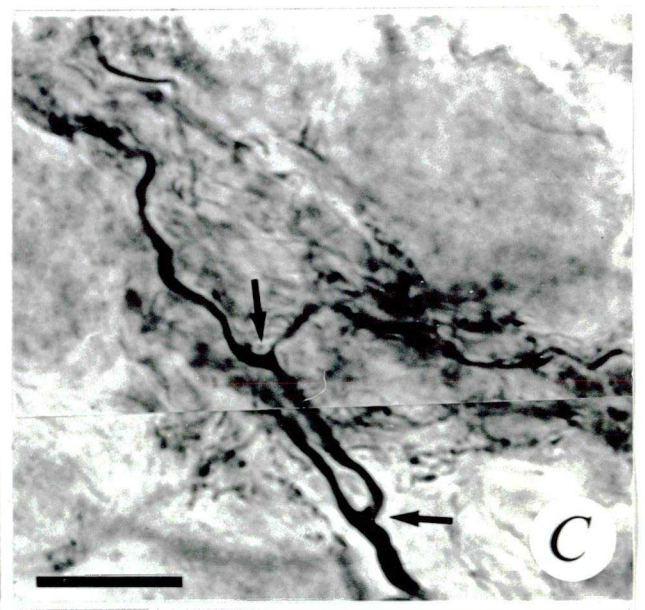
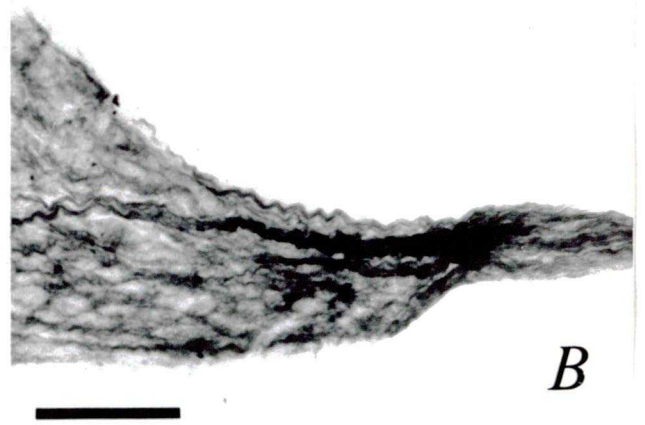
Az elektronmikroszkópos vizsgálat során egy különös, az egér GCS-re jellemző képletet figyeltünk meg; két preszinaptikus terminális két oldalról fog közre egy dendrittüskét. A tüskében, a két posztszinaptikus membrán-megvastagodás között egy elektron-denz sáv húzódik. A talált 23 eset mindegyikében a közrefogó terminálisok immunreaktívak voltak (6I-J ábrák).

A GCS-ben csaknem valamennyi varikozitás és

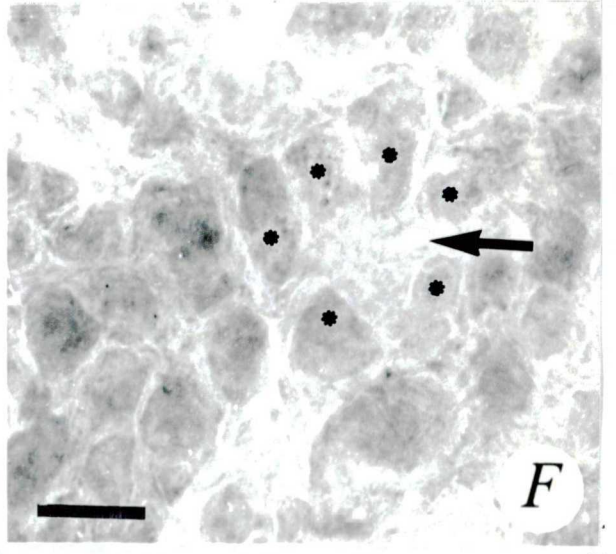
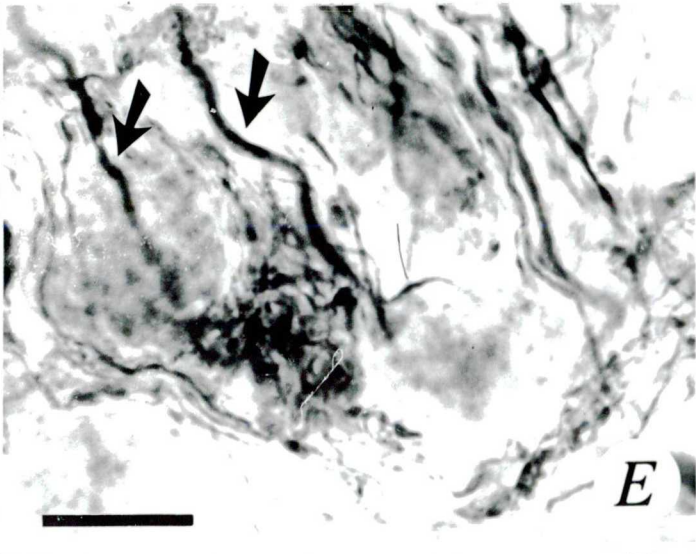
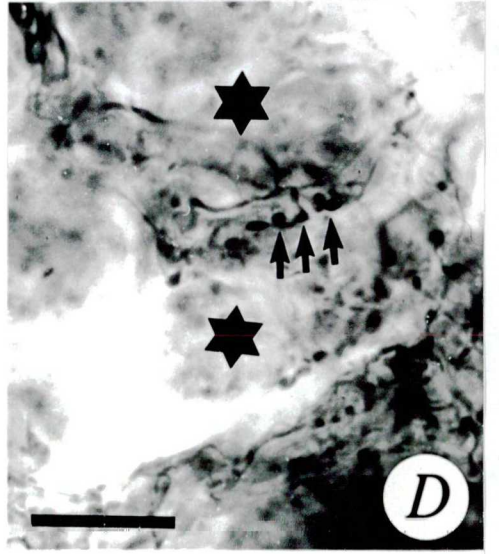
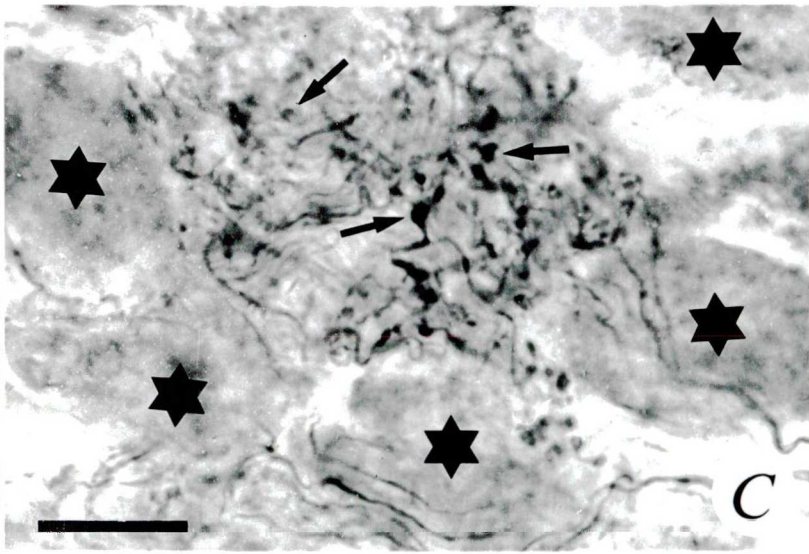
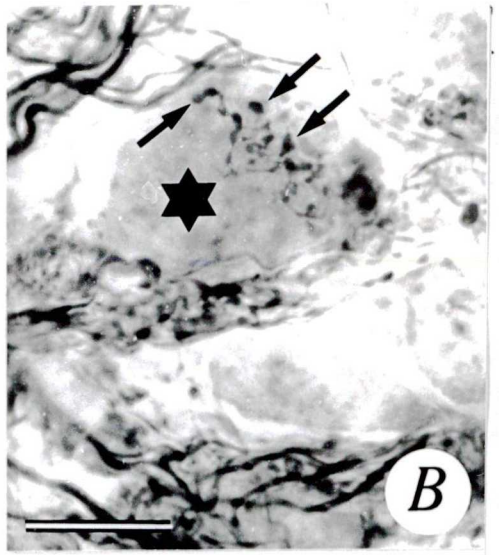
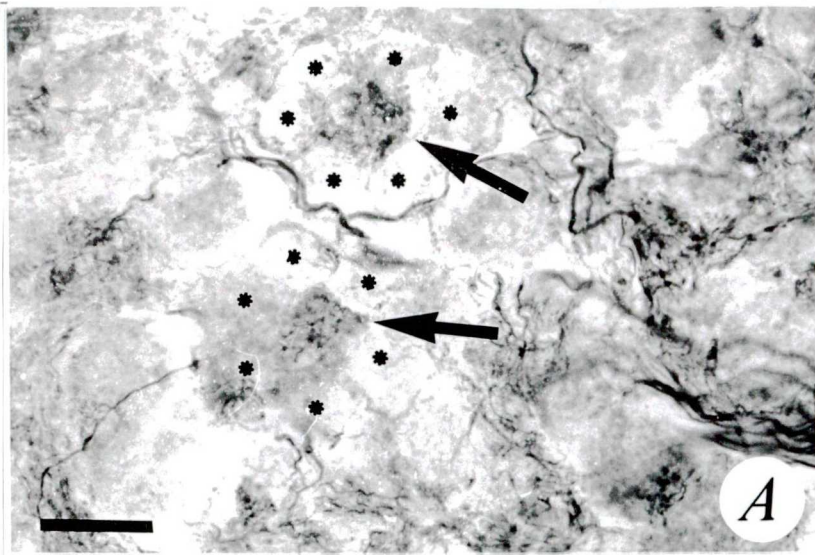
terminális ChAT-immunopozitivitást mutatott, de kis számban nem jelölődő terminálist találtunk (6K ábra).

Az ozmiofil reakció-végtermék általában olyan intenzíven akkumulálódott a varikozitásokban és terminálisokban, hogy azok finomszerkezetének felismerése nem volt lehetséges. A DAB polimer zömében a szinaptikus vezikulák közötti teret csaknem teljesen kitöltötte, sőt azokat sokszor el is fedte. Esetenként a polimer nem egyenletesen rakódott le a varikozitásokban. Ilyenkor feltűnő volt, a szinaptikus vezikulák nagy száma. Az immunpozitív preszinaptikus elemekben a hólyagocskák kicsik, kerekdedek, és belül üreseknek tűntek. Ritkán az elemekben nagyobb, ún. "dense-core" vezikulákat is fel lehetett ismerni.

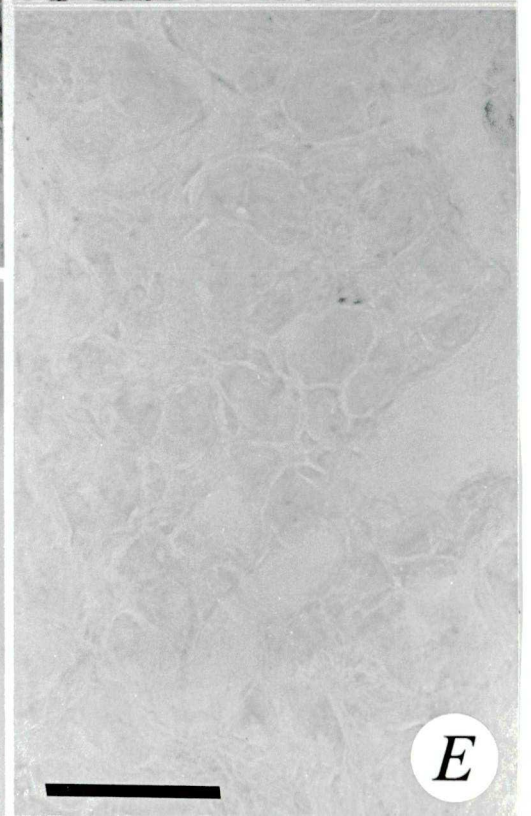
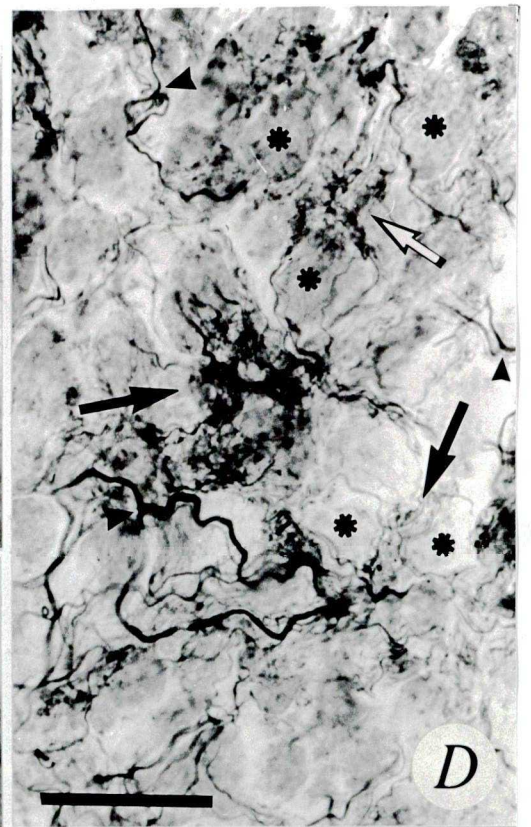
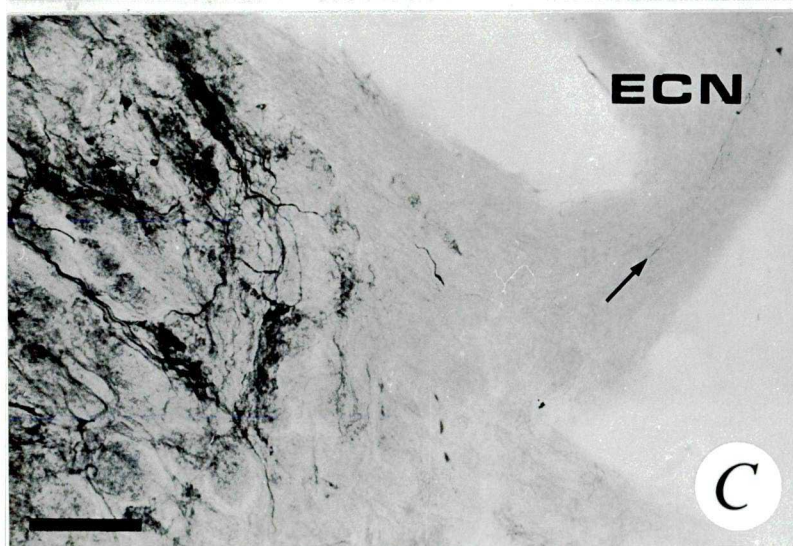
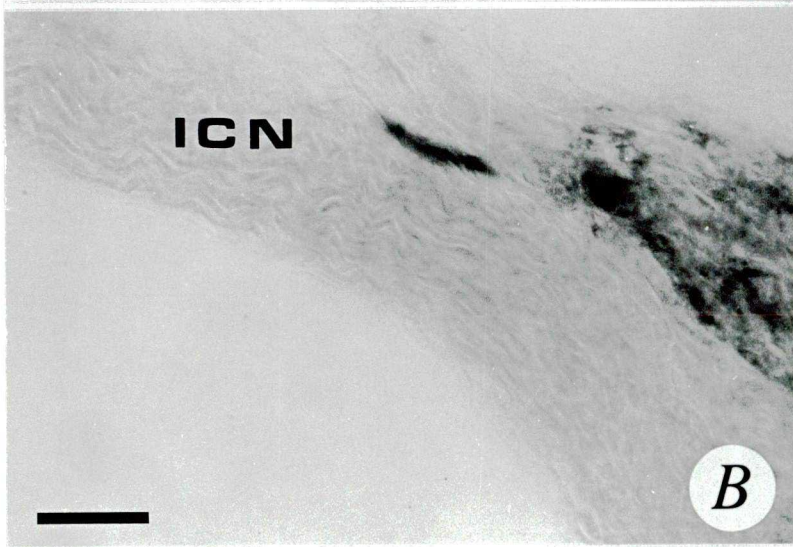
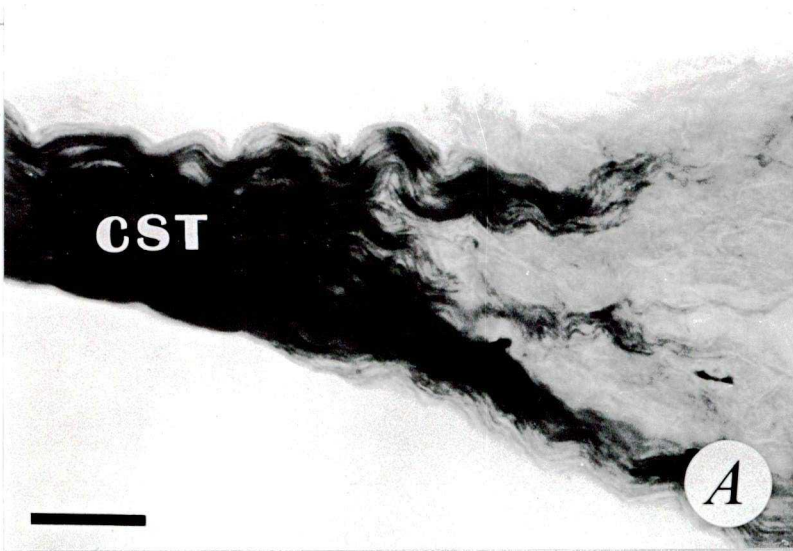
1. ábra. ChAT immuncitokémiai kimutatása egér GCS-ben. (A) ChAT-pozitív idegrostok megoszlása a ganglionban. A nyilak a ChAT-immunreaktív axonkötegekre mutatnak, amelyek láthatólag a CST-ből rajzanak ki, és gyakran egészen a rostrális pólusig követhetők. (B) Az immunjelölt axonok kötegekben lépnek be a ganglionba, ahol kezdetben még nem elágazóak, és nem viselnek varikozitásokat. (C-E) A ganglion belsejében a kötegeket elhagyó ChAT-pozitív axonok fokozatosan elágaznak, egyre vékonyabb rostokat képezve. A nyilak az elágazódás helyét jelölik. (Kalibrációs vonal = (A): 100 μm , (B): 100 μm , (C): 15 μm , (D): 50 μm , (E): 20 μm).



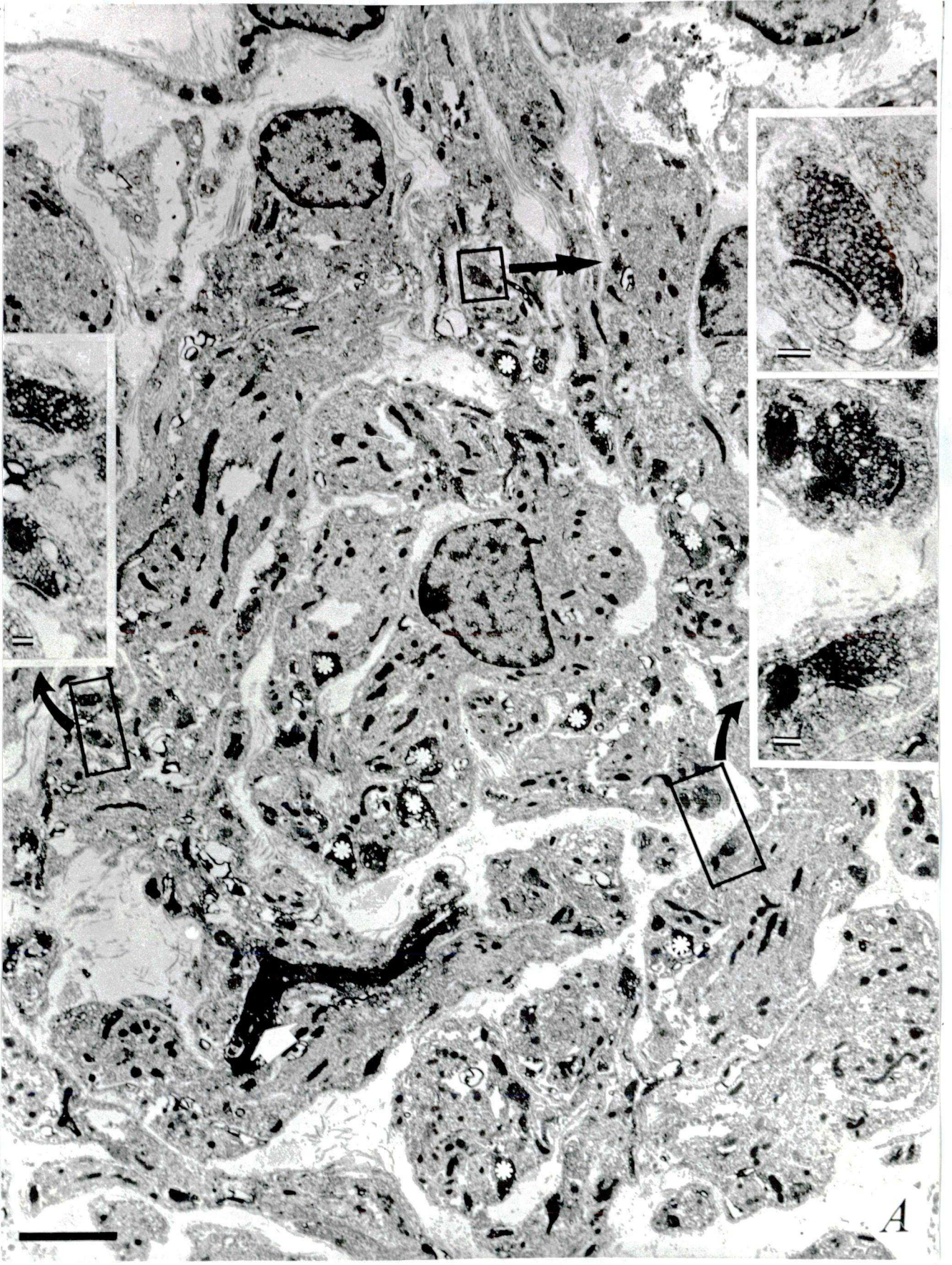
2. ábra. ChAT immunreaktivitás fénymikroszkópos lokalizációja egér GCS-ben. (A) Kisebb nagyítás mellett a ganglion mediális és kaudális részében a ChAT immunreaktivitás foltszerűen jelenik meg (nyilak), amelyeket a ChAT-negatív principális neuronok (csillagok) fognak közre. A ChAT-pozitív foltok nagyobb nagyítás mellett sűrű axonhálóként vizualizálhatók (C).. (B-D) A vékonyabb immunjelölt axonokon gyakran bulbózusos megvastagodás vehető észre. A nyilak a varikozitásokra mutatnak, míg a csillagok a ganglionáris neuronokat jelölik. (E) Esetenként a glomerulusszerű szerkezetbe axonkollaterálisokat adó vastagabb idegrostokat is megfigyelhetjük (nyilak). (F) A preganglionáris axotómiát követő 7 nap túlélési idő után a ganglionban ChAT immunreaktivitást nem találunk. E képen demonstráljuk, hogy a decentralizált GCS-ben a principális idegsejtek (csillagok) által körülvevett glomerulusszerű szerkezet (nyíl) festődése elmarad. (Kalibrációs vonal = (A): 75 μm , (B): 20 μm , (C): 15 μm , (D-E): 20 μm , (F): 50 μm).



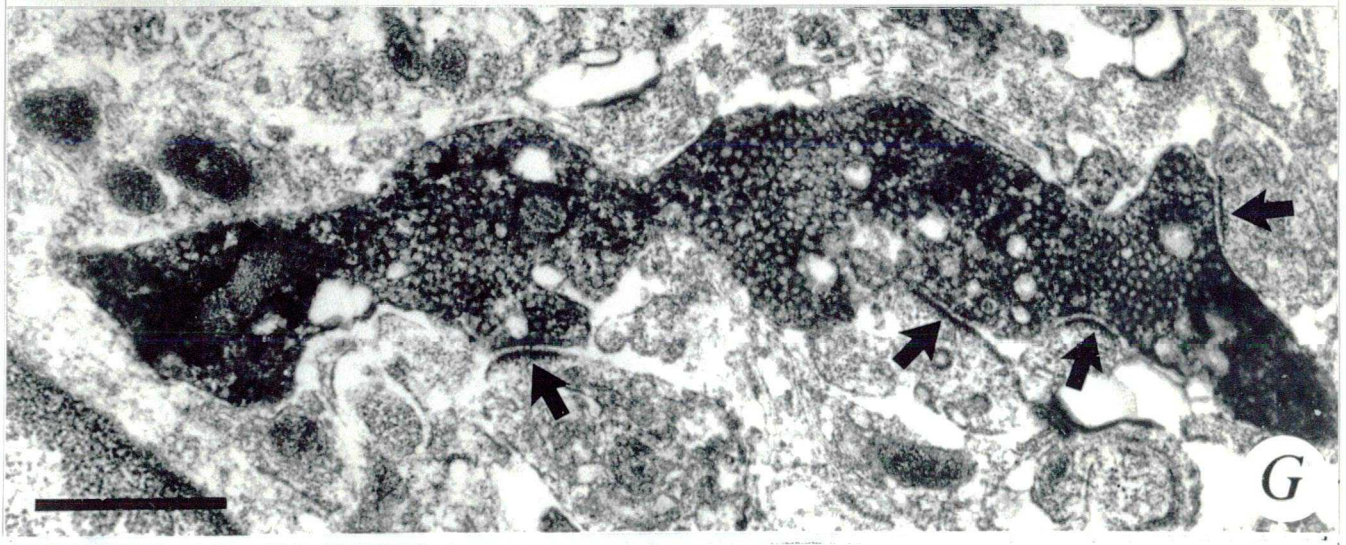
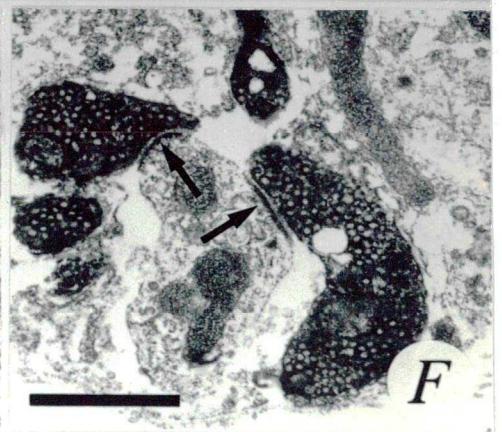
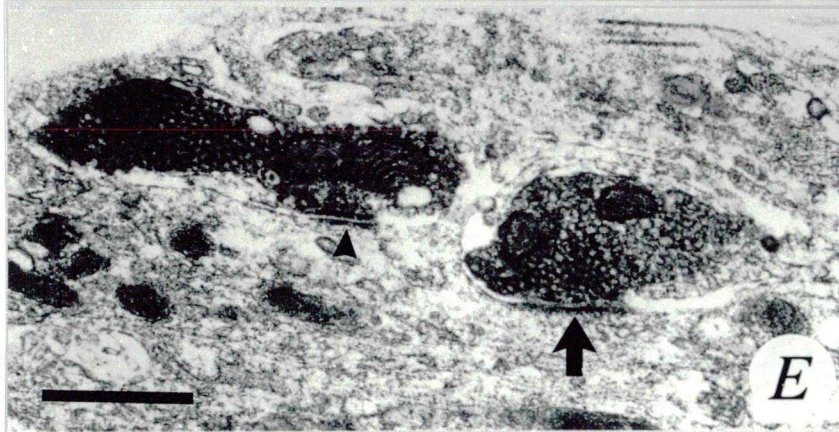
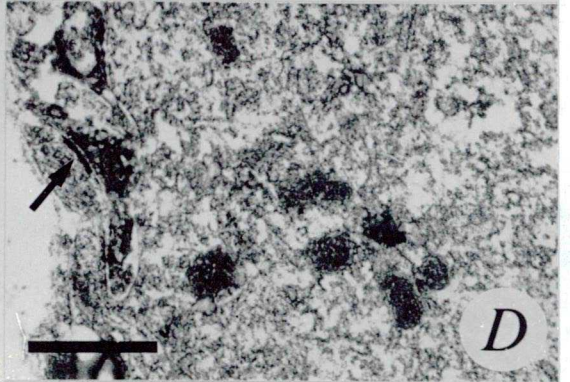
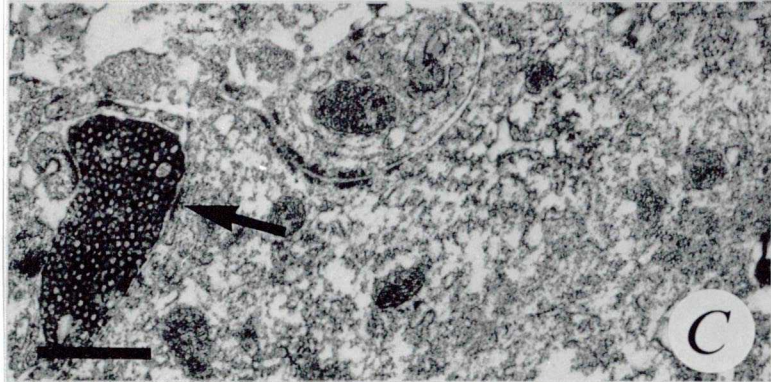
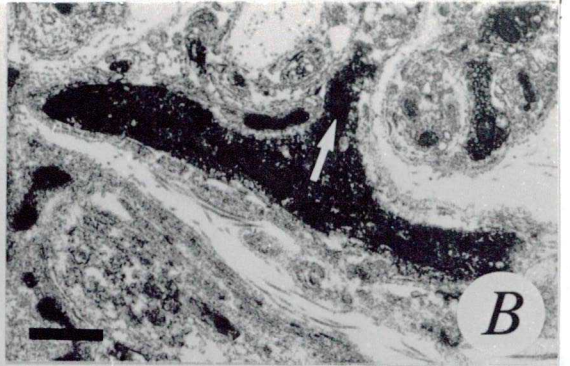
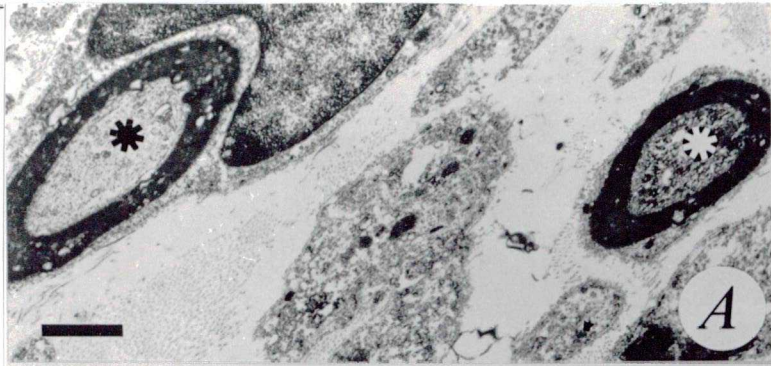
3. ábra. ChAT immunreaktivitás fénymikroszkópos lokalizációja. (A-C) Egér GCS preganglionáris (A) - és posztganglionáris törzscsonek (B-C) ChAT immunreaktivitásának összehasonlítása. A CST "zsúfolásig tele" ChAT-pozitív axonokkal (A), míg az ICN-ben illetőleg az ECM-ben ChAT-pozitív idegrostokat csak a legritkább esetben sikerült találnunk (B-C). A nyíl egy gyengén jelölődő vékony ChAT-immunpozitív rostra mutat (C). (D-E) ChAT immunfestés kontrolljának demonstrálása ugyanabból a ganglionból származó metszetekben: ChAT-antitest alkalmazásával (D), illetve anélkül (E). (D) ChAT-antitesttel történő inkubálás után a bemutatott metszet részletben a ChAT festésre jellemző csaknem valamennyi jellegzetességet megfigyelhetjük. A csillagok a ChAT-negatív principális neuronokat, míg a nyílfejek az elágazódásokat jelölik. A fehér nyíl egy glomerulusszerű szerkezetet céloz meg, amelyet ganglionáris neuronok vesznek körül. A fekete nyilak a neuronok közti ChAT immunreaktivitás intenzitásbeli különbségeinek két szélsőséges esetét mutatják. (E) Ha a primér antitestet kihagytuk, az immunperoxidáz technika nem eredményezett festődést. (Kalibrációs vonal = (A-C): 50 μ m, (D-E): 70 μ m).



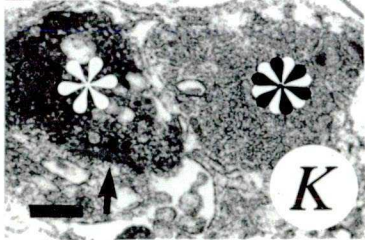
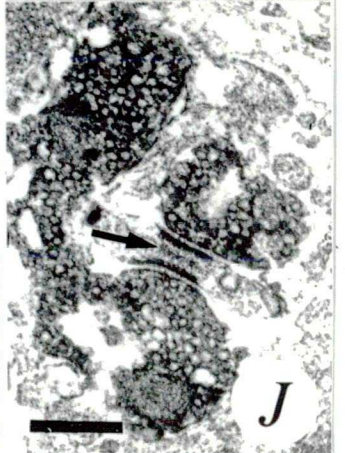
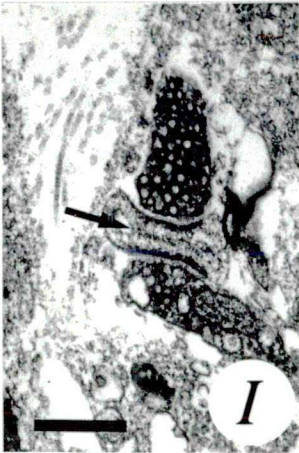
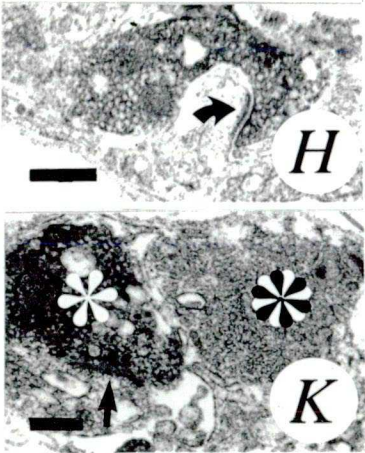
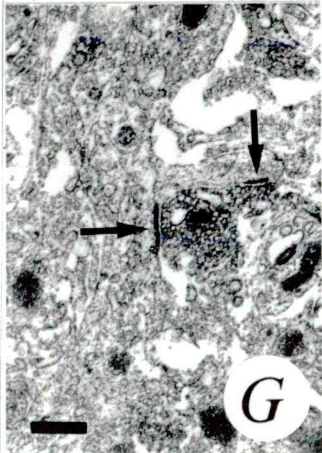
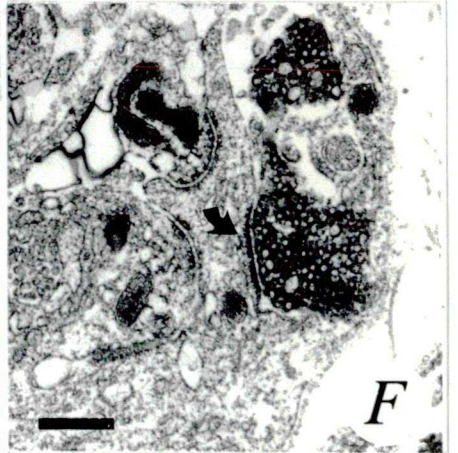
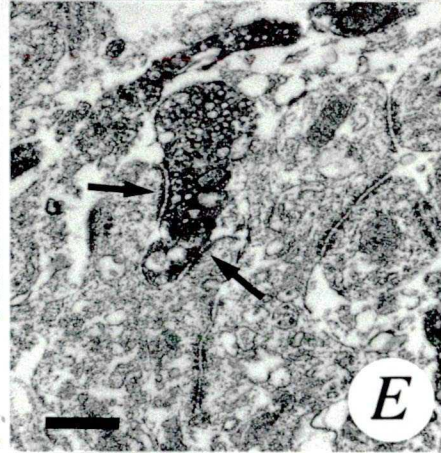
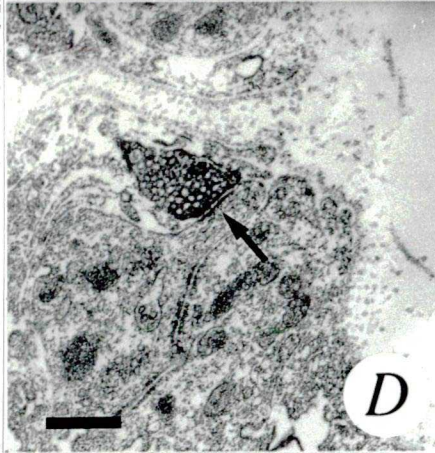
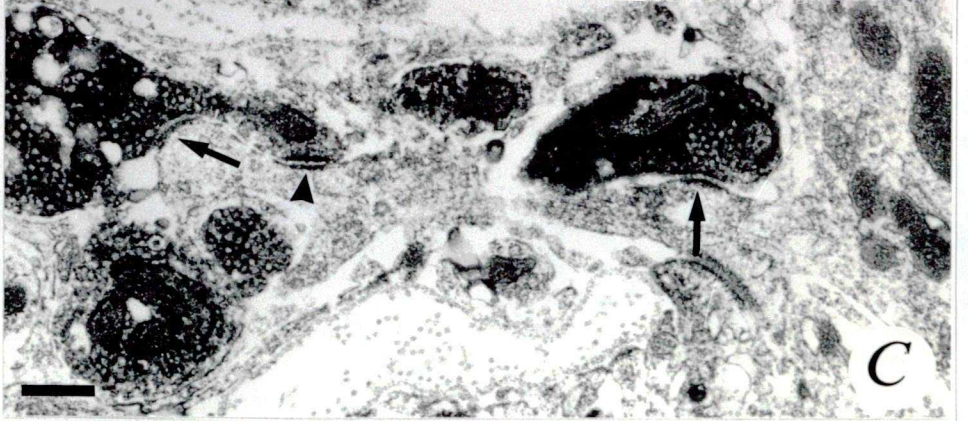
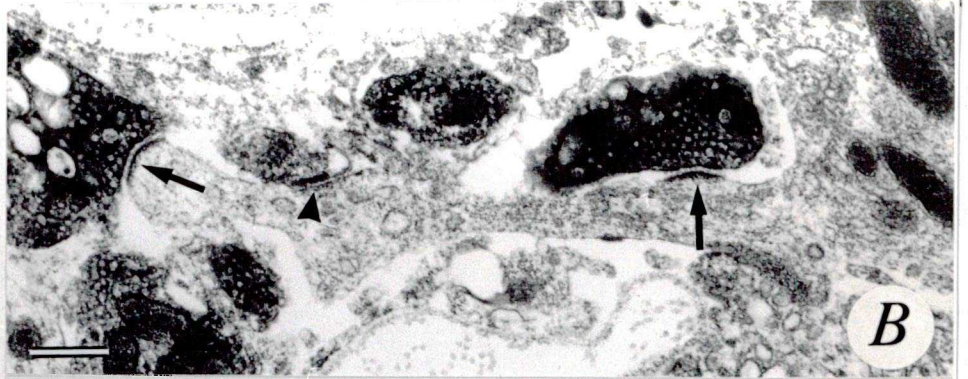
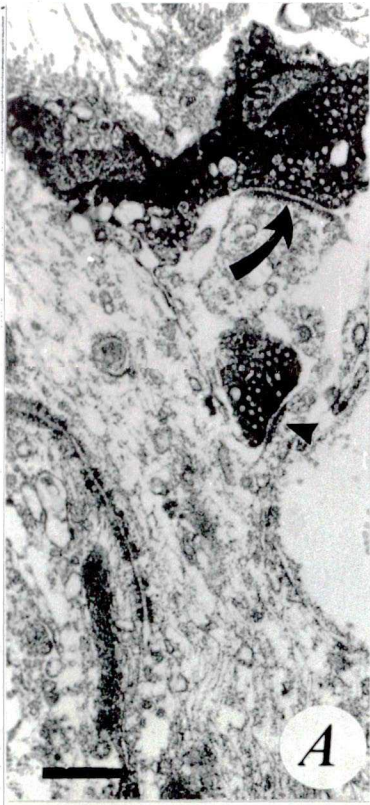
4. ábra. ChAT immunreaktivitás elektronmikroszkópos lokalizációja egér GCS-ben. (A) Kisebb nagyítás mellett megfigyelhető az immunreaktív varikozitások megoszlása egy glomerulusszerű szerkezetben. A csillagok egy-egy ChAT-pozitív idegvégződést jelölnek. A fekete nyilak az egyes bekeretezett metszet részletek kinagyított képeire mutatnak, amelyekben látható, hogy a ChAT-pozitív idegelemek aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatban vannak. A jobb felső ábra részletben egy ritka jelenséget, a posztszinaptikus membránmegvastagodással párhuzamos ozmiofil csíkot figyelhetjük meg. Az (A) ábra bal alsó negyedében lévő fehér nyíl egy tipikus, mielinhüvellyel nem rendelkező ChAT-pozitív axon profilt jelöl. (Kalibrációs vonal = (A): 5 μm , (képbetétekben): 0,4 μm).



5. ábra. ChAT immunreaktivitás ultrastrukturális lokalizációja egér GCS-ben. (A) Ritkán reakció végterméket figyelhetünk meg mielinhüvelyes axon profilban (fehér csillag), illetve még ritkábban található olyan mielinhüvellyel rendelkező axon is, amely ChAT immunreaktivitást nem mutat (fekete csillag). (B) A ChAT-pozitív axon profilokat többnyire mielinhüvely nem fedi, helyette vékony gliasejtes hüvely különíti el azokat a környező kötőszövettől. A fehér nyíl a vékonyabb axonkollaterálisra mutat. Az ábrán két ChAT-pozitív bouton is fölismerhetünk. (C) ChAT-pozitív terminális egyszerre képez szinapszist a ChAT-negatív szómával (nyíl) és egy dendrittövissel. Érdekes gyakori jelenség, hogy a perikaryonba betüremkedik egy szekunder dendrit, és a kapcsolódási felszínüket macula adherens erősíti. (D) ChAT-pozitív szinaptikus végtalp szomatüskén. (E) A jobb oldali ChAT-pozitív terminális primér dendrittel szinaptikus kontaktusban van, míg a bal oldali - nem preszinaptikus - terminális szimmetrikus membrán specializáció (nyílfej) erősíti a dendrittörzshöz. (G) Az intenzíven jelölődő axon "en passant" szinaptikus kapcsolatban van egy szekunder dendrittel. A középső posztzinaptikus membrán-megvastagodás alatt látható egy jellegzetes ún. "coated" vezikula, a preszinaptikus idegelemben pedig egy nagy granuláris vezikula figyelhető meg. (C-F) A nyilak a posztzinaptikus membrán-megvastagodásra mutatnak. (Kalibrációs vonal = (A): 1,5 μm , (B): 1 μm , (C-G): 1 μm).



6. ábra. ChAT-immunreaktív preszinaptikus terminálisok ultrastruktúrális lokalizációja egér GCS-ben. (A) Az ún. "knob-like" dendrittüskével szinaptizáló ChAT-pozitív idegvégződésben (fent) a szinaptikus vezikulák a posztszinaptikus membrán-megvastagodás (nyíl) irányában akkumulálódnak. Az alsó immunjelölt terminális esetében azonban, látszólag nem dúsulnak fel a szinaptikus vezikulák az ún. "filiform" dendrittüske felé (nyílfej). (B-C) Sorozat metszeteken az idegelemek kapcsolódásának jellege egyértelműen meghatározható. Nem ritkán a dendrittüske csúcsán szinaptizáló ChAT-pozitív terminálisokat (bal oldali nyílak) közötti axon szegmenseket szimmetrikus membrán specializációk (nyílfejek) erősítik a dendrithez. A jobb oldali szinapszis (nyílak) tipikus aszimmetrikus megjelenésű. (D és H) ChAT-pozitív axonterminális a dendrittövis oldalán létesít szinaptikus kapcsolatot. (E) A ChAT-immunreaktív idegvégződést "gallérszerűen" veszi körül a szekunder dendrit, ily módon a szinaptikus kapcsolat nagyobb felszínen alakul ki. (F) Az immunjelölt terminállal szinaptizáló dendrittüske felülete jellegzetes betüremkedést mutat ("coated pit"), amely a posztszinaptikus membrán-megvastagodás szélén fordulhat elő. (G) A ChAT-pozitív terminális egyszerre képez aszimmetrikus megjelenésű szinapszist a dendrittörzzsel és a dendritből kinövő tövissel. (I-J) Két immunpozitív terminális ugyanazon a dendrittüskén szinaptizál. E jellegzetes szinaptikus asszociációban található dendrittüskék középvonalában ozmiofil csík húzódik (nyílak). (K) A ChAT-pozitív preszinaptikus idegelem mellett egy ChAT-negatív terminális azonosítható, amelyben elliptikus, inhibítórikus jellegű szinaptikus vezikulák ismerhetők fel. (D-H és K)-ban a nyílak a posztszinaptikus membrán-megvastagodásokat célozzák. (Kalibrációs vonal = (A-J): 1 μ m, (K): 0,5 μ m).



4.2. GABA-pozitív struktúrák lokalizációja

4.2.1. Fénymikroszkópos megfigyelések

A ganglionban számos intenzíven jelölődő rost található. Az axonok nem egyenletesen oszlanak meg a ganglionon belül. Helyenként a GABA-immunpozitív rostok véletlenszerű akkumulációja figyelhető meg (7A ábra).

A CST-ben sok vastag immunjelölt axon fut. A ganglionba lépő immunpozitív rostok egy része a kaudális területen még párhuzamosak maradnak (7B ábra). A kötegen belül még nem elágazóak, nem varikózusak. A ganglionon belül a köteget elhagyó rostok azonban gyakran ágaznak el. A vékonyabb axon kollaterálisok gyöngyfűzésre emlékeztető varikózus megvastagodásokat viselnek (7B és 7D ábrák).

Egyes ganglionáris neuronokat az immunpozitív rostok sűrűn körbehálózzák (7A és 7C ábrák). Esetenként a festődött rostok glomerulus szerkezetet képeznek, amelyek körül principális neuronok rendeződnek (7D ábra).

A GCS-ben kevés, kicsiny GABA-pozitív neuron azonosítható (7E-F ábrák). Alakjuk lehet hosszúkás vagy ovális. Alkalmanként egy-két nyúlványuk is felismerhető, amelyeken varikózus megvastagodások különülhetnek el. A ganglionáris principális neuronok nem mutattak GABA-immunreaktivitást.

Az egér GCS posztganglionáris törzseiben a gondos vizsgálat ellenére sem találtunk GABA-immunpozitív



rostokat (7A ábra).

A GCS-ben, főként az ECN eredési helyéhez közel néhány vékonyabb véredény körül érdekes GABA-immunreaktív gyűrű figyelhető meg (7G ábra).

4.2.2. Decentralizálási hatása a GABA immunreaktivitásra

A preganglionáris axotomiát követő 4-11. napon megvizsgáltuk a ganglion GABA immunhisztokémiai festődését. Az immunpozitív rostok száma szignifikánsan csökkent a kontralaterális (jobb oldali) ganglionban talált rostokhoz viszonyítva. A kaudális pólusra jellemző párhuzamosan rendeződött axonok festődése elmaradt, azonban a decentralizált ganglionban is tapasztalható igen kevés, varikozitást viselő rost. A tipikusnak tekinthető gazdagon innervált principális neuronok nem különültek el, sőt a glomerulusszerű szerkezetet sem sikerült találnunk az ipsilaterális ganglionban.

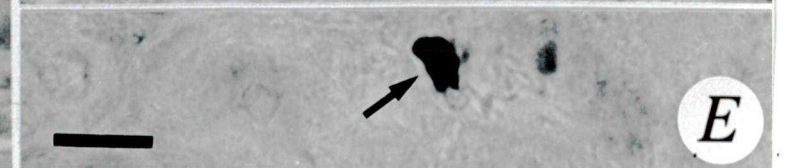
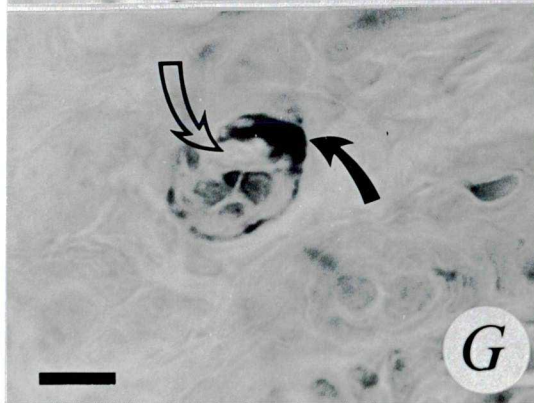
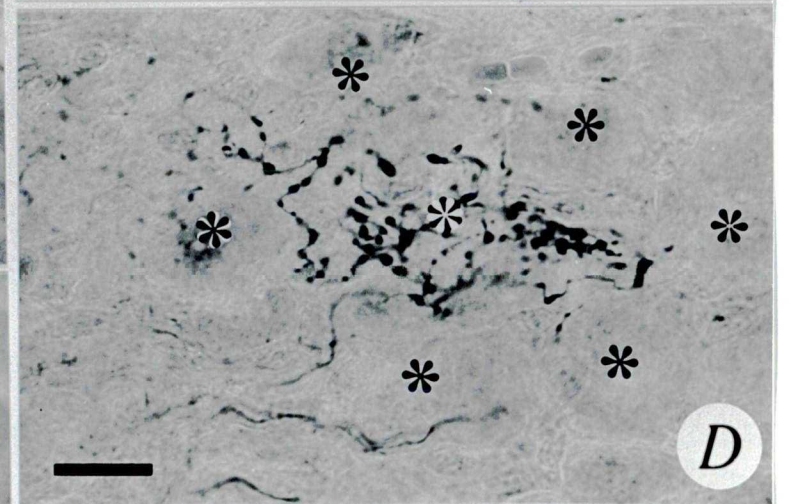
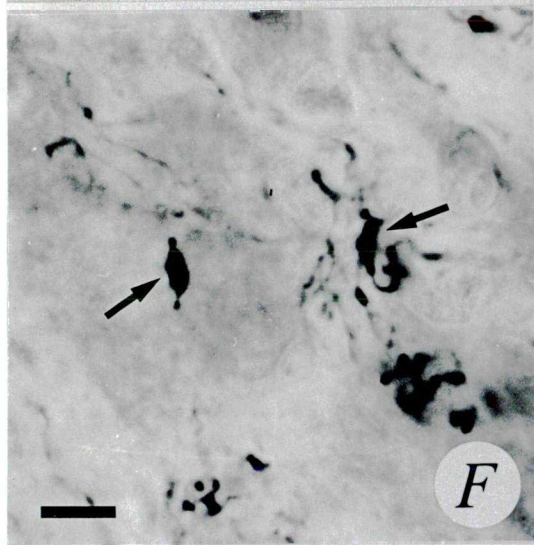
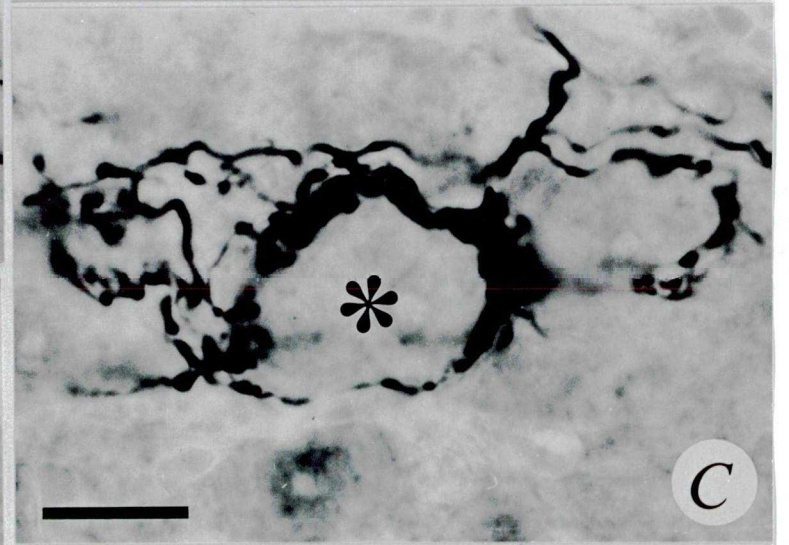
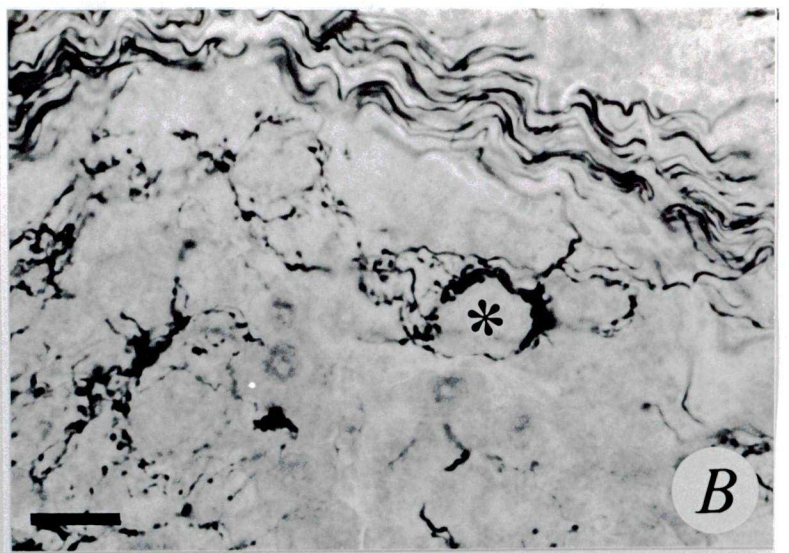
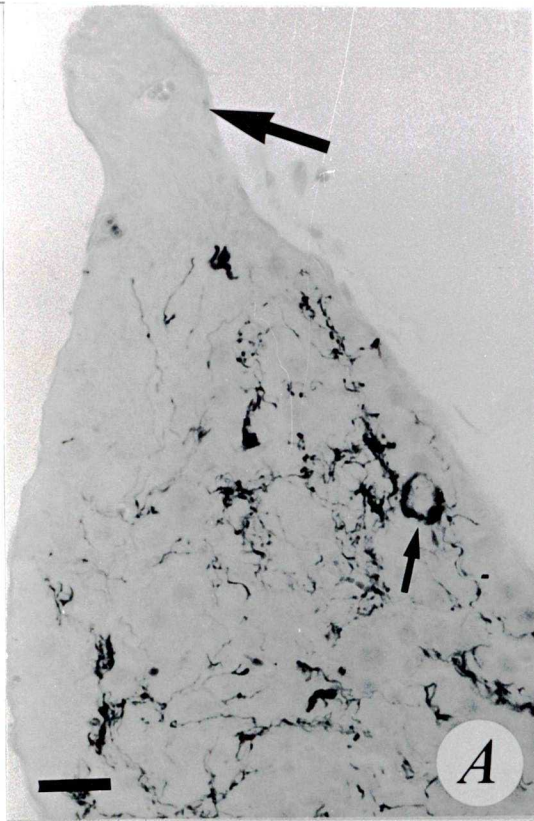
4.2.3. GABA immunreaktivitás elektronmikroszkópos analízise

A GABA-immunreaktív rostok lokalizációját elektronmikroszkóppal is tanulmányoztuk. Anti-GABA antitesttel inkubált metszetekben ozmiofil depozit látható axonokban és varikozitásokban. A pozitív axon profilokat glia elemek határolják, és választják el,

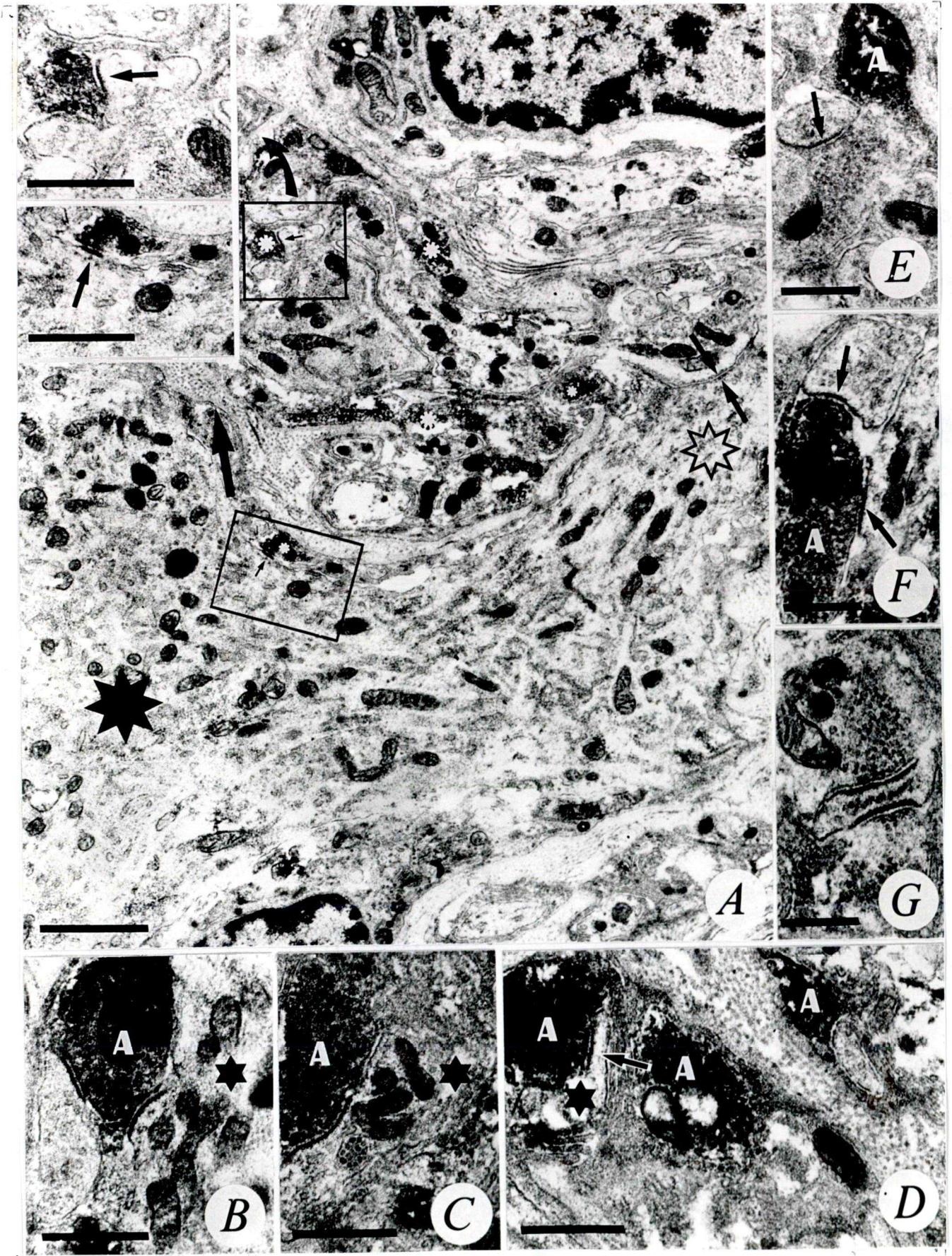
egymástól illetve a GABA-negatív axon profiloktól (8A ábra). Az immunreaktív terminálisok vagy varikozitások nagy számban képeznek aszimmetrikus szinapszist. Szinapszist találtunk szómán (8A ábra) és gyakrabban dendriten (8A-D és 8F ábrák). Az axo-dendritikus szinapszisokat általában szekunder dendrit törzssel kapcsolatban figyeltük meg (8B-C és 8F ábrák), nem ritkán dendrittüskén (8B és 8D ábrák). Sok esetben a GABA-negatív preszinaptikus axonterminálisok közvetlen közelében GABA-pozitív varikozitás lokalizálódhat (8E ábra).

A ChAT-immunreaktivitás ultrastruktúrális vizsgálatánál már említett különös, az egér GCS-re jellemző dendrittüskét két oldalról közrefogó preszinaptikus profil az azonosított 15 esetben nem mutatott GABA immunreaktivitást (8G ábra). A nemfestődött preszinaptikus elemekben kicsiny, agranuláris szinaptikus vezikulák zsúfolódnak (8E és 8G ábrák).

7. ábra. GABA immunreaktivitás fénymikroszkópos lokalizációja egér GCS-ben. (A) GABA-pozitív idegrostok heterogén megoszlása a ganglion medio-rostrális részében. Helyenként, a neuropilben vagy egyes principális ganglionáris neuronok körül (kisebb nyíl) a GABA-immunreaktív rostok véletlenszerű akkumulációja figyelhető meg. A ganglionból kilépő posztganglionáris törzsben (ICN), amelyre a nagyobb nyíl mutat, GABA-pozitív rost nem azonosítható. (B) A ganglion kaudális régiójában belépő GABA-immunjelölt axonköteget és bőségesen elágazódó, gyakori varikozitásokat viselő axonkollaterálisokat találhatunk. A principális neuronok GABA-immunreaktivitást nem mutatnak. A csillaggal jelölt principális neuront a GABA-pozitív axonok sűrűn körbehálézzák. E pericelluláris axonhálót figyelhetjük meg nagyobb nagyítással a (C)-ben. (D) A GABA-pozitív innerváció másik típusa a glomerulus szerkezet (fehér csillag), amelyet GABA-negatív principális neuronok (fekete csillagok) vesznek körül. E viszonylag kevésbé sűrű glomerulus szerkezetben jól megfigyelhető az axonális megvastagodások gyakorisága. (E-F) A ganglionban kevés, kicsiny GABA-pozitív neuron (nyilak) azonosítható. (F) Esetenként az immunjelölt neuronok nyúlványa(i) is felismerhető(k). (G) Az ECM eredési helyéhez közel, néhány vékonyabb véredényt érdekes megjelenésű GABA-immunreaktív gyűrű (fekete nyíl) vesz körül. Az üres nyíl a véredénybe fixálódott vörösvértestekre mutat, amelyek a fixálás után még megmaradó gyenge, nonspecifikus peroxidáz aktivitásuk következtében festődtek. (Kalibrációs vonal = (A): 75 μm , (B): 40 μm , (C-E): 25 μm , (F-G): 20 μm).



8. ábra. GABA immunreaktivitás elektronmikroszkópos lokalizációja egér GCS-ben. (A) GABA-pozitív idegvégződések (fehér csillagok) megoszlását figyelhetjük meg egy glomerulusszerű szerkezetben. Az immunjelölt terminálisok között (bekeretezett metszet részletek) szinaptikus kapcsolatot (kis nyilak) hozott létre. A felső bekeretezett metszet részletben a szinaptikus végtalp szekunder dendritből kinövő nyúlványok veszik körbe (felső képbetét). Az alsó bekeretezett területben lévő szinapszist egy principális neuron szómáján találjuk. Nagyobb nagyítás mellett (alsó betét) észrevehető, hogy a két idegelemet határoló szatellita sejt nyúlványa a szinaptikus részbe nem hatol be. A principális neuron GABA immunreaktivitást nem mutat. A fekete csillag a perikaryont, míg az üres csillag a neuron primér dendritjét jelöli, amely dezmoszómális junkciót képez (két közepes méretű nyíl) egy szekunder dendrittel. (B) GABA-pozitív preszinaptikus idegvégződés ékelődik be egy dendrittüske és egy szekunder dendrit-törzs (csillag) közé. (C) GABA-pozitív terminális aszimmetrikus megjelenésű szinapszist képez a szekunder dendrittel (csillag), amelyben a posztszinaptikus membrán-megvastagodás alatt egy multivezikuláris test ismerhető föl. (D) A három GABA-pozitív terminális közül a nyíllal jelölt szinaptikus kontaktusban van egy "filiform" dendrittövissel, amely szekunder dendritből ered (csillag). (E) Az immunjelölt axonterminális nem szinaptizál a dendrittüskekével, amely viszont szinaptikus kapcsolatban (nyíl) van a GABA-negatív idegvégződéssel. (F) GABA-pozitív terminális egyszerre képez szinapszist (nyilak) egy dendrittüskekével és egy szekunder dendritfával. (G) Két GABA-negatív szinaptikus végtalp egy dendrittüskeit fog közre (ld. még 6I-J ábrákat). (B-F) Az A betűk a GABA-immunreaktív axonterminálisokat jelölik. (Kalibrációs vonal = (A): 3 μm , (képbetétek): 1,7 μm , (B-G): 0,7 μm).



4.3. GAD-pozitív struktúrák lokalizációja

4.3.1. Fénymikroszkópos megfigyelések

GAD ellen termelt antitest alkalmazása pozitív festődést eredményezett az egér GCS-ben. A ganglionhoz tartó CST-ben számos, párhuzamosan elrendeződött immunreaktív rost fut. A rostok nem elágazóak, rajtuk axonális megvastagodás nem figyelhető meg (9A ábra).

A ganglionon belül a jelölődő szöveti elemek elsősorban pontszerűen megjelenő varikozitások, amelyek - kisebb nagyítás mellett - teljesen randomszerűen találhatóak. Nagyobb nagyítással vizsgálva a metszeteket kitűnt, hogy a varikozitások többsége különböző nagyságú és alakú csoportokba tömörül (9B-E ábrák). A varikozitások akkumulációjának jellegzetessége, hogy azok vagy egyes principális neuronok körül rendeződnek (9B-C ábrák), vagy pedig sajátos formációkban csoportosulnak, melyeket a ganglionáris neuronok fognak közre (9D ábra). Ritkán fölismerhető valamely neuron fő dendritje, amint egy pozitív varikozitások által képzett formációba nyúlik be (9E ábra). Mind a GAD-immunpozitív varikozitásokkal határolt principális neuronok, mind pedig a neuronok virtuális szigeteiben lokalizálódó immunpozitív varikozitások heterogéne oszlanak meg. Látszólag a ganglionban vannak azonban olyan neuronok is, amelyek szomszédságában nem található egyetlen immunjelölt varikozitás sem.

A ganglionon belül is sikerült - a festődő

varikozitásokhoz képest - kevés immunpozitív rostot megfigyelnünk, amelyek általában csak gyengén jelölődtek. E rostok elágazóak. A vastagabb rostokon nem látni varikozitást, viszont a vékonyabb rostokon gyakori a bulbózusos kiöblösödés (9B, 9D és 9G ábrák). Érdekes, hogy kisebb számban az immunpozitív varikozitások egy képzeletbeli vonal mentén helyezkednek el úgy, hogy a köztük lévő távolság nem haladja meg egy átlagos varikozitás átmérőjét (9B és 9D ábrák).

A GCS principális neuronjai GAD-immunreaktivitást nem mutatnak. Találtunk viszont kevés, kicsiny, ovális vagy elnyújtott alakú GAD-pozitív neuront, amelyek méretük és alakjuk alapján biztosan elkülöníthetők a posztszinaptikus sejtektől (9F ábra). A pozitív neuronok többnyire egymástól izoláltan lokalizálódtak. Kevés nyúlványuk alig észrevehető immunreaktivitást mutatott.

GAD immuncitokémia alkalmazásával intenzív festődést találtunk néhány kisebb véredény körül, főként a GCS medio-laterális részében, az ECN kiindulási helyéhez közel (9G ábra). E festődés jellege, valamint lokalizációja nagy hasonlóságot mutat a GABA immunhisztokémiai eredményeinknél leírtakkal (ld. 40. old.).

4.3.2. GAD immunreaktivitás elektronmikroszkópos analízise

Az egér GCS GAD immunhisztokémiával jelölődő elemeinek lokalizációját nemcsak fény-, hanem elektronmikroszkópos szinten is megvizsgáltuk. Minthogy az inkubáló oldataink Triton X-100 detergenst tartalmaztak, a szövet ozmiumot kötő kapacitása lényegesen csökkent. Ezért a GAD-antitesttel többnyire kevésbé festődő ganglionáris elemek biztosabban fölismerhetők, illetve elkülöníthetők a szövet egyéb, immunpozitivitást nem mutató elemeitől. Ebből következik, hogy a detergens alkalmazásával viszont le kellett mondanunk az immunreaktív profilok és az egyéb szöveti elemek közötti kapcsolat ultraszerkezetének pontos meghatározásáról.

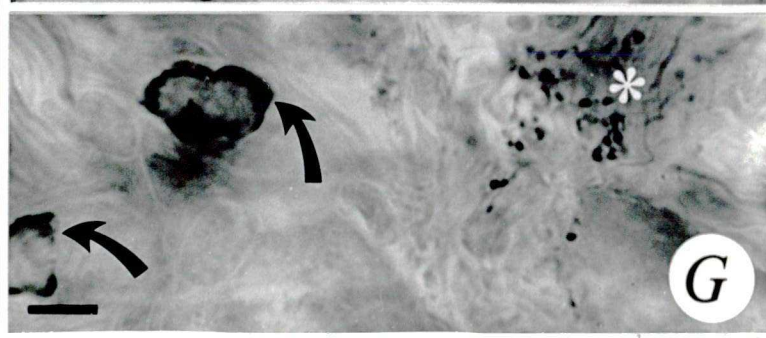
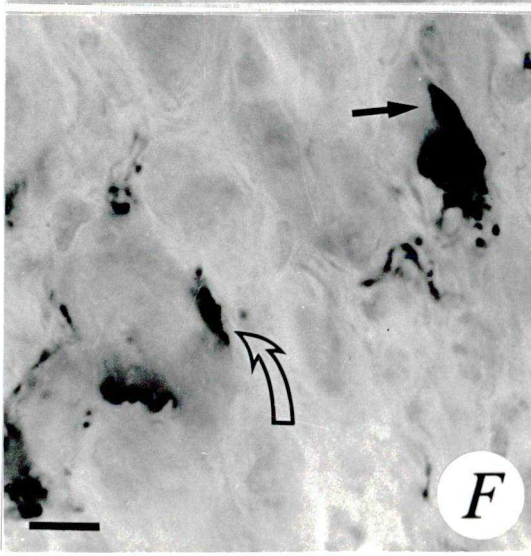
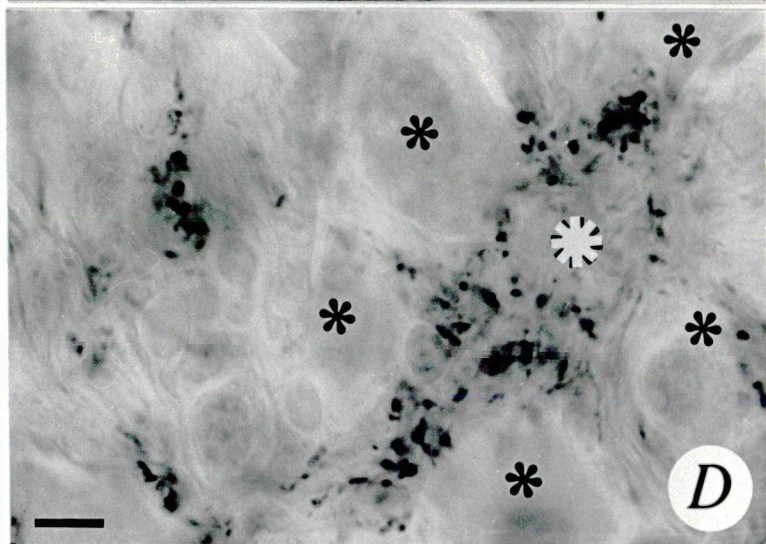
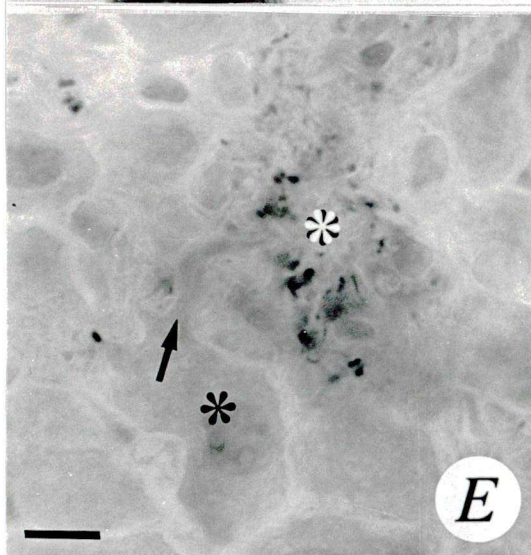
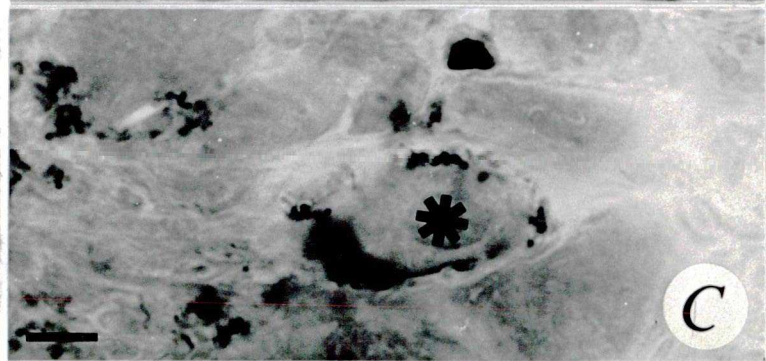
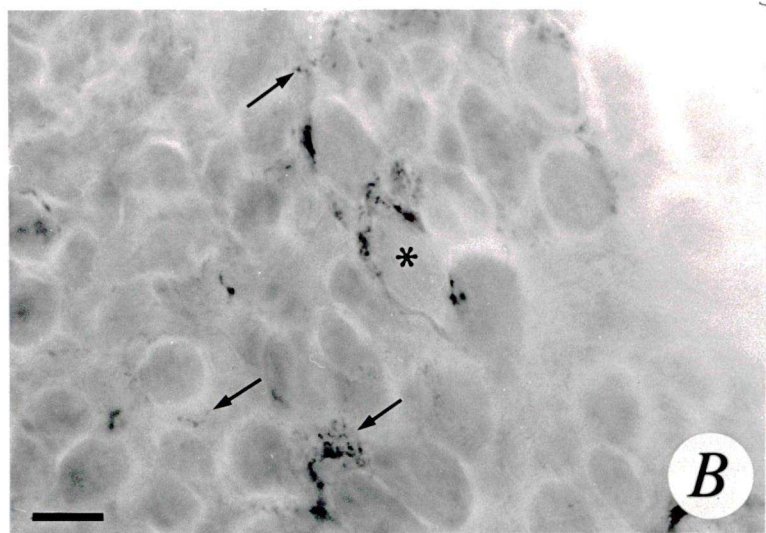
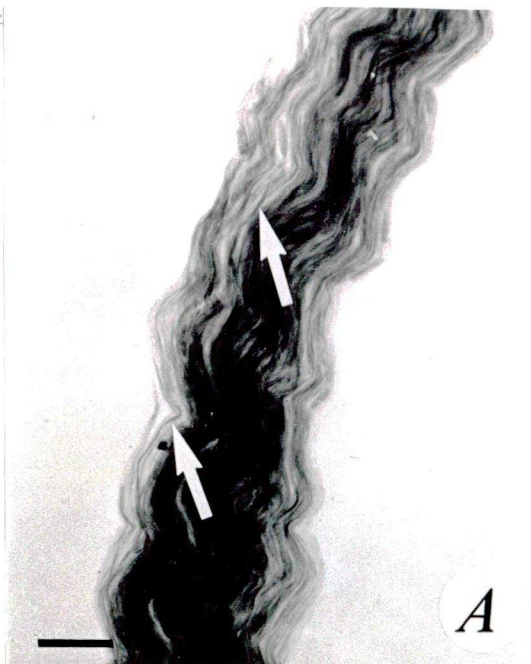
Reakció végterméket találtunk számos idegvégződésben és axon profilban. Az elektronmikroszkópos vizsgálat igazolta fénymikroszkópos megfigyeléseinket; az immunreaktív profilok többsége csoportokat alkot egyes ganglionáris sejtek körül, vagy azok között (10A-3 ábrák). A GAD-pozitív axonokat az ozmicofil DAB polimer egyenletesen tölti ki (10C-D ábrák). A principális neuronok nem mutattak immunreaktivitást (10A ábra).

A GAD-ot tartalmazó idegvégzódések gyakran képeznek szinapszist, melyek lehetnek axo-szomatikusak (11A ábra) vagy axo-dendritikusak (11B ábra). A

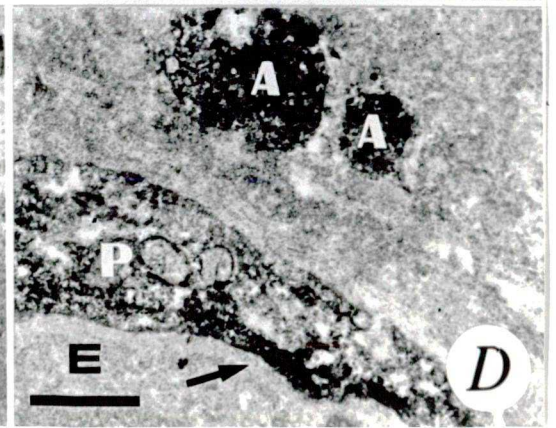
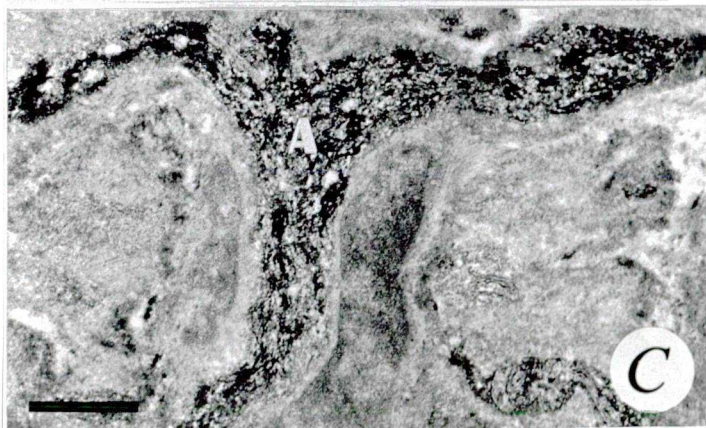
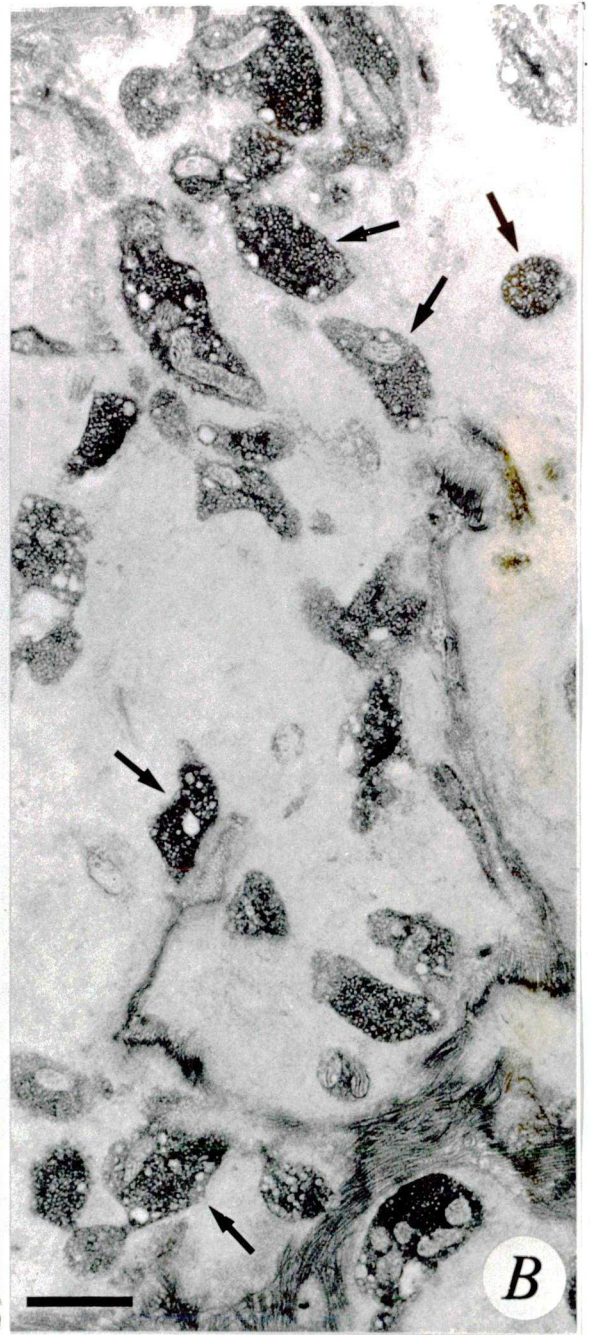
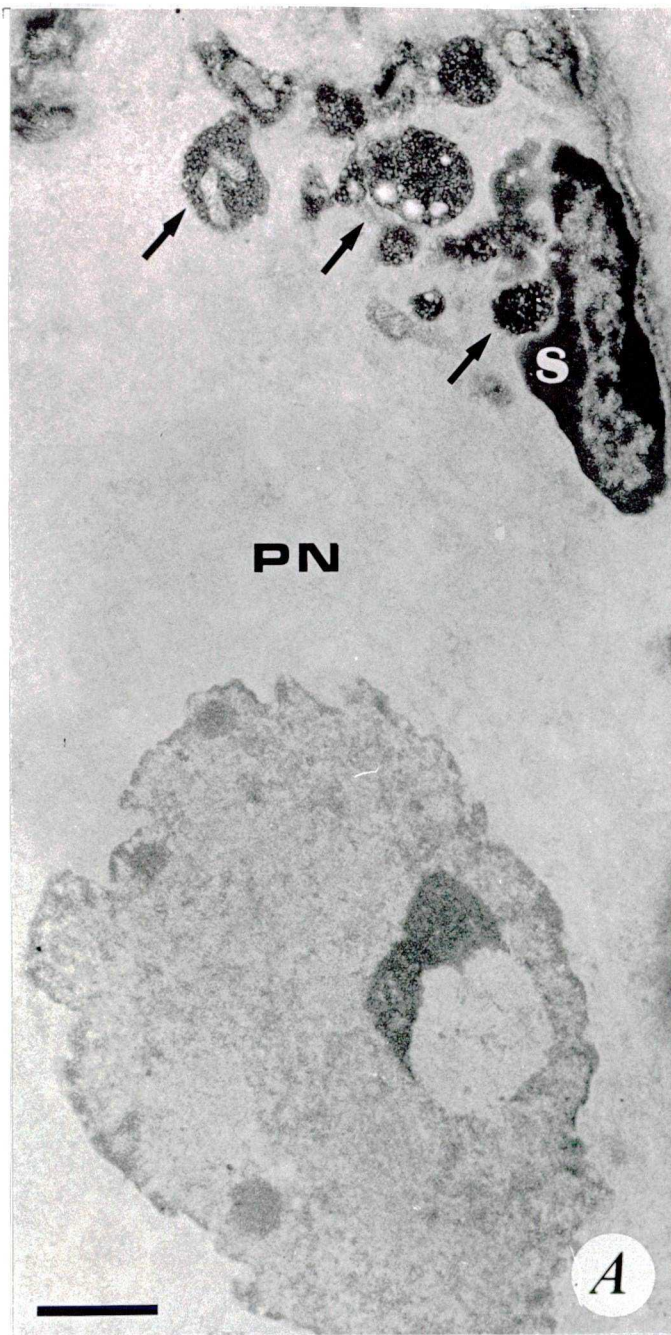
szinapszisokat valamennyi esetben aszimmetrikusnak találtuk.

Az immunjelölt preszinaptikus elemek nagy része dendrit protrúzióval (11C ábra) vagy dendrittüskével (11D-G ábra) létesít szinaptikus kapcsolatot. A pozitív varikozitások általában nagy felületen érintkeznek a dendrit membránnal, és több pontban is kialakulhat szinaptikus \ junkció, amelyre a posztszinaptikus membrán-megvastagodás utal (11F-G ábrák). A varikozitások közötti axon szegmensekben nagy számú vezikula ismerhető föl (11H ábra).

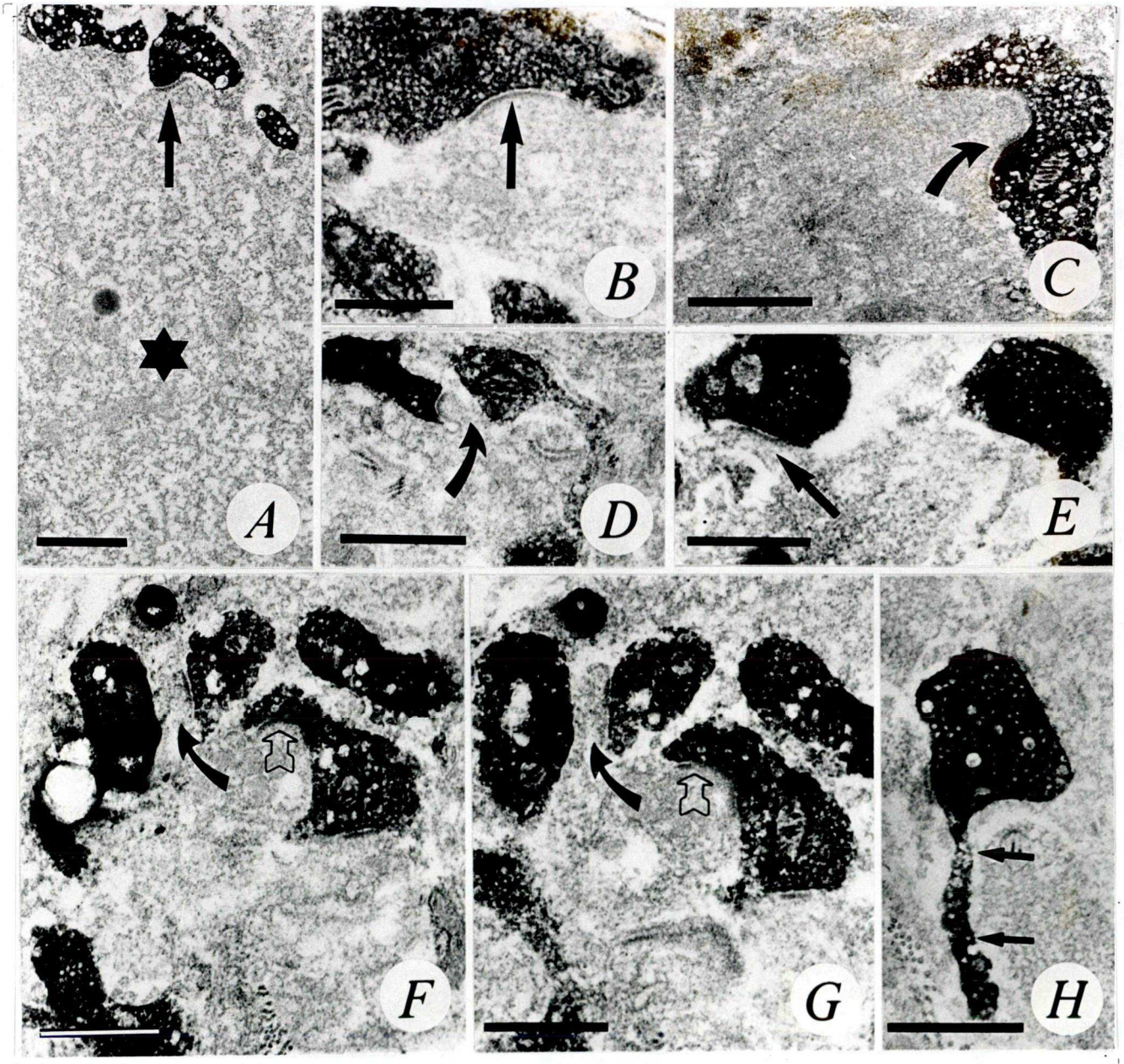
9. ábra. GAD-immunreaktív struktúrák fénymikroszkópos lokalizációja egér GCS-ben. (A) CST-ben nagy számú GAD-pozitív axon fut, amelyek nem elágazóak, rajtuk varikozitásokat nem találunk. A nyilak egy-egy jobban kivehető immunreaktív axont jelölnek. (B-C) A ganglionon belül az immunreaktivitás többnyire pontszerűen jelenik meg, amelyek valójában festődő varikozitások (nyilak). A varikozitások heterogéne oszlanak meg a ganglionban; helyenként, egyes ganglionáris neuronok körül (csillag), vagy közvetlen közelében feldúsulnak. (D) A varikozitások elrendeződésének másik gyakori típusa a glomerulusszerű szerkezet (fehér csillag), amely köré GAD-negatív principális neuronok (fekete csillagok) csoportosulnak. (E) Esetenként jól felismerhető, hogy valamely principális neuron (fekete csillag) primér dendritje benyúlik egy, az immunjelölt varikozitások által képzett glomerulusszerű szerkezetbe (fehér csillag). A nyíl az idegsejt fő dendritjének irányába mutat. (F) A GCS principális neuronjai között, amelyek GAD-negatívak, kevés GAD-pozitív neuron is azonosítható. Bár a GAD-pozitív neuronok többnyire egymástól izoláltan helyezkednek el, ezen a képen demonstrált neuron (fekete nyíl) mellett található egy másik is, amelyik azonban kívül esett a fókuszról. Az immunreaktív varikozitások olykor olyan sűrűn tömörülnek, hogy azok még erősebb nagyítás mellett sem különíthetők el egymástól (üres nyíl). (G) Néhány vékonyabb véredény körül intenzíven jelölődő gyűrű (nyilak) rajzolódik ki. Az ábrán látható még egy kisebb glomerulusszerű szerkezet (fehér csillag), amelyben a boutonok mellett kevés, gyengébben festődő idegrost is észrevehető. (Kalibrációs vonal = (A): 40 μm , (B): 30 μm , (C-G): 15 μm).



10. ábra. GAD immunreaktivitás elektronmikroszkópos lokalizációjá egér GCS-ben. (A) GAD-pozitív idegvégződéseket (nyilak) láthatunk a GAD immunreaktivitást nem mutató principális neuron (PN) közelében, a neuropilben. Az S betű egy szatellita sejtmagot jelöl. (B) A GAD immunreaktivitás jelentékeny hányada a fénymikroszkóposan glomerulusszerű szerkezetben tömörülő axonterminálisokban (nyilak) lokalizálható. A GAD-pozitív varikozitásokban igen nagy számú szinaptikus vezikula figyelhető meg. (C) Bár a GAD-pozitív idegrostok zömében gyengébben jelölődnek, néhányat elektronmikroszkóppal is sikerült azonosítani (A). (D) Az egyes véredények körül tapasztalható gyűrűre emlékeztető struktúrákban a GAD immunreaktivitást pericitákban (P) találtuk meg. Néhány esetben a GAD-pozitív periciták közelségében axon profilok (A) vizualizálhatók. (Kalibrációs vonal = (A-B): 1,7 μm , (C-D): 1 μm).



11. ábra. GAD immunreaktivitás elektronmikroszkópos lokalizációja egér GCS-ben. (A) Immunpozitív preszinaptikus végtalp a GAD-negatív principális perikaryonnal szinaptizál (nyíl). (B) A GAD-pozitív terminális szekunder dendrittorzsszel képez szinaptikus kapcsolatot (nyíl). (C) Nagyméretű GAD-pozitív idegvégződés teljesen körbeveszi a dendrit protrúziót. A két idegelem között kialakult szinaptikus junkcióra nyíl utal. (D-G) A szinapszisok leggyakrabban axo-dendritikusak, és főként dendrittüskékkel kapcsolatosak (nyilak), amelyek alakja nagy változatosságot mutathat. (F-G) Egymást követő metszetpárokon igazolható, hogy a posztszinaptikus membrán-megvastagodások nem véletlenszerűek. Pl. a dendrit protrúzió, és a vele nagy felületen érintkező GAD-pozitív idegelem közötti szinaptikus kontaktus (üres nyíl) mindkét metszeten fölismerhető. (H) Olykor szinaptikus vezikulák azonosíthatók a boutonok közötti axon szegmensekben is (nyilak). (Kalibrációs vonal = (A-H): 1 μ m).



5. MEGBESZÉLÉS

5.1. GCS kolinerg innervációja (struktúrái)

A kolinerg rendszer markerének tekintett enzimnek, a ChAT-nak immunhisztokémiai lokalizációját, valamint a ChAT-tartalmú elemek megoszlását tanulmányoztuk egér GCS-ban, fény- és elektronmikroszkópos szinten. Vizsgálatainkban ChAT ellen termelt jól karakterizált monoklonális antitestet és immunperoxidáz technikát alkalmaztunk.

Immunhisztokémiai eredményeink jó megegyezést mutatnak Lindh és munkatársai (1986) a tengeri malac GCS kolinerg struktúrájával kapcsolatos fénymikroszkópos megfigyeléseivel. Megállapították, hogy tengeri malac GCS-ben (1) nagy számú ChAT-immunreaktív rost mutatható ki, (2) ChAT-tartalmú neuronok nem detektálhatók, (3) az immunpozitív axonok heterogéneen oszlanak meg, (4) a finom immunreaktív rostok gyakran varikózus megjelenésűek, (5) az immunjelölt axonok preganglionáris eredetűek, bár ez utóbbit nem demonstrálták. Viszont Lindhék (a) nem találtak különbséget a ganglion kraniális és kaudális pólusainak ChAT-immunreaktivitásában, (b) ChAT-pozitív axonkötegről nem tettek említést, (c) nem fordítottak figyelmet a ganglionból kilépő posztganglionáris törzsekre, és (d) perikaryonális kolinerg innervációt írtak le.

5.1.1. ChAT-immunopozitív rostok ganglionáris megoszlása

Immunhisztokémiai eredményeink szerint rendkívül nagy számú ChAT-immunopozitív idegrost identifikálható az egér GCS-ben. A ChAT-immunreaktív axonok megoszlása alapján a ganglion két részre osztható. A ganglion kaudo-mediális része "csupán" gazdag kolinerg innervációt mutat, míg a ganglion kraniális harmada "különösen" gazdagon innervált. E jelenség utalhat a ganglion principális neuronjainak azon két populációjára, amelyek az ECN-en, illetve az ICN-en keresztül projektálnak a célszervek felé (ld. Dail and Barton, 1983). Annak ellenére, hogy az eddig vizsgált fajok GCS-ében az egyes célszerveket ellátó neuronok külön-külön nem alkotnak izolált csoportokat (Njå and Purves, 1977), feltételezik, hogy a ganglionáris neuronok két - nem teljesen zárt - neuron "poolban" lokalizálódnak. A kraniális harmad neuronjai az ICN-en keresztül küldik axonjaikat, míg a kaudo-mediális részben lévő sejtek rostjai az ECN-en haladnak át (Bowers and Zigmond, 1979; Matthews and Raisman, 1972). Az CST-ből kirajzó ChAT-pozitív axonok kötegekben folytatják útjukat. Úgy látszik, hogy a rostrális pólus felé tartó axonkötegekből nem, vagy csak kis számban lépnek ki rostok a mediális részen. Ez véleményünk szerint ugyancsak arra utal, hogy az egér GCS-ben is a neuronok bizonyos populációi elkülönülhetnek.

5.1.2. GCS kolinerg innervációja

A principális sejtek perikaryonjainak közvetlen közelében észlelt nagy számú varikózus megvastagodást viselő immunjelölt axonhálók arra utalnak, hogy e neuronokra tevődik át a kolinerg impulzus. A kraniális pólusban vizualizált ChAT-immunreaktív nyúlványok és varikozitások gazdagsága miatt úgy tűnik, hogy a pólus valamennyi ganglionáris neuronját a kolinerg axonok innerválják. Ezzel szemben a kaudo-mediális rész neuron állománya különböző mértékű ACh-közvetített innervációt kap. Néhány principális sejtől álló csoportban csak egy-egy átfutó vastagabb ChAT-tartalmú rostot találtunk. Így elképzelhetőnek tartjuk, hogy ezek nem, vagy csak kisebb mértékben rendelkeznek kolinerg innervációval.

Az AChE hisztokémiai festések nem látszanak igazolni azt, hogy lennének GCS-ben kolinerg innervációval egyáltalán nem rendelkező principális sejtek. A különböző emlősök GCS-én elvégzett AChE hisztokémiai módszerekkel sikerült kimutatni kisebb-nagyobb AChE aktivitást valamennyi ganglionáris neuronban (Holmstedt and Sjöquist, 1959; Koelle, 1955).

Lindh és munkatársai (1986) szerint a tengeri malac GCS-ben a kolinerg idegrostok kosárszerű hálózatot formálnak néhány izolált ganglionáris neuron körül. Ezzel szemben az egér GCS-ben nem az ilyen innervációt tekintjük a jellemzőnek, noha a ganglion kraniális,

pólusa olyan intenzív kolinerg innervációt kap, hogy itt nem zárhatjuk ki e pericelluláris innerváció jelenlétét. A ganglion kaudo-mediális régiójában a ChAT-pozitív axonok csak elvétve képeznek neuronok körüli axonhálót. Gyakran az immunjelölt rostok sűrű arborizációjának következtében glomerulusszerű alakzat keletkezik, amelyben feltűnő a varikozitások nagy száma. A glomerulusszerű szerkezet funkcionális jelentősége - tudomásunk szerint - még nem ismeretes. A tengeri malac GCS-ben már leírt (Lindh et al., 1986), és az egér GCS-ben most talált kolinerg innervációbeli különbség azt sejteti, hogy amennyiben még e két rágcsáló faj ganglionjának kolinerg transzmissziójában is lehet különbség, akkor létezhet különbség más távolabbi rokonsági kapcsolatban lévő fajok között is, amit a neurokémiai és elektrofiziológiai eredmények interpretálásában is számításba kell venni.

Elektronmikroszkópos analízisünk, amely szerint a ChAT-tartalmú axonok kisebb része axo-szomatikus, nagyobb része axo-dendritikus szinapszist képez, illetve a szinapszisok gyakrabban létesülnek dendrittűskén, mint dendrit törzsön, jó összhangban van a különböző emlős GCS preganglionáris szinapszisaival kapcsolatos korábbi ultrastruktúrális eredményekkel (Elfvin, 1963; Pick, 1970, illetve Tamarind and Quilliam, 1971; Matthews and Nelson, 1975).

5.1.3. ChAT-immunreaktív axonok eredete

Számos bizonyíték igazolja, hogy az emlős GCS kolinerg rendszere külső eredetű. Immunhisztokémiai adatok arra utalnak, hogy a gerincvelő intermediolaterális magcsoportjában helyet foglaló preganglionáris neuronok kolinergnek (Houser et al., 1983; Kondo et al., 1985). Különböző mérésekkel igazolták, hogy a macska GCS-hez futó preganglionáris törzs tartalmaz ACh-t (MacIntosh, 1959) és az azt szintetizáló enzimet (Bannister and Scrase, 1950; Hebb and Waites, 1956). Lindh és munkacsoportja (1986) említést tett arról, hogy a tengeri malac GCS preganglionáris törzsében immunfluoreszcens technikával kimutatható a ChAT jelenléte. Mi ezt az egér GCS vonatkozásában demonstráltuk is.

A GCS denervációs kísérletei ugyancsak a külső kolinerg forrásra utalnak. Decentralizált ganglionban néhány nap túlélési idő után az AChE aktivitás 80%-kal csökkent (Koelle et al., 1974), AChE hisztokémia alkalmazásával a ganglion neuropiljében a festődés megszűnt (Koelle, 1955).

Ugyan a kolinerg neuronok jelenléte nem tekinthető jellemzőnek a szimpatikus dúcláncre, bizonyítékokat találtak arra, hogy a paravertebrális ganglionok közül a CSC-ben valamint a lumbális dúcokban vannak kolinerg neuronok (Buckley et al., 1967; Landis and Fredieu, 1966; Lundberg et al., 1979). Azonban sokáig nyitott

kérdésnek tartották, hogy vajon vannak-e kolinerg neuronok a GCS-ben is. Hill és Hendry (1977) feltételezte, hogy patkány GCS-ben a neuronok kevesebb, mint 5%-a kolinerg. Lindh és munkatársai (1986) ChAT immuncitokémiai módszerrel viszont nem találtak pozitív neuront tengeri malac GCS-ben. Mi, szintén ChAT immuncitokémia alkalmazásával, ugyancsak nem tudtunk immunreaktív neuronokat felfedezni az egér GCS-ben. Sőt a GCS preganglionáris axotómiája után sem sikerült találnunk sem ChAT-immunreaktív neuront, sem rostot a ganglionban.

5.1.4. Kolinerg átfutó axonok?

Különös gondot fordítottunk a posztganglionáris törzsek ChAT-tartalmú axonjainak identifikálására. Sacchi és Rossi (1981), elektrofiziológiai eredményeiket interpretálva, valószínűnek vélik, hogy a patkány GCS-be jutó kolinerg axonok nem mindegyike végződik a ganglionban, hanem átfutnak a ganglionon. Véleményük szerint az átfutó kolinerg axonok az ICN-en keresztül hagyják el a gangliont. Immuncitokémiai eredményeink nem látszanak megerősíteni az átfutó rostok létezését, noha nemis cáfolják, hiszen kísérleti állatunk egér volt.

5.1.5. Elektronmiroszkópos vizsgálat

Elektronmikroszkópos eredményeink jó korrelációt mutatnak a korábbi, különböző emlős faj GCS-re vonatkozó intenzív ultrastruktúrális analízisekkel. Emlős GCS-ben a szinapszisok döntő többsége aszimmetrikus (Matthews, 1983). Megállapították azt is, hogy ezek preszinaptikus profiljai preganglionáris eredetűek, hiszen a ganglion decentralizációját követően eltűnnek (Joó et al., 1971; Quilliam and Tamarind, 1972). Az a megfigyelésünk, miszerint a ChAT-pozitív szinapszisok kisebb része axo-szomatikus, nagyobb része axo-denritikus jól támaszkodik mások elektronmikroszkópos eredményeire (Elfvin, 1963; Pick, 1970).

Az intenzíven jelölődő preszinaptikus profilokat kitöltő nagy számú kicsiny, kerek agranuláris vezikula mellett sok esetben nagyobb, granuláris szinaptikus hólyagocskát is találtunk. E nagyobb vezikulák ganglionáris jelenlétére mások is felfigyeltek, és úgy gondolják, hogy valamilyen neuroaktív peptidet (pl. enkefalint) tartalmazhatnak (Matthews, 1983). Lehetségesnek tartják, hogy szerepük a kolinerg impulzusok preszinaptikus gátlásában állhat (Konishi et al., 1980; Araujo and Collier, 1987). A tény, hogy a ChAT-immunreaktív profilban előfordulhat e nagyobb vezikula, a ChAT és az enkefalinnak kolokalizációjára utal. E feltételezést erősíti, hogy Kondo és

munkatársainak (1985) immuncitokémiai módszerrel patkány gerincvelő szimpatikus neuronjaiban enkefalint sikerült azonosítani.

Kíváncsiak voltunk, hogy vajon a kis granuláris sejtek (feltehetőleg SIF sejtek) kapnak-e kolinerg inputot. Matthews szerint patkány GCS-ben a SIF sejtek szómáján fedezhetők föl szinaptizáló preganglionáris eredetű elemek (Matthews, 1971; Matthews and Ostberg, 1973), amelyekről feltételezik, hogy kolinergiek (Karoum et al., 1977; Lutold et al., 1979). Annak ellenére, hogy vizsgálataink során e jellegzetes sejt típust számos esetben fölismertük, rajtuk - legalábbis szómájukon - létesülő szinapszist nem sikerült találnunk.

5.2. GCS GABA-erg struktúrái

1986-ban Bowery még kétségbevonta, hogy a GABA-nak is szerepe lehet a ganglionáris transzmisszióban, annak ellenére, hogy a GABA-erg rendszer elemeinek mindegyikét azonosították már addigra patkány GCS-ben (ld. Erdő and Kiss, 1986). Feltételezte, hogy a GABA glia (szatellita) sejtekben akkumulálódik, valamint, hogy a GABA receptorok valószínűleg funkció nélkül az embrionális fejlődésből maradtak vissza.

Az azóta eltelt néhány évben készült számos közlemény azonban bizonyítani látszik a GABA-erg funkciót a patkány GCS-ben. Bár a ganglion GABA-erg

struktúrájára vonatkozó irodalmi adatok részben eltérnek (Häppölä et al., 1987a; Kása et al., 1988; Kenny and Ariano, 1986), a GABA-erg funkciónak megfelelő morfológiai alap sok vonatkozásban kezd ismerté válni.

5.2.1. GABA-erg idegrostok ganglionáris megoszlása

Az egér GCS GABA-erg szerkezetét GABA - és GAD immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk. Minthogy az immuntechnikák fő kritikus pontja a primér antitestek specifitása, ezért különös gondot fordítottunk az antitestek tesztelésére. Az általunk használt primér antitestek alkalmazásával a központi idegrendszerben (hippokampusz, agykéreg) a jól ismert GABA-erg struktúrák festődtek (pozitív kontroll). Az anti-GABA antitestek esetében az esetleges kereszt-reakciók kizárására megvizsgáltuk, hogy a számításba vehető aminosavakat, aszparaginsavat, béta-alanint, glicint, glutaminsavat illetve taurint fölismerik-e az antitestek. Az antitestek csak és kizárólag a glutáraldehiddel konjugált GABÁ-val reagáltak. Ugyancsak a GABA-antitestek nagy specifitására utal az, hogy a glutáraldehid nélkül, formaldehiddel fixált szövetben immunreaktivitással nem talákoztunk. Mindezeket egybevéve megállapíthatjuk, hogy az antitestek alkalmazásával nyert immunfestődés a GABA-erg rendszer két markerének specifikus fölismerésének

tulajdonítható.

Korábban immuncitokémiai módszerrel demonstráltuk a GABA-immunreaktív strukrúrát patkány GCS-ben (Dobó et al., 1989; Kása et al., 1988; Wolff et al., 1986; Wolff et al., 1989). Jelen immuncitokémiai eredményeink szerint az egér és a patkány GCS GABA-erg rendszerének morfológiája sok szempontból hasonlóságot, de néhány, nem elhanyagolható vonatkozásban különbözőséget mutat. Az egér GCS-ben is sok GABA-immunreaktív idegrost mutatható ki, de számuk feltűnően kisebb, mint a patkány ganglionban. Egér GCS-ben az immunpozitív axonok ugyancsak heterogéneen oszlanak meg, de míg a patkány dúcban a rosztrális pólus jóval intenzívebb GABA-immunreaktivitást mutat, mint a mediális és kaudális részekben (Kása et al., 1988; Wolff et al., 1989), addig az egér GCS-ben a régiók GABA-immunpozitivitásbeli különbsége nem kifejezett. Patkány GCS-ban az egyes ganglionáris neuronokat körbeölelő pericelluláris axon hálózat képezi a jellegzetes GABA-immunreaktív innervációt. Az immunpozitív innervációt tekintve a ganglionáris neuronok igen különbözőek lehetnek; vannak principális sejtek, amelyek körül rendkívül sűrű kosárszerű axonhálózat lokalizálódik, de megfigyelhető olyan neuron is, amelynek közvetlen közolében csupán néhány varikózus immunjelölt axon tekeredik. Számításaink szerint a ganglion neuron populációjából kb. 5% gazdagon innervált, és ezeknek

többsége ugyancsak a rostrális pólusban található (Wolff et al., 1989). Ezzel szemben az egér GCS-ben a pericelluláris GABA-pozitív innerváció mellett a glomerulusszerű innerváció is gyakori, sőt talán inkább ez utóbbit tekinthetjük a jellemzőnek. Egyelőre még nem tudni, vajon van-e funkcionális különbség e két innerváció típus között.

Felvetődik a kérdés, hogy vajon az intenzív GABA-immunreaktív innervációt mutató neuronok megfelelnek-e a ganglion valamelyik neuronális szubpopulációjának. E kérdést korábban a patkány GCS GABA immunfestése kapcsán vizsgáltuk meg, kombinálva az immunhisztokémiát tormaperoxidáz (HRP) jelöléssel (Wolff et al., 1989). HRP-t injektáltunk az elülső szemcsarnokba, amelynek szimpatikus beidegzése az ICN-en keresztül történik (Arvidson, 1979), majd 3 nap túlélési idő után a gangliont előbb HRP-re, majd GABÁ-ra festettük meg. Néhány gazdag GABA-immunpozitív innervációt mutató principális idegsejtben a HRP akkumulációját ismertük föl. Azonban ha az átvágott ECN-re helyeztünk HRP kristályokat, akkor a kombinált HRP-GABA festés után szintén sikerült HRP-re jellemző szemcséket tartalmazó, gazdagon innervált ganglionáris neuront találnunk. Sőt, mindkét kísérletben nem kis számban azonosítottunk HRP-jelölt, de nem gazdagon innervált neuront is. Ezen eredmények arra utalnak, hogy patkány GCS-ben az intenzív GABA innervációt kapó neuronok és a célszervek

között nincs közvetlen kapcsolat, így feltehetőleg az egér ganglionban is hiányozhat e kapcsolat.

Az egér GCS-re vonatkozó GABA immunhisztokémiai megfigyeléseinket jól alátámasztják a GAD-antitest alkalmazásával nyert eredményeink. A GABA- és GAD-antitestek segítségével lényegében nagyon hasonló festődést kaptunk, leszámítva azt a tényt, hogy a GAD-antitest általában kevésbé intenzíven jelölte az axonokat. A GAD-ot tartalmazó varikózus axonok sem egyenletesen oszlanak meg a ganglionban; foltokban nagymértékben feldúsulnak, míg máshol számuk jelentékenyen redukálódott. GAD immunhisztokémia segítségével lényegében sikerült igazolnunk a kétféle GABA-immunreaktív innervációról leírtak hitelességét.

5.2.2. GABA-erg rostok eredete

Az egér GCS-ben bár kis számú GABA-erg neuront sikerült kimutatnunk, nem látszott valószínűnek, hogy e kicsiny idegsejtek lennének felelősek a nagy számú GABA-erg rost ganglionáris jelenlétéért. A CST-ben azonosított immunpozitív idegrostok ugyancsak arra utalnak, hogy e rostok külső eredésűek. E feltevést megerősítette a preganglionáris axotómiát követő GABA immuncitokémia alkalmazása. A decentralizált ganglionban jelentékenyen csökkent a GABA-immunpozitív axonok száma, csupán igen kevés varikozitást viselő rost maradt immunpozitív. Viszont a ganglionáris neuronokat gazdagon innerváló

axonok teljességgel eltűntek.

Ehhez hasonló jelenséggel talákoztunk a patkány GCS vonatkozásában is. A ganglion preganglionáris törzsének átvágása (Kása et al., 1988) vagy elszorítása (Dobó et al., 1989) után az immunjelölt idegrostok száma lényegesen redukálódott. Eugene (1987) elektrofiziológiai eredményei ugyancsak a patkány GCS GABA-erg inputjára hívják fel a figyelmet.

Jelenleg még nem lehet biztosan tudni, hogy vajon honnan származnak a GCS-be a GABA-erg axonok. Elvileg a GCS GABA-erg axonjai eredhetnek a gerincvelő intermediolaterális magvából vagy a szimpatikus dúclánc alsóbb ganglionjaiból. Gyakorlatilag a gerincvelői szimpatikus neuronokban nem sikerült GABA-immunreaktivitást detektálni (Magoul et al., 1987), és azok GAD-antitesttel sem jelölődtek (Barber et al., 1982; Bogan et al., 1986; McLaughlin et al., 1972). Eredésük helye nagy valószínűséggel mégsem a gerincvelő. Azonban a patkány szimpatikus dúclánc valamennyi ganglionában mutattunk ki GABA-pozitív neuronokat, valamint a ganglionokat összekötő törzsekben GABA-immunreaktív rostokat (Wolff et al., 1988). A még kezdeti vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy az egyes szimpatikus törzsekben, kraniális irányban, nő az anti-GABA antitesttel jelölődő idegrostok száma. Tehát jelenlegi felfogásunk szerint a GCS-be futó GABA-erg axonok kiindulási helye

feltehetőleg az alsóbb szimpatikus dúcokban keresendő.

5.2.3. GABA-erg neuronok

Egér GCS-ben mind GABA-, mind GAD-antitest alkalmazásával nemcsak axonokban találtunk immunreaktivitást, hanem néhány kicsiny (10-20 μm) neuronban is. Ebben a vonatkozásban az egér és a patkány GCS nagy hasonlóságot mutat (Dobó et al., 1989; Kása et al., 1988; Wolff et al., 1986). Kenny és Ariano (1986) ugyancsak azonosított kevés kicsiny neuront, amelyek, véleményük szerint, nem SIF sejtek. Ezzel szemben Häppölä és munkatársai (1987a) a nagy ganglionáris neuronokban és a SIF sejtekben vélték a GAD-ot lokalizálni. A mi eredményeink alapján azonban a ganglionáris idegsejtek nem tartalmazznak detektálható GABÁ-t, de ritkán sikerült GABA-immunpozitivitást fölfedeznünk egyes kapillárisok körül rendeződő, minden bizonnyal SIF sejtek némelyikében. Egér GCS immunpozitív sejtjei között viszont nem találtunk olyat, amely bennünket a SIF sejtekre emlékeztettek volna.

Jelenleg még nem tisztázott, hogy milyen funkciója lehet a GABA-erg interneuronoknak a ganglion idegi működésében, és az sem, hogy vajon van-e különbség az idegen és a lokális GABA-erg rostoknak a ganglionáris transzmisszióban betöltött szerepe között? Feltételezhetjük, hogy igen, mivel a ganglion GABA-erg

interneuronjai nem képeznek sem pericelluláris, sem glomerulusszerű axon elágazódást.

5.3. GCS kolinerg - és GABA-erg rendszerének kapcsolata

A harmincas évektől kezdve évtizedekig úgy tekintették az emlős GCS-t, mint egy egyszerű két neuronból álló rendszert, amelyben a kolinerg preganglionáris neuronokról az ingerület áttevődik a noradrenerg ganglionáris neuronokra (Feldberg and Gaddum, 1934). E felfogás először a SIF sejtek ganglionáris jelenlétének felfedezésével módosult (Erankö and Harkönen, 1963). Annak ellenére, hogy a GCS-nek a szimpatikus idegrendszerben betöltött szerepéről, valamint idegi működéséről és szabályozásáról számtalan irodalmi adat gyűlt össze, ma sem ismerjük a ganglionáris neuronok pontos innervációját és a preganglionáris - belépő-axonok transzmitter rendszereit.

Patkány GCS-ben a GABA-nak kétféle (posztzinaptikus (1) és posztzinaptikus (2)) hatását tételezik föl. (1) Elektrofiziológiai vizsgálatok szerint a GABA átmeneti lassú depolarizáció után hiperpolarizálja a ganglionáris neuronokat, ezáltal csökkentve a neuronok ingerelhetőségét (Adams and Brown, 1975). (2) Neurokémiai eredmények arra utalnak, hogy a GABA gátolja az ACh kiváltott fölszabadulását (Farkas et al., 1986).

A GABA-erg axonok nagy számban létesítenek

szinaptikus kontaktust a principális neuronokkal. E megfigyelésünk vélhetően jó morfológiai alapot biztosít a GABA posztzinaptikus gátló hatásának értelmezéséhez. Azonban általánosan elfogadott, hogy a központi idegrendszerben az inhibítorikus jellegű GABA-erg neuronok többnyire interneuronok, és neuronális kapcsolataikra a szimmetrikus típusú szinapszisok jellemzőek. Ezzel szemben az egér GCS-ben is feltehetően inhibítorikus GABA axonok aszimmetrikus szinapszisokat létesítenek a principális idegsejtekkel. E különös jelenség magyarázatára úgy tűnik még várnunk kell.

A GABA preszinaptikus gátló hatása ugyancsak nem tisztázott még. GCS-ben mindeközéig nem sikerült axo-axonális szinaptikus kontaktust találni, amelyek jelenléte megfelelhetne a GABA preszinaptikus gátló hatásának. Ritkán a ChAT-tartalmú preszinaptikus profil közvetlen közelében azonban megfigyeltünk ChAT-negatív terminálist, amelyhez hasonló jelenséget mások is észrevettek más fajok GCS-ében (Matthews, 1983). Matthews úgy véli, hogy az ilyen jellegű kapcsolatban preszinaptikus gátlás történhet. Minthogy a ChAT-pozitív és a ChAT-negatív terminálisok szomszédsága ritka, ezért nem látszik valószínűnek, hogy a kolinerg impulzusok preszinaptikus gátlása ilyen módon valósulna meg.

Immuncitokémiai módszerek alkalmazásával

bizonyították, hogy a patkány szimpatikus (preganglionáris) neuronokban a ChAT és egyes enkefalinok ko-expresszálódnak (Kondo et al., 1985), amelyet az a tény támogat, hogy a preganglionáris szinapszisokban nagy granuláris vezikulákat figyeltek meg. De az is ismeretes, hogy az enkefalinok preszinaptikusan gátolják a kolinerg transzmissziót (Konishi et al., 1980; Araujo and Collier, 1987). Elképzelhető, hogy a kolinerg és a GABA-erg rendszernek hasonló kapcsolata (is) van. E kapcsolat lehetőségét erősíti az, hogy az elektronmikroszkóppal vizsgált glomerulusszerű szerkezetekben, ahol a befutó kolinerg és GABA-erg axonok interakciója megvalósulhat, a szinapszisok csaknem mindegyike ChAT-pozitív, illetve GABA-ergnek bizonyult. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a szinapszisok egy része egyaránt tartozik a kolinerg és a GABA-erg rendszerhez. A jövőben szeretnénk tisztázni e feltételezést ChAT és GAD együttes immunocitokémiai kimutatásával.

E feltételezésnek viszont ellentmondani látszanak a gerincvelőre vonatkozó GABA - és GAD immunhisztokémiai eredmények (Garber et al., 1982; Magoul et al., 1987; McLaughlin et al., 1972), melyek szerint az intermediolaterális oszlop neuronjai nem GABA-ergnek. Ennek ellenére talán mégsem zárható ki, hogy a szimpatikus neuronok egy része GABA-erg, hiszen a központi idegrendszerben számos olyan GABA-erg

magcsoport ismert, amelyek kimutatása körülményes; azonosításukat csak kolhicin kezelés után lehet biztonsággal elvégezni (Mugnaini and Oertel, 1985).

A ChAT és GABA-erg rendszer markereinek (GABA és GAD) immuncitokémiai megoszlása a ganglionban általában nem fedi egymást (ld. 1A és 2A ábrákat), hiszen a GCS-ben a kraniális pólus mutatja a legintenzívebb ChAT-immunreaktivitást, míg e pólusban a GABA-erg markerck immuncitokémiai gyakorisága nem egyértelműen nagyobb, mint a ganglion mediális-kaudális régiójában. Bár az excitatórikus ACh és az inhibítórikus jellegű GABA rendszerek egyaránt aszimmetrikus szinapszisokat képeznek az egér GCS-ben, a principális neuronok kolinerg és GABA-erg axonok általi innervációjában is találtunk némi különbséget. A ChAT-tartalmú axonokról feltételezzük, hogy jellemzően glomerulusszerű formációban kerülnek kapcsolatba a ganglionáris neuronokkal, ellenben a GABA-erg axonok nem csak glomerulus szerkezetet hoznak létre, hanem pericelluláris hálózatot is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A szimpatikus dúclánc talán leggyakrabban kutatott ganglionjában, a ganglion cervicale superiusban (GCS) tanulmányoztuk a kolinerg - és GABA-erg innervációt. Vizsgálatainkban az egér ganglionját használtuk, és a transzmitter rendszereket immunperoxidáz módszerrel mutattuk ki. A kolinerg elemeket jól karakterizált anti-kolinacetiltranszferáz (ChAT) antitesttel, a GABA-erg elemeket pedig anti-GABA valamint anti-glutaminsav dekarboxiláz (GAD) antitestek alkalmazásával identifikáltuk. Immuncitokémiai eredményeinket összefoglalva az alábbiakat állapíthatjuk meg:

A., Kolinerg rendszer: Az egér GCS-ben nagy számú ChAT-immunpozitív (kolinerg) axon mutatható ki. A kolinerg axonok nem egyenletesen oszlanak meg a ganglionban. A legintenzívebb immunreaktivitás a rostrális pólusban található, míg a ganglion mediális és disztális részeiben csak jóval kisebb immunreaktivitás figyelhető meg.

A decentralizált ganglionban ChAT immunpozitivitás nem észlelhető. E jelenség arra utal, hogy (1) a kolinerg axonok preganglionáris eredetűek, illetve (2) a ganglionban nincs azonosítható kolinerg interneuron.

A nyaki szimpatikus törzsben rendkívül sok ChAT-pozitív rost fut párhuzamosan. E rostok a törzsön belül nem elágazóak, varikózus megvastagodás nem láthatók rajtuk. A törzsből kilépő pozitív axonok sokszoros

elágazásával helyenként, foltszerűen igen sűrű axonhálók jönnek létre, sajátos glomerulusszerű formációt képezve, amelyeket principális neuronok perikaryonjai vesznek körül. A vékony axonokon gyakoriak a varikozitások.

A ganglion posztganglionáris törzseiben (ECN és ICN) kolinerg rostok nem detektálhatók.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a ChAT-pozitív axonok principális neuronokkal szinaptizálnak. Az immunpozitív szinapszisok az aszimmetrikus szinapszis típusjegyeit mutatja. A szinapszisok többsége axo-dendritikus, kisebb részük axo-szomatikus.

B., GABA-erg rendszer: A nyaki szimpatikus törzsben számos GABA-erg axon fut, amelyek a ganglionba lépve sokszorososan elágaznak. Az immunpozitív axonok heterogén megoszlást mutatnak. A festődött rostok egyes principális neuronok körül kosárszerű axon fonadékot képeznek, vagy esetenként glomerulusszerű axonhálót alkotnak, amely látszólag a glomerulusukat körbe vevő ganglionáris sejtek innervációját biztosítják. A vékony immunpozitív axonokon varikozitások figyelhetők meg. A gazdag GABA-erg innervációt mutató egyes neuronok, vagy a neuronok csoportja ugyancsak heterogéne oszlanak meg a GCS-en belül.

A principális neuronok sem GABA -, sem GAD antitesttel nem jelölődtek, tehát feltehetőleg nem

GABA-ergek. Azonban kevés, kis méretű neuron mindkét antitesttel jelölődött.

A GCS posztganglionáris törzseiben GABA-erg rost nem mutatható ki.

Elektronmikroszkóppal vizsgálva az intenzíven jelölődő varikozitások jelentős része a principális neuronnal szinapszist képez. A GABA-erg szinapszisok aszimmetrikus jellegűek, melyek zömében axo-dendritikusak, de lehetnek axo-szomatikusak is.

C., Kolinerg - és GABA-erg rendszer kolokalizációja: Immunhisztokémiai eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a kolinerg axonok egy része egyben a GABA-erg rendszert is tartalmazza, és így az excitatórikus acetilkolin és az inhibítórikus jellegű GABA koexpresszálódhat ugyanazon idegvégződésben.

7. IDÉZETT IRODALOM

- Adams, P. R. and Brown, D. A. (1975): Actions of γ -aminobutyric acid on sympathetic ganglion. *J. Physiol. (London)* **250**, 85-120
- Araujo, D. M. and Collier, B. (1987): Effect of endogenous opioid peptides on acetylcholine release from the cat superior cervical ganglion: selective effect of a heptapeptide. *J. Neurosci.* **7**, 1698-1704
- Arvidson, B. (1979): Retrograde transport of horseradish peroxidase in sensory and adrenergic neurons following injection into the anterior eye chamber. *J. Neurocytol.* **8**, 751-764
- Balcar, V. J., Joó, F., Kása, P., Dammasch, I. E. and Wolff, J. R. (1986): GABA receptor binding in rat cerebral cortex and superior cervical ganglion in the absence of GABAergic synapses. *Neurosci. Lett.* **66**, 269-274
- Bannister, J. and Scrase, M. (1950): Acetylcholine synthesis in normal and denervated sympathetic ganglia of the cat. *J. Physiol. (London)* **3**, 437-444
- Bertilsson, L., Suria, A. and Costa, E. (1978): γ -Aminobutyric acid in rat superior cervical ganglion. *Nature (London)* **260**, 540-541
- Birks, R. I. and MacIntosh, F. C. (1961): Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 787-827
- Björklund, A. (1983): Fluorescence histochemistry of biogenic monoamines. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 1: *Methods in Chemical Neuroanatomy* (eds.: Björklund, A. és Hökfelt, T.) Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford pp 50-121
- Björklund, A., Cegrell, L., Falck, B., Ritzén, M. and Rosenger, E. (1970): Dopamine-containing cells in sympathetic ganglia. *Acta Physiol. Scand.* **78**, 334-338
- Björklund, A., Ehinger, B. and Falck, B. (1968): A method for differentiating dopamine from

- noradrenaline in tissue sections by microspectrofluorometry. *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 263-270
- Bowers, C. W. and Zigmond, R. E. (1979): Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion that project into different postganglionic trunks. *J. Comp. Neurol.* **185**, 381-391
- Bowers, C. W. and Zigmond, R. E. (1981): Sympathetic neurons in lower cervical ganglia send axons through the superior cervical ganglion. *Neuroscience* **6**, 1783-1791
- Bowery, N. G. (1986): Introduction. In: GABAergic mechanism in the mammalian periphery. (eds.: Erdő, S. L. and Bowery, N. G.) Raven Press, New York, pp 1-3
- Bowery, N. G., Collins, J. F., Hudson, A. L. and Neal, M. J. (1978): Isoguvacine, isonipepicotic acid, muscimol and N-methyl isoguvacine on the GABA receptor in rat sympathetic ganglia. *Experientia* **34**, 1193-1195
- Brown, D. A. and Codstantini, A. (1978): Interaction of pentobarbitone and γ -aminobutyric acid on mammalian sympathetic ganglion cells. *Br. J. Pharmacol.* **63**, 217-224
- Buckley, G., Consolo, S. and Sjöqvist, F. (1967): Cholinacetylase in innervated and denervated sympathetic ganglia and ganglion cells of the cat. *Acta Physiol. Scand.* **71**, 348-356
- Bullock, G. R. and Petrusz, P. (eds.) (1982): Techniques in immunocytochemistry, vol. 1., Academic Press, San Diego
- Bullock, G. R. and Petrusz, P. (eds.) (1983): Techniques in immunocytochemistry, vol. 2., Academic Press, San Diego
- Bullock, G. R. and Petrusz, P. (eds.) (1985): Techniques in immunocytochemistry, vol. 3., Academic Press, San Diego

- Burt, D. R. (1978): Muscarinic receptor binding in rat sympathetic ganglia is unaffected by denervation. *Brain Res.* 143, 573-579
- Cajal, S. Ramon y (1911): *Histologie du Systeme Nerveux de l Homme et des Vertébrés*, vol. 2., Maloine, Paris
- Carvalho, A. F. and Pearse, A. G. E. (1967): Comparative cytochemistry of C cell esterases in the mammalian thyroid-parathyroid complex. *Histochemie* 8, 175-182
- Chiba, T. and Williams, T. H. (1975): Histofluorescence characteristics and quantification of small intensely fluorescent (SIF) cells in sympathetic ganglia of several species. *Cell Tissue Res.* 162, 331-341
- Chiba, T., Black, A. C., Jr. and Williams, T. H. (1977): Evidence for dopamine-storing interneurons and paraneurons in rhesus monkey sympathetic ganglia. *J. Neurocytol.* 6, 441-453
- Christenson, J. G., Dairman, W. and Udenfriend, S. (1970): Preparation and properties of a homogenous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 356-367
- Cuello, A. C. (ed.) (1983): *Immunohistochemistry*. John Wiley and Sons, New York
- Dahlström, A. and Haggendal, J. (1966): Some quantitative studies on the noradrenaline content of the cell bodies and terminals of a sympathetic adrenergic neuron system. *Acta Physiol. Scand.* 67, 271-277
- Dail, W. G. and Barton, S. (1983): Structure and organization of mammalian sympathetic ganglia. In: *Autonomic ganglia* (ed.: Elfvin, L.-G.) John Wiley and Sons, New York, pp 3-25
- Dail, W. G., Khoudary, S., Barraza, C. and Murray, H. M. (1980): The fate of adrenergic fibers which enter the superior cervical ganglion. In: *Advances in biochemical psychopharmacology*, vol. 25:

- Histochemistry and cell biology of autonomic neurons, SIF cells paraneurons (eds.: Erankö, S., Soimila, S. and Päivärinta, H.), Raven Press, New York, pp 287-297
- Dale, H. H. and Dudley, H. W. (1929): The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J. Physiol. (London)* **108**, 97-123
- De Castro, F. (1932): Sympathetic ganglia: normal and pathological. In: *Cytology and cellular pathology of the nervous system*, vol. 1. (ed.: Penfield, W.) Hoeber, New York, pp 319-379
- DeGroat, W. C. (1970): The actions of γ -aminobutyric acid on mammalian autonomic ganglia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **172**, 384-386
- Delorenzi, E. (1931): Modificazioni dei neuroni simpatici dei Mammiferi domestici in relazione all'accrescimento somatico e alla senescenze. *Archo. Ital. Anat. Embriol.* **28**, 528-552
- Dobó, E., Kása, P., Wenthold, R. J., Joó, F. and Wolff, J. R. (1989): Evidence for GABAergic fibers entering the superior cervical ganglion of rat from the preganglionic nerve trunk. *Histochem.* **92**, 133-136
- Dobó, E., Kása, P., Wenthold, R. J. and Wolff, J. R.: Pronase treatment increases the staining intensity of GABA-immunoreactive structures in the paravertebral sympathetic ganglia. *Histochem. megjelenés alatt*
- Dun, N. J. (1983): Peptide hormones and transmission in sympathetic ganglia. In: *Autonomic ganglia* (ed.: Elfvin, L.-G.) John Wiley and Sons, New York, pp 345-366
- Dun, N. J. and Karczmar, A. G. (1981): Multiple mechanisms in ganglionic transmission. In: *Cholinergic mechanisms: Phylogenetic aspects, central and peripheral synapses, and clinical significance* (eds.: Pepeu, G. and Ladinsky, H.) Plenum Press, New York, pp 109-118

- Ebbeson, S. O. S. (1968a): Quantitative studies of superior cervical sympathetic ganglia in a variety of primates including man. I. The ratio of preganglionic fibres to ganglionic neurons. *J. Morph.* 124, 117-132
- Ebbeson, S. O. S. (1968b): Quantitative studies of superior cervical sympathetic ganglia in a variety of primates including man. II. Neuronal packing density. *J. Morph.* 124, 181-186
- Elfvin, L.-G. (1963): The ultrastructure of the superior cervical sympathetic ganglion of the cat. II. The structure of the preganglionic end fibers and the synapses as studied by serial sections. *J. Ultrastruct. Res.* 8, 441-476
- Eränkő, L. (1972): Biochemical and histochemical observation on the postnatal development on cholinesterases in the sympathetic ganglion of the rat. *Histochem. J.* 4, 545-559
- Eränkő, O. and Harkönen, M. (1963): Histochemical demonstration of fluorogenic amines in the cytoplasm of sympathetic ganglion cells of the rat. *Acta Physiol. Scand.* 58, 285-286
- Eränkő, O. and Harkönen, M. (1965): Monoamine-containing small cells in the superior cervical ganglion of the rat and on an organ composed of them. *Acta Physiol. Scand.* 63, 511-512
- Eränkő, O. and Soinila, S. (1981): Effect of early postnatal division of the postganglionic nerves on the development of principal ganglion cells and small intensely fluorescent cells in the rat superior cervical ganglion. *J. Neurocytol.* 10, 1-18
- Erdő, S. L. and Kiss, B. (1986): Presence of GABA, glutamate decarboxylase and GABA transaminase in peripheral tissues: A collection of quantitative data. In: *GABAergic mechanism in the mammalian periphery.* (eds.: Erdő, S. L. and Bowery, N. G.), Raven Press, New York, pp 5-17

- Eugene, D. (1987): Fast non-cholinergic depolarizing postsynaptic potentials in neurons of rat superior cervical ganglia. *Neurosci. Lett.* **78**, 51-56
- Euler, U. S. von (1946): A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and noradrenaline. *Acta Physiol. Scand.* **12**, 73-97
- Farkas, Z., Kása, P., Balcar, V. J., Joó, F. and Wolff, J. R. (1986): Type A and B GABA receptors mediate inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerve terminals in the superior cervical ganglion of the rat. *Neurosci. Lett.* **8**, 565-572
- Feldberg, W. (1943): Synthesis of acetylcholine in sympathetic ganglia and cholinergic nerves. *J. Physiol. (London)* **101**, 432-445
- Feldberg, W. and Gaddum, J. H. (1934): The chemical transmitter at synapses in sympathetic ganglion. *J. Physiol. (London)* **81**, 305-319
- Gabella, G. (1976): The sympathetic ganglia. In: *Structure of the autonomic nervous system*. John Wiley and Sons, New York, pp 3-47
- Geffard, M., McRae-Degueurce, A. and Souan, M. L. (1985a): Immunocytochemical detection of acetylcholine in the rat central nervous system. *Science* **229**, 77-79
- Geffard, M., Vieillemaringe, J., Heinrich-Rock, A.-M. and Duris, P. (1985b): Anti-acetylcholine antibodies and first immunocytochemical application in insect brain. *Neurosci. Lett.* **57**, 1-6
- Gisiger, V., Vigny, M., Gautron, J. and Rieger, F. (1978): Acetylcholinesterase of rat sympathetic ganglion: molecular forms, localization and effects of denervation. *J. Neurochem.* **30**, 501-516
- Hanley, M. R., Benton, H. P., Lightman, S. L., Todd, K., Bone, E. A., Fretten, P., Palmer, S., Kirk, C. J. and Michell, R. H. (1984): A vasopressin-like peptide

- in the mammalian sympathetic nervous system. *Nature* (London) **309**, 258-261
- Häppölä, O., Päivärinta, H., Soinila, S., Wu J.-Y. and Panula, P. (1987a): Localization of L-glutamate decarboxylase and GABA transaminase immunoreactivity in the sympathetic ganglia of the rat. *Neuroscience* **21**, 271-281
- Häppölä, O., Soinila, S., Päivärinta, H. and Panula, P. (1987b): (Met⁵)enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-immunoreactive nerve fibers and neurons in the superior cervical ganglion of the rat. *Neuroscience* **21**, 283-295
- Häppölä, O., Soinila, S., Päivärinta, H., Panula, P. and Erankö, O. (1985): Histamine-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion and in the coeliac-superior mesenteric ganglion complex of the rat. *Histochem.* **82**, 1-3
- Hebb, C. O. and Waites, G. M. B. (1956): Choline acetylase in antero- and retro-grade degeneration of cholinergic nerve. *J. Physiol.* (London) **132**, 667-671
- Hill, C. E. and Hendry, I. E. (1977): Development of neurons synthesizing noradrenaline and acetylcholine in the superior cervical ganglion of the rat in vivo and in vitro. *Neuroscience* **2**, 741-749
- Holmstedt, B. and Sjöqvist, F. (1959): Distribution of acetylcholinesterase in the ganglion cells of various sympathetic ganglia. *Acta Physiol. Scand.* **47**, 284-296
- Holzbauer, M. and Sharman, D. F. (1972): The distribution of catecholamines in vertebrates. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 33. (eds.: Blaschko, H. and Muscholl, E.) Springer Verlag, Berlin pp 110-185
- Houser, C. R., Crawford, G. D., Barber, R. P., Salvaterra, P. M. and Vaughn, J. N. (1983): Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with

- a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* **266**, 97-119
- Hökfelt, T., Elfvin, L.-G., Elde, R., Schultzberg, M., Goldstein, M. and Luft, R. (1977a): Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3587-3591
- Hökfelt, T., Elfvin, L.-G., Schultzberg, M., Fuxe, K., Said, S. I., Mutt, V. and Goldstein, M. (1977b): Immunohistochemical evidence of vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons and nerve fibers in sympathetic ganglia. *Neuroscience* **2**, 885-896
- Hökfelt, T., Elfvin, L.-G., Schultzberg, M., Goldstein, M. and Nilsson, G. (1977c): On the occurrence of substance P containing fibers in sympathetic ganglia: Immunohistochemical evidence. *Brain Res.* **132**, 29-41
- Jan, Y. N., Jan, L. Y. and Kuffler, S. W. (1980): Further evidence for peptidergic transmission in sympathetic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5008-5012
- Joó, F., Lever, J. D., Ivens, C., Mottram, D. R. and Presley, R. (1971): A fine structural and electron histochemical study of axon terminals in the rat superior cervical ganglion after acute and chronic preganglionic denervation. *J. Anat.* **110**, 181-189
- Karoum, F., Garrison, C. K., Neff, N. H. and Wyatt, R. J. (1977): Transsynaptic modulation of dopamine metabolism in the rat superior cervical ganglion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **201**, 654-661
- Kása, P. (1986): The cholinergic systems in brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology* **26**, 211-272
- Kása, P. and Csernovszky, E. (1967): Electron microscopic localization of acetylcholinesterase in the superior cervical ganglion of the rat. *Acta Histochem.* **28**, 274-285
- Kása P., Dames, W., Rakonczay, Z., Gulya, K., Joó, F.,

- and Wolff, J. R. (1985): Modulation of the acetylcholine system in the superior cervical ganglion of rat: Effect of GABA and hypoglossal nerve implantation after in vivo GABA treatment. *J. Neurochem.* **44**, 1363-1372
- Kása, P., Joó, F., Dobó, E., Wenthold, R. J., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. and Wolff, J. R. (1988): Heterogeneous distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and axon terminals in the superior cervical ganglion of adult rat. *Neuroscience* **26**, 635-644
- Kenny, S. L. and Ariano, M. A. (1986): The immunofluorescence localization of glutamate decarboxylase in the rat superior cervical ganglion. *J. Auton. Nerv. Syst.* **17**, 211-215
- Kharkevich, D. A. (ed.) (1980): Handbook of experimental pharmacology, vol. 53: Pharmacology of ganglionic transmission. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- Kimura, T., Imamura, H. and Hashimoto, K. (1977): Facilitatory and inhibitory effects of γ -aminobutyric acid on ganglionic transmission in the sympathetic cardiac nerves of the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **202**, 397-403
- Klingman, G. J. and Klingman, J. D. (1969): Cholinesterases of rat sympathetic ganglion after immunosympathectomy, decentralization and axotomy. *J. Neurochem.* **16**, 261-268
- Koelle, G. B. (1955): The histochemical identification of acetylcholinesterase in cholinergic, adrenergic and sensory neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **114**, 164-184
- Kondo, H., Kuramoto, H., Wainer, B. H. and Yanaihara, N. (1985): Evidence for the coexistence of acetylcholine and enkephalin in the sympathetic preganglionic neurons of rats. *Brain Res.* **335**, 309-

314

- Kondo, H., Yamamoto, M., Yanaihara, N. and Nagatsu, I. (1988): Transient involvement of enkephalins in both the sympathetic and parasympathetic innervations of the submandibular gland of rats. Light- and electron-microscopic immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* **253**, 529-537
- Konishi, S., Tsunoo, A. and Otsuka, M. (1979): Enkephalins presynaptically inhibit cholinergic transmission in sympathetic ganglia. *Nature (London)* **282**, 515-516
- Konishi, S., Tsunoo, A., Yanaihara, N. and Otsuka, M. (1980): Peptidergic excitatory and inhibitory synapses in mammalian sympathetic ganglia: roles of substance P and enkephalin. *Biomed. Res.* **1**, 528-536
- Koslow, S. H., Cattabeni, F. and Costa, E. (1972): Norepinephrine and dopamine: assay by mass fragmentography in the picomole range. *Science* **176**, 177-180
- König, R. and Heym, C. (1978): Immunofluorescent localization of dopamine- β -hydroxylase in small intensely fluorescent cells of the rat superior cervical ganglion. *Neurosci. Lett.* **10**, 187-191
- Krenács, T., Dobó, E., Iványi, B. és Lászik, Z. (1988): Immunarany konjugátum készítése és felhasználási lehetőségei a fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiában. *Morphológiai és Igazságügyi Orvosi Szemle* **28**, 29-38
- Kummer, W. (1987): Galanin- and neuropeptide Y-like immunoreactivities coexist in paravertebral sympathetic neurons of the cat. *Neurosci. Lett.* **78**, 127-131
- Landis, S. C. and Fredieu, J. R. (1986): Coexistence of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in cholinergic sympathetic innervation of rat sweat glands. *Brain Res.* **377**, 177-



181

- Larsson, L.-I. and Rehfeld, J. F. (1979): Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res.* **165**, 201-218
- Lee, Y., Takami, K., Kawai, Y., Girgis, S., Hillyard, C. J., MacIntyre, I., Emson, P. C. and Tokyama, M. (1985): Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with special reference to its coexistence with substance P. *Neuroscience* **15**, 1227-1237
- Levey, A. I., Armstrong, D. M., Atweh, S. F., Terry, R. D. and Wainer, B. H. (1983): Monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: production, specificity, and immunohistochemistry. *J. Neurosci.* **3**, 1-9
- Levi-Montalcini, R. and Booker, B. (1960): Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 384-391
- Libet, B. and Ownman, C. (1974): Concomitant changes in formaldehyde-induced fluorescence of dopamine interneurons and in slow inhibitory post-synaptic potentials of the rabbit superior cervical ganglion, induced by stimulation of the preganglionic nerve or by a muscarinic agent. *J. Physiol. (London)* **237**, 635-662
- Lindh, B., Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Elfvin, L.-G., Fahrenkrug, J. and Fischer, J. (1987): Coexistence of CGRP- and VIP-like immunoreactivities in a population of neurons in the cat stellate ganglia. *Acta Physiol. Scand.* **131**, 475-476
- Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Anggard, A., Kimmel, J., Goldstein, M. and Markey, K. (1980): Coexistence of an avian pancreatic polypeptide (APP)-immunoreactive substance and catecholamine in some peripheral and central neurons. *Acta Physiol. Scand.* **110**, 107-109

- Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Anggard, A., Terenius, L., Elde, R., Markey, K. and Goldstein, M. (1982): Organization principles in the peripheral sympathetic nervous system: Subdivision by coexisting peptides (somatostatin, avian pancreatic polypeptide-, and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivities). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1303-1307
- Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Schultzberg, M., Uvnas-Wallensten, K., Köhler, C. and Said, S. I. (1979): Occurrence of VIP-like immunoreactivity in cholinergic neurons of the cat: evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* **4**, 1539-1559
- Lundberg, J. M., Terenius, L., Hökfelt, T. and Goldstein, M. (1983): High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci. Lett.* **42**, 167-172
- Lundberg, J. M., Terenius, L., Hökfelt, T. and Tatemoto, K. (1984): Comparative immunohistochemical and biochemical analysis of pancreatic polypeptide-like peptides with special reference to presence of neuropeptide Y in central and peripheral neurons. *J. Neurosci.* **4**, 2376-2386
- Lutold, B. E., Karoum, F. and Neff, N. H. (1979): Activation of rat sympathetic ganglia SIF cell dopamine metabolism by muscarinic agonists. *Eur. J. Pharmacol.* **54**, 21-26
- MacIntosh, F. C. (1959): Formation, storage, and release of acetylcholine at nerve endings. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 343-356
- MacIntosh, F. C. (1963): Synthesis and storage of acetylcholine in nervous tissue. *Can. J. Biochem. Physiol.* **41**, 2553-2571
- Magoul, R., Onteniente, B., Geffard, M. and Calascer, F. (1987): Anatomical distribution and ultrastructural

- organization of the GABAergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibody. *Neuroscience* **20**, 1001-1009
- Marrack, J. (1934): Nature of antibodies. *Nature* (London) **133**, 292-293
- Matthews, M. R. (1971): Evidence from degeneration experiments for the preganglionic origin of afferent fibers to the small granule-containing cells of the rat superior cervical ganglion. *J. Physiol.* (London) **218**, 95P-96P
- Matthews, M. R. (1983): The ultrastructure of junctions in sympathetic ganglia of mammals. In: *Autonomic ganglia.* (ed.: Elfvin, L.-G.) John Wiley and Sons, New York, pp 27-66
- Matthews, M. R. and Nelson, V.H. (1975): Detachment of structurally intact nerve endings from chromatolytic neurons of rat superior cervical ganglion during the depression of synaptic transmission induced by post-ganglionic axotomy. *J. Physiol.*, (London) **245**, 91-135
- Matthews, M. R. and Ostberg, A.-J., C. (1973): Effects of preganglionic nerve section upon the afferent innervation of the small granule-containing cells in the rat superior cervical ganglion. *Acta Physiol. Pol.* **24**, 215-224
- Matthews, M. and Raisman, G. (1972): A light and electron microscopic study of the cellular response to axonal injury in the superior cervical ganglion of the rat. *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, **181**, 43-79
- McLachlan, E. M. (1974): The formation of synapses in mammalian sympathetic ganglia reinnervated with preganglionic or somatic nerves. *J. Physiol.* (London) **237**, 217-242
- Mugnaini, E. and Certel, W. (1985): An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*, vol. 4: GABA,

- and neuropeptides in the CNS, part I. (eds.: Björklund, A. and Hökfelt, T.) Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp 436-608
- Nagai, T., McGeer, P. L., Araki, M. and McGeer, E. G. (1984): GABA-T intense neurons in the rat brain. In: Handbook of chemical neuroanatomy, vol. 3: Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, part II. (eds.: Björklund, A., Hökfelt, T. and Kuhar, M. J.), Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 247-272
- Nagai, T., McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (1983): Distribution of GABA-T intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J. Comp. Neurol.* **218**, 220-238
- Njå, A. and Purves, D. (1977): Specific innervation of guinea-pig superior cervical ganglion cells by preganglionic fibres arising from different levels of the spinal cord. *J. Physiol. (London)*, **264**, 565-583
- Norberg, K. A., Ritzén, M. and Ungerstedt, U. (1966): Histochemical studies on a special catecholamine-containing cell type in sympathetic ganglia. *Acta Physiol. Scand.* **67**, 260-270
- Oertel, W. H., Schmechel, D. E., Tappaz, M. L. and Koppin, I. J. (1981): Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injection of an antigene-antibody complex. *Neuroscience* **6**, 2689-2700
- Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (1984): Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: Handbook of chemical neuroanatomy, vol. 3: Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, part II. (eds.: Björklund, A., Hökfelt, T. and Kuhar, M. J.), Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp 141-246
- Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., Madsen, S., Skumlien, S. and Stromhaug, J. (1986): Evaluation of the immunocytochemical method for amino acids. *Med.*

Biol. 64, 147-158

Pick, J. (1970): The autonomic nervous system. Lippincott, Philadelphia-Toronto

Pickel, V. M., Joh, T. H., Field, P. M., Becker, C. G. and Reis, D. J. (1975): Cellular localization of tyrosine hydroxylase by immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem. 23, 1-12

Quilliam, J. D. and Tamarind, J. P. (1972): Electron microscopy of degenerative changes in decentralized rat superior cervical ganglia. Micron 3, 454-472

Robinson, S. E., Schwartz, J. P. and Costa, E. (1980): Substance P in the superior cervical ganglion and the submaxillary gland of the rat. Brain Res. 182, 11-17

Sacchi, O. and Rossi, M. L. (1981): Cholinergic through-fibers in the rat superior cervical ganglion. J. Auton. Nerv. Syst. 4, 101-106

Sacchi, O., Consolo, S., Peri, G., Prigioni, I., Ladinsky, H. and Perri, V. (1978): Storage and release of acetylcholine in the isolated superior cervical ganglion of the rat. Brain Res. 151, 443-456

Sakai, M., Kani, K., Yoshida, M. and Nagatsu, I. (1989): Dopaminergic cells in the superior cervical ganglion of the rat: light and electron microscopic study using an antibody against dopamine. Neurosci. Lett. 96, 157-162

Sasek, C. A. and Zigmond, R. E. (1989): Localization of vasoactive intestinal peptide- and peptide histidine isoleucine amide-like immunoreactivities in the rat superior cervical ganglion and its nerve trunks. J. Comp. Neurol. 280, 522-532

Schultzberg, M. (1983): Bombesin-like immunoreactivity in sympathetic ganglia. Neuroscience 8, 363-374

Schultzberg, M. and Lindh, B. (1988): Transmitters and peptides in autonomic ganglia. In: Handbook of chemical neuroanatomy, vol. 6: The peripheral nervous system (eds.: Björklund, A., Hökfelt, T. and Owman,

- C.) Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp 297-326
- Schultzberg, M., Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Dalsgaard, C. J. and Elfvin, L.-G. (1983): Transmitter histochemistry of autonomic ganglia. In: Autonomic ganglia (ed.: Elfvin, L.-G.) John Wiley and Sons, New York, pp 205-234
- Schultzberg, M., Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Terenius, L., Elfvin, L.-G., and Elde, R. P. (1978): Enkephalin-like immunoreactivity in nerve terminals in sympathetic ganglia and adrenal medulla and in adrenal medullary gland cells. *Acta Physiol. Scand.* **103**, 475-477
- Schultzberg, M., Hökfelt, T., Terenius, L., Elfvin, L.-G., Lundberg, J. M., Brandt, J., Elde, R. P. and Goldstein, M. (1979): Enkephalin immunoreactive nerve fibers and cell bodies in sympathetic ganglia of the guinea-pig and rat. *Neuroscience* **4**, 249-270
- Siegrist, G., Ribaupierre, F. de, Dolivo, M. and Roullier, C. (1966): Les cellules chromaffines des ganglions cervicaux supérieurs du rat. *J. Microsc.* **5**, 791-794
- Siegrist, G., Dolivo, M., Dunant, Y., Forogloukerameus, C., Ribaupierre, F. de and Roullier, C. (1968): Ultrastructure and function of the chromaffin cells in the superior cervical ganglion of the rat. *J. Ultrastruc. Res.* **25**, 381-407
- Smolen, A. J. (1983): Specific binding of α -bungarotoxin to synaptic membranes in rat sympathetic ganglion: computer best-fit analysis of electron microscope radioautographs. *Brain Res.* **289**, 177-188
- Sternberger, L. A. (1979): *Immunohistochemistry*. 3. ed., John Wiley and Sons, New York
- Sternberger, L. A., Hardy, P. H. Jr., Cuculis, J. J. and Meyer, H. G. (1970): The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex

- (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 315- 322
- Tamarind, D. L. and Quilliam, J. P. (1971): Synaptic organization and other ultrastructural features of the superior cervical ganglion of the rat, kitten and rabbit. *Micron* **2**, 204-234
- Thoenen, H., Saner, A., Angeletti, P. U. and Levi-Montalcini R. (1972): Increased activity of choline acetyltransferase in sympathetic ganglia after prolonged administration of nerve growth factor. *Nature (London)* **236**, 26-28
- Toldi, J., Joó F., Ádám, G., Fehér, O. and Wolff, J. R. (1983): Inhibition of synaptic transmission in the rat superior cervical ganglion by intracarotid infusion of bungarotoxin. *Brain Res.* **262**, 323-327
- Van Gelder, N. M. (1965): The histochemical demonstration of γ -aminobutyric acid metabolism by reduction of a tetrazolium salt. *J. Neurochem.* **12**, 231-237
- Verhofstad, A. A. J., Steinbusch, H. M. W., Penke, B., Varga, J. and Joosten, H. (1981): Serotonin-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion of the rat. Evidence for the existence of separate serotonin- and catecholamine-containing small ganglionic cells. *Brain Res.* **212**, 39-49
- Vincent, S. R., Kimura, H. and McGeer, E. G. (1980): The pharmacohistochemical demonstration of GABA-transaminase. *Neurosci. Lett.* **16**, 345-348
- Waniewski, R. A. and Suria, A. (1977): Alteration in γ -aminobutyric acid content in the rat superior cervical ganglion and pineal gland. *Life Sci.* **21**, 1129-1142
- Wenthold, R. J., Zempel, J. M., Parakkal, M. H., Reeks, K. A. and Altschuler, R. A. (1986): Immunocytochemical localization of GABA in the

- cochlear nucleus of the guinea pig. *Brain Res.* **380**, 7-18
- Williams, T. H., Black, A. C., Jr., Chiba, T. and Bhalla, R. C. (1975): Morphology and biochemistry of small, intensely fluorescent cells of sympathetic ganglia. *Nature (London)* **256**, 315-317
- Wolff, J. R., Joó, F., Kása, P., Storm-Methisen, J., Toldi, J. and Balcar, V. J. (1986): Presence of neurons with GABA-like immunoreactivity in the superior cervicale ganglion of the rat. *Neurosci. Lett.* **71**, 157-162
- Wolff, J. R., Kása, P., Dobó, E. and Joó, F. (1988): GABAergic innervation of sympathetic ganglion cells. In: *New Frontiers in Brain Research.* (eds.: Elsner, N. and Creutzfeldt, O.), Thieme, Stuttgart, P313
- Wolff, J. R., Kása, P., Dobó, E., Wenthold, R. J. and Joó, F. (1989): Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervicale ganglion. *J. Comp. Neurol.* **282**, 264-273

8. A témakörrel kapcsolatos saját előadások és közlemények

1. Dobó Endre és Kása Péter: Patkány ganglion cervicale superius és stellatum GABA-erg struktúrái. MÉT LIII. Vándogyűlése, Szeged, E133, 1988
2. Kása Péter, Joó Ferenc, Dobó Endre, R.J. Wenthold, O.P. Ottersen, J. Storm-Mathisen és J.R. Wolff: Heterogeneous distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and axon terminals in the superior cervical ganglion of adult rat. *Neuroscience* 26: 635-644, 1988
3. J.R. Wolff, Kása Péter, Dobó Endre és Joó Ferenc: GABAergic innervation of sympathetic ganglion cells. In: Elsner N. és Creutzfeldt O. (szerk.): *New Frontiers in Brain Research*. Thieme, Stuttgart, P313, 1988
4. Dobó Endre, Kása Péter, R.J. Wenthold, Joó Ferenc és J.R. Wolff: Evidence for GABAergic fibers entering the superior cervical ganglion of rat from the preganglionic nerve trunk. *Histochemistry* 92: 133-136, 1989
5. Dobó Endre, J.R. Wolff, Joó Ferenc és Kása Péter: GABA és GAD immuncitokémiai lokalizálása egér ganglion cervicale superiusban. MÉT LIV. Debrecen, E117, 1989

6. Kása Péter, Dobó Endre, Joó Ferenc és J.R. Wolff:
Ingerlő és gátló transzmitterek immuncitokémiai
lokalizációja a szimpatikus idegrendszerben. MÉT LIV.
Vándorgyűlése, Debrecen, E113, 1989
7. J.R. Wolff, Kása Péter, Dobó Endre, R.J. Wenthold és
Joó Ferenc: Quantitative analysis of the number and
distribution of neurons innervated by GABA-
immunoreactive axons in the rat superior cervical
ganglion. *The Journal of Comparative Neurology* 282:
264-273, 1989
8. Dobó Endre, Kása Péter, R.J. Wenthold és J.R. Wolff:
Pronase treatment increases the staining intensity of
GABA-immunoreactive structures in the paravertebral
sympathetic ganglia. *Histochemistry*, megjelenés alatt

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tisztelettel és hálával tartozom dr. Kása Péter professzor úrnak, a SZOTE Központi Kutatólaboratóriumának vezetőjének, amiért munkám elvégzését mindvégig szorgalmazta, kritikai észrevételeivel azt segítette, és amiért biztosította a munkámhoz szükséges kítűnő laboratóriumi feltételeket.

Ezúton mondok köszönetet dr. J. R. Wolffnak, a göttingeni Georg August Egyetem Anatómiai Intézetének igazgató professzorának értékes szakmai tanácsaiért valamint azért, hogy lehetővé tette számomra kutatásaim egy részének, különös tekintettel az elektronmikroszkópos vizsgálatoknak elvégzését. Ugyancsak köszönettel tartozok A. Wolff ásszonynak az elektronmikroszkópos tanulmányokhoz nyújtott értékes segítségéért.

Köszönetet mondok továbbá Csende Ferencné és Csurgó Ilona laboratóriumi asszisztenseknek lelkiismeretes és odaadó munkájukért, és Szarka Péternek az ábraanyag elkészítéséért.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a Központi Kutatólaboratórium valamennyi dolgozójának, a munkám során felmerült egyedi problémák megoldásában nyújtott szíves segítségükért.

