

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A monoaminok szerepe a tavikagyló /*Anodonta cygnea* L./ periodikus aktivitásának szabályozásában

Nemcsók János

Témavezető:

dr. Hiripi László tudományos munkatárs

Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutatóintézete

TIHANY

- 1975 -

T A R T A L O M J E G Y Z É K

	oldal
BEVEZETÉS	1
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
I. Monoaminok előfordulása és szubcelluláris lokalizációja gerinctelen állatokban	3
II. Monoaminok bioszintézise	7
III. Monoaminok hatásának megszűnése	15
MÓDSZEREK	
a./ A periodikus aktivitás szezonális változásának kiértékelése	23
b./ Dopamin meghatározás Schellenberger és Gordon módszerével	26
c./ A katecholaminszint aktivitásfüggő változásának meghatározása	28
d./ MAO gátlók alkalmazásának módszere	29
e./ 6OHDA alkalmazása a monoaminszint és az aktivitás befolyásolására	30
f./ Monoaminok felvétele	31
EREDMÉNYEK	
1. A szerotoninszint és az aktivitás szezonális változása	34
2. A noradrenalin és dopamin aktivitásfüggő változása	41
3. MAO gátlók hatása az aktivitásra és a monoaminszintre	43
4. 6OHDA hatása az aktivitásra és a monoaminszintre	49
5. Monoaminok beépülése Anodonta pedális ganglionjába és a szerotoninbeépülés kinetikai vizsgálatának eredményei	53

	oldal
MEGBESZÉLÉS	
1./ A szerotoninszint és az aktivitás szezonális változása	73
2./ A katecholaminszint alakulása az aktív és nyugalmi periódusok kezdetén	75
3./ MAO gátlók hatása a monoaminszintre és az aktivitásra	77
4./ 6OHDA hatása a monoaminszintre, az aktivitásra	80
5./ Monoaminok beépülése Anodonta pedális ganglionjába és a szerotoninbeépülés kinetikai sajátosságai	82
ÖSSZEFOGLALÁS	88
IRODALOMJEGYZÉK	90

BEVEZETÉS

Intézetünk Kisérletes Állattani Osztályán már több mint egy évtizede folynak neurobiológiai kutatások, amelynek kísérleti objektumai főként puhatestű állatok. A kutatómunka során felvetődő problémák megoldása módszertanilag 3 fő irányból: elektrofiziológiai, morfológiai és biokémiai szempontból történt. Az eddigi kutatások felderítették, hogy csigák és kagylók idegrendszerében és szívében előforduló szerotonin mellett jelen van a dopamin, valamint némely esetben a noradrenalin is, amelyek neurotranszmitterként jelentős szerepet játszanak az ideg- és izomműködésben. Megállapítást nyert az is, hogy a monoaminok szintje farmakonokkal befolyásolható és a tavikagyló esetében ezáltal megváltozik a mozgásaktivitás is. Sikerült kimutatni és meghatározni néhány enzim aktivitását, amelyek résztvesznek a monoaminok szintézisében és lebontásában. Jelen disszertáció is a tavikagyló mozgásaktivitás biokémiai szabályozásának vizsgálatával foglalkozik. A kísérleti munka egyes része - a korszerű igényeknek megfelelően - más kutatókkal együttműködve készült.

Igy ezuttal szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hiripi Lászlónak, aki a munka közvetlen irányításán túl igen nagy figyelmet fordított arra, hogy a használt módszereket alaposan megismerhessem és elsajátíthassam, valamint hasznos tanácsai alapján disszertációmát elkészíthessem. Továbbá ezuton mondok

köszönetet Dr. Salánki János igazgatónak, aki állandó hasznos tanácsaival, a nyugodt kutatómunka feltételeinek biztosításával nagymértékben járult hozzá disszertációm elkészítéséhez. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Elekes Károlynak, akivel az egyes problémákat közösen vizsgáltuk, valamint a Kisérletes Állattani Osztály többi dolgozóinak munkám során nyújtott hasznos tanácsaikért. Köszönetet mondok továbbá Horváth Teréziának lelkiismeretes asszisztensi munkájáért, valamint az ábrák gondos megrajzolásáért. Ezuton fejezem ki köszönetemet Komáromi Sándornak, disszertációm figyelmes legépeléséért.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I. Monoaminok előfordulása és szubcelluláris lokalizációja gerinctelen állatokban

A szerotonin igen széles körben előfordul a gerinctelen állatok szöveteiben. Janakidevi és mtsai /1966/ 1 g nedves súlyra számítva 0,11 - 0,13 ug 5HT-t találtak a *Chrithidra fasciculata* nevű ostorosban és 0,6 ug/g mennyiséget a *Tetrahymena pyriformis*ban. Rude /1966/ kimutatott a földigiliszta ventralis idegkötegéhez tartozó ganglionokban sárga fluoreszcenciát mutató sejtcsoportot. Ezek könnyen megkülönböztethetők az 1 pár zöld fluoreszcenciájú sejtcsoportot tartalmazó gangliontól és a zöld fluoreszcenciára érzékeny sejtektől, amelyek dopamin és noradrenalin tartalmúak.

A szerotonin és a katecholaminok jelen vannak a rovarok központi idegrendszerében is. Így pl. Hiripi és S.-Rózsa /1973/ kimutatta, a monoaminok jelenlétét az afrikai vándorsáska /*Locusta migratoria migratorioides* R.F./ szívében és központi idegrendszerében. A szerotonin mennyisége az idegrendszerben 2,34 ug/g, a szívben 2,69 ug/g volt nedves szövetsúlyra számítva. A katecholaminok közül a dopamint sikerült kimutatni. Ennek mennyisége az idegszövetben 1,31 ug/g.

a szívben pedig 2,42 ug/g-nak adódott, szintén nedves szövetre vonatkoztatva. Noradrenalin csak a sáska agyában tudták kimutatni, amely igen kis mennyiségben fordult elő /0,24 ug/g/. Adrenalin sem az idegszövetben, sem a szívben nem tudták kimutatni.

Az utóbbi évtizedekben számos puhatestű idegrendszerében is kimutatták a monoaminok jelenlétét. Számos esetben sikerült a szerotonin /5HT/, dopamin /DA/, sőt némely esetben a noradrenalin /NA/ azonosítása. Osborne és Cottrell /1970/ *Helix pomatia* agyban és szívben mutatta ki a noradrenalin és metabolikus származékait. A dopamin is jelentős koncentrációban található meg a puhatestűek ganglionjaiban /Sweeney, 1963/, így *Limax maximus*ban /Osborne és Cottrell, 1971/, *Helix aspersa*ban /Sedden és mtsai, 1968/. *Lymnaea stagnalis* központi idegrendszerében is megtalálhatók a katecholaminok, ahol a noradrenalin koncentrációja megjelehetősen magas /Nemcsók és mtsai, 1975/. Ugyancsak számottevő mennyiségű a katecholaminok mennyisége a Cephalopodák idegszövetében /Juorio, 1971; 1972/. Kagylókban is jelentős koncentrációban fordulnak elő a katecholaminok. Sweeney /1968/ az édesvízi kagyló *Spherium sulcatum*, míg Hiripi /1968/ az *Anodonta cygnea* különböző szöveteiben mutatta ki főképp a dopamin jelenlétét.

Az eddigi mérések azt mutatják, hogy valamennyi állat közül a kagylók tartalmazzak legnagyobb mennyiségben szerotonint /Welsh és Moorhead, 1960; Dahl és mtsai, 1966; Hiripi, 1968/.

A csigák ganglionjai kevesebb 5HT-t tartalmaznak, mint a kagylóké, ezeknek értékei 1,2 - 11 ug 1 g nedves szövet súlyára vonatkoztatva. A puhatestűek harmadik nagy osztályában a Cephalopodáknál négy fajt tanulmányoztak és különböző ganglionjaikban az 5HT tartalom 0,7 - 4 ug/g volt, nedves súlyra számítva /Welsh és Moorhead, 1960; Erspamer, 1966/. A hisztokémiai és fiziológiai adatok azt mutatják, hogy ezen szerotonintartalmu neuronok néhány axonja elhagyja a gangliont és a perifériális strukturákat innerválja /Welsh, 1957; Loveland, 1963; Jaeger, 1966; S.-Rózsa és Perényi, 1966/. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok azt mutatják, hogy a monoaminok számos puhatestű perikarionjában, valamint axonjában lokalizálódnak /Dahl és mtsai, 1966; Sakharov és Zs.-Nagy, 1968; Sweeney, 1968/. Gerschenfeld /1963/ azt feltételezi, hogy a monoaminok dense-core vezikulákban tárolódnak. Zs.-Nagy /1968/ szerint *Anodonta cygnea* központi idegrendszerében jelenlevő dopamin is hasonlóan tárolódik. Differenciál centrifugálási módszerrel kapott adatok szerint az látszott valószínűnek, hogy a szerotonin az endoplazmatikus retikulum vezikuláris elemeihez kötődhet /Zs.-Nagy és mtsai, 1965/. Ujabban megállapítást nyert, hogy *Anodonta cygnea* központi idegrendszerében a szerotonin, dopamin és noradrenalin 90 %-a részecskékhez kötötten helyezkedik el. A kötött monoaminoknak pedig mintegy 60-70 %-a a mitokondriális, 15-20 %-a pedig a mikroszomális frakcióban

helyezkedik el és az idegvégződéseken jelenlevő dense-core vezikulákhoz kötődnek /Hiripi és mtsai, 1973/.

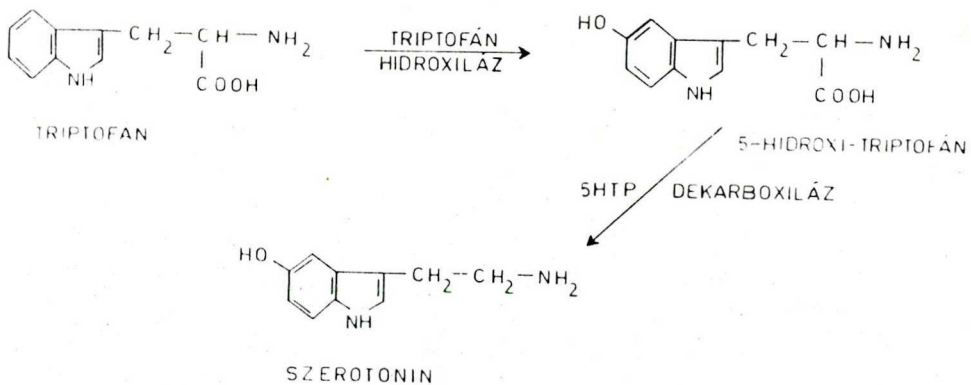
Ezek a tények, valamint a fiziológiai vizsgálatok azt a nézetet támogatják, hogy a puhatestűek központi idegrendszerében előforduló monoaminok neurotranszmitterként funkcionálnak /Welsh, 1957; S.-Rózsa and Graul, 1964; Salánki, 1970; S.-Rózsa és Pécsi, 1967; Gerschenfeld és Stefani, 1968/. Az elmúlt években megjelent közlemények alapján megállapítható, hogy a monoaminszint évszakos és napi ingadozása szoros összefüggésben van az állatok viselkedésével mind gerinces /Freideman és Walker, 1968; Quay, 1963; 1967; Uuspää, 1963; Spafford és Pengelley, 1971; Harry, 1972 a;b/ mind gerinctelen állatok esetében /Salánki, 1970; 1972; Salánki és mtsai, 1968; Salánki és Hiripi, 1970; Cardot, 1971; Hiripi és Salánki, 1973 b; Salánki és mtsai, 1974/.

A kagylók aktivitás változását már századunk elején megfigyelték, bár az ötvenes évekig kevés figyelmet fordítottak rá, amikor is Burnes és mtsai elkezdték vizsgálni az aktivitás jellegzetességeit, valamint a reguláló rendszer természetét. Noha az aktivitás bizonyos ritmust mutat, ez azonban eltér a más állatok esetében leírt 24 órás napi ritmustól /Salánki és Véró, 1969/. A kagylók ritmusa könnyen befolyásolható a külső tényezők - így pl. az O₂-szint /Salánki, 1965/ - megváltoztatásával, valamint a monoaminszintre ható farmakonok adagolásával /Hiripi, 1973/.

II. Monoaminok bioszintézise

Szerotonin szintézis

A szintézist megelőző lépés a triptofán felvétele aktiv transzport révén, amely elsődleges szubsztrátja a szintézisnek /1. ábra/.



1. ábra: Az 5HT szintézise

Mint hogy a plazma triptofán szintje napi ritmus szerint változik úgy tűnik, hogy ez a szintváltozás képes befolyásolni a szerotonin szintézis sebességét.

A szintézis első lépése a triptofán molekula hidroxilálása az 5. szénatomon és így kialakul az 5-hidroxi-triptofán. Ezt a folyamatot a triptofán-hidroxiláz nevű enzim végzi, amely alacsony koncentrációban a legtöbb szövetben előfordul és működéséhez feltétlenül szükséges molekuláris oxigén, továbbá redukált pteridin kofaktor, valamint az in vitro aktivitás megőrzéséhez szükséges egy szulfhidril csoportot stabilizáló agens, mint pl. a merkaptoetanol. Ezekkel a komponensekkel ellátott rendszerben 1 óra alatt 1 mg agy 1 μ g 5-hidroxi-triptofánt képes szintetizálni. A pH maximuma kb. 7,2 és a triptofánra vonatkoztatott K_m érték 1×10^{-4} M. A szintézis ezen lépése specifikusan blokkolható pCPA-val, amely a triptofán kompetense és irreverzibilisen kötődik az enzimhez /Koe és Weissmann, 1968/. Ezért úgy tűnik, hogy a pCPA-val történt gátlás csak akkor szűnik meg, ha új enzim molekula szintetizálódott. Patkányban 300 mg/kg dózisu pCPA intraperitoneális injektálása 3 napig kevesebb mint 20 %-ra csökkenti az agy szerotonintartalmát és kontroll értékét még két hét múlva sem éri el. Anodonta cygnea ganglionjában pedig a triptofán-hidroxilázt gátló pCPA-val történt kezelést követő 30. napon is még jelentős mértékben alacsony volt a szerotoninszint /Hiripi, 1973/. A pCPA ugyancsak csökkentette a szerotoninszintet *Lymnaea stagnalis* ganglionjában /Nemcsók és mtsai, 1975/.

A szintézis következő lépésében az 5HTP azonnal szerotoninná dekarboxilálódik. Ugy tűnik, hogy az ilyen módon funkcionáló enzim - az aromás aminosav dekarboxiláz - azonos azzal az enzimmal, mely a dihidroxifenilalanint is dekarboxilálja. Mint-hogy a dekarboxilálódás gyorsan játszódik le és K_m értéke $/2 \times 10^{-5} \text{ M}/$, kevesebb szubsztrátot igényel, mint az előző lépések. Ugy tűnik, hogy a szerotonin szintézis sebességhatározó lépése a triptofán hidroxiláz, feltéve, hogy állandóan rendelkezésre áll a triptofán.

Az aromás aminosav-dekarboxiláz jelen van számos emlős szövetben /Blaschko és mtsai, 1951/, és a gerinctelen állatok szövetei is tartalmazzák az enzimet. Így 5HTP-dekarboxiláz jelenlétét sikerült kimutatni *Busycon canaliculatum*-ban /Welsh és Moorhead, 1959/ a DOPA-dekarboxilázt pedig *Mercenaria mercenaria*-ban /Sweeney, 1969/.

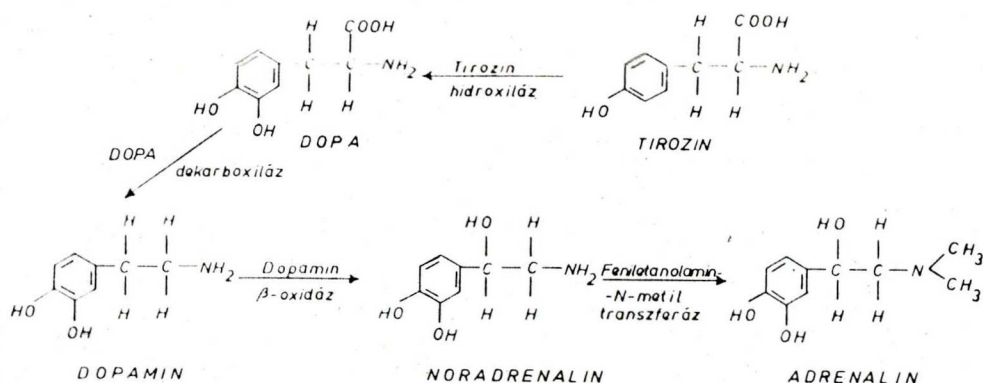
5HTP-DOPA dekarboxiláz tulajdonságait vizsgálták *Helix pomatiában* /Cardot, 1963 a; b; 1966/ és *Anodonta cygnea*, valamint *Lymnaea stagnalis* különböző szöveteiben /Hiripi és Salánki, 1969; Hiripi, 1970/. Hiripi és Salánki a fent említett közleményében az 5HTP-dekarboxiláz aktivitásának meghatározásakor a kagyló különböző szöveteiben a következő értékeket kapták: a cerebrális ganglionban 56, a viscerális ganglionban 45, a pedálisban 60, a cerebro-viscerális konnektivumban 102, a szívben 1-2, a kopoltyuban 2-3, a köpenyben szintén 2-3 μg szerotonin szintetizálódott 1 óra alatt 1 g szövetre vonatkoztatva.

Az 5HTP-dekarboxiláz K_m értéke idegszövetre vonatkoztatva $1,4 \times 10^{-5}$ M.

Lymnaea stagnalis ganglionja is képes a szerotonin szintetizálására. Ebben az esetben az 5HTP-dekarboxiláz enzimaktivitása 200 ug szintetizálódott 5HT/1 g nedves súly/1 órának adódott /Hiripi, 1970/.

Katecholaminok szintézise

A katecholaminok az agyban, a chromaffin sejtekben, a szimpatikus idegekben és ganglionban képződnek a tirozinból - egymást követő enzimatis lépések során. Aminosav prekursoruk, a tirozin, normális körülmények között jelen van a keringési rendszerben kb. $5-8 \times 10^{-5}$ M-os koncentrációban, amely aktiv transport révén a keringő testnedvből vevődik fel és az agyba, valamint más szimpatikus beidegzésű szövetbe. Azután a perifériás neuronban egy sor kémiai átalakuláson megy keresztül, amíg kialakul a noradrenalin /2. ábra/.



2. ábra: A CA szintézise

A tirozin noradrenalinná történő átalakítását elsőként mellékvesében mutatták ki. Emlősökben a tápanyag felvétel során a szervezetbe került fenilalaninból a főként májban előforduló fenilalanin-hidroxiláz enzim révén jön létre a tirozin. Mind a fenilalanin és a tirozin természetes alkotórészei az agynak, ahol szabad formában kb. 5×10^{-5} M cc-ban fordulnak elő.

Azonban mégis úgy tekintik, hogy a DA és NA bioszintézise a tirozinnál kezdődik, amely fontos kiindulópontja az állati szövetben lejátszódó sok más fontos bioszintetikus folyamatnak. Hangsúlyozni kell, hogy a tirozin CA szintézisre történő felhasználása - ellentétben más biokémiai folyamatokkal - százalékosan igen minimális.

Tirozin hidroxiláz

A catecholaminok bioszintézisének első lépését biztosító enzimet utolsóként azonosították a szintézisben résztvevő enzimek közül. Jelen van emlősök nyultagyában, a nagyagyban és a szimpatikus beidegzésű szövetekben /Cooper és mtsai, 1970/. Maga az enzim sztereospecifikus, működéséhez molekuláris O_2 , Fe^{2+} és tetrahydropteridin szükséges, valamint igen nagyfokú a szubsztrát specifitása. Tisztított vese tirozin-hidroxiláz K_m értéke 2×10^{-5} M, míg egyes szinaptoszóma preparátumban a K_m $0,4 \times 10^{-5}$ M. Úgy tűnik, hogy a perifériás idegrendszerben a tirozin hidroxilálása meghatározza a NA és DA szintézis sebességét. A legtöbb szimpatikus beidegzésű szövetben - valamint a központi idegrendszerben is - a DOPA-dekarboxiláz és a dopamin- β -oxidáz aktivitása 100 ill. 1000-szeres nagyságrendű a

tirozin-hidroxilázhoz viszonyítva. A tirozin-hidroxiláz ezen alacsony aktivitása vagy kevesebb enzim jelenlétének vagy pedig az enzim alacsony turn-overének tulajdonítható. Minthogy erről az enzimről már korábban bebizonyították, hogy a katecholaminok bioszintézisében sebességmeghatározó szerepe van, ezért ha valamilyen farmakológiai kezelés révén gátolni próbálják a CA-ok szintézisét, akkor mindig ezt az enzimet próbálják blokkolni. Több kísérlet során, amikor a szintézis folyamatát a későbbi átalakításért felelős enzimek blokkolásával igyekeztek gátolni, nem következett be a CA szint jelentős csökkenése. Azonban ha triptofán-hidroxilázt gátolták, ez jelentős CA szint csökkenést eredményezett egyebek között az agyban, szivben és más szimpatikus beidegzésű szövetben /Cooper és mtsai, 1970/.

Dihidroxifenilalanin-dekarboxiláz

A CA bioszintézisében résztvevő enzimek közül ezt fedték fel elsőként. Noha eredetileg azt hitték, hogy kizárólag csak az L-DOPA karboxilcsoportját távolítja el, a tisztított enzimpreparátummal végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a DOPA-dekarboxiláz valamennyi, a természetben előforduló aromás aminosavat - beleértve a hisztidint, tirozint, fenilalanint és természetesen a DOPA-t, valamint az 5-hidroxi-triptofánt - dekarboxilálja. Ezért ezt az enzimet ennek megfelelően L-aromás aminosav dekarboxiláznak nevezik. Az enzim a sejten belül nem kötődik valamilyen részecskéhez, mivel a sejt homogenizálása és tartós centrifugálása után a dekarboxiláz

aktivitása a felüluszó frakcióban meglehetősen nagy. Azonban agyi szinaptoszoma frakciókban az előbbtől eltérően magas a dekarboxiláz aktivitása.

A DOPA-dekarboxiláz - viszonyítva a CA-ok szintézisében résztvevő más enzimekhez - nagyon aktív és működéséhez kofaktor-ként piridoxal foszfát /B₆ vitamin/ szükséges. Az enzim K_m értéke 4×10^{-4} M. Az enzim magas aktivitásával lehet azt a tényt magyarázni, hogy nehéz volt az endogén DOPA kimutatása agyban és a szimpatikus beidegzésű szövetekben. A természetben a legtöbb szövet citoplazmájában megtalálható elég nagy mennyiségben, így az agyban, gyomorban és a vesében is mintegy azt a benyomást keltve, hogy a metabolizmusban betöltött szerepe nem csupán csak a CA szintézisben való részvételre korlátozódik.

Dopamin- β -oxidáz

Noha már sok év óta ismert az a tény, hogy a szimpatikus beidegzésű szövetek, a szimpatikus ganglionok és a mellékvese képes a dopamint noradrenalinná átalakítani, 1960-ig azonban nem tudták, hogy ez az enzim végzi az átalakítást, amelyet mellékveséből izoláltak /Blaschko és Levine, 1966/. Az enzim működéséhez szükséges molekuláris oxigén és aszkorbát. K_m értéke kb. 5×10^{-3} M. Működéséhez nem feltétlenül szükségesek a dikarboxilsavak, mint pl. a fumársav, bár ezek serkentik a reakciót. A dopamin- β -oxidáz enzim molekulánként 2 Cu²⁺-t tartalmazó protein. Szívből, agyból, szimpatikus idegből nyert

minták alapján úgy tűnik, hogy az enzim valamilyen részecskéhez kötődik, ujabban az a vélemény, hogy az aminokat tároló granulák membránjában lokalizálódik. Krónikus szimpatikus denerváció során az enzim eltűnik. A dopamin- β -oxidáz nem rendelkezik nagyfokú szubsztrát specifikussággal, in vitro a dopaminon kívül számos szubsztrátra hat, majdnem minden feniletílamint oxidál a megfelelő feniletanolaminná /pl. tiramin \rightarrow octopamin; β -metildopamin \rightarrow α -metilnoradrenalin/. Számos szerkezetileg analóg vegyület képes helyettesíteni a noradrenalint "false neurotransmitterként" a noradrenerg idegvégződésben.

A dopamin- β -oxidáz számos vegyülettel gátolható. A leghatásosabbak azok a vegyületek, amelyek a Cu^{2+} -t megkötik: D-cisztein, L-cisztein, glutation, merkaptotanol és a koenzim A. A gátlás megszüntethető N-metilmaleimid hozzáadásával, amely a szulfhidril csoporttal lép reakcióba és megakadályozza a kötődést ezekhez a vegyületekhez. Az újabb közlemények szerint sikerült kimutatni szövethomogenizátumban endogén inhibitorokat, amelyek eltávolítása után szignifikánsan megnövekedett a dopamin- β -oxidáz aktivitása. Feltehetően ez az endogén faktor szerepet játszik a CA bioszintézis szabályozásában, azonban az is lehet, hogy ez az inhibitor csupán műtermék.

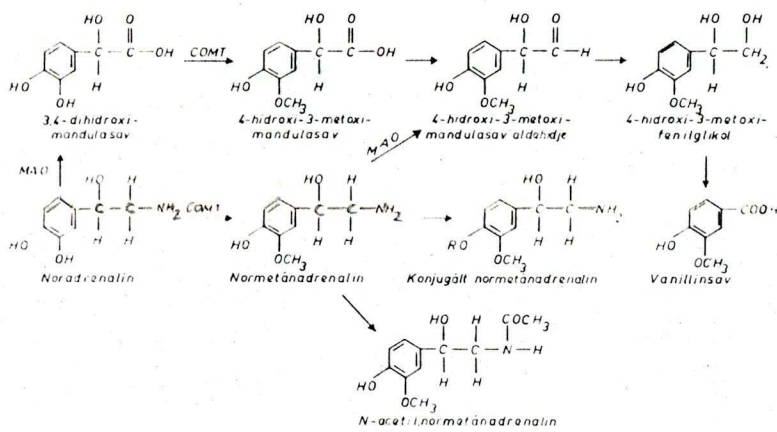
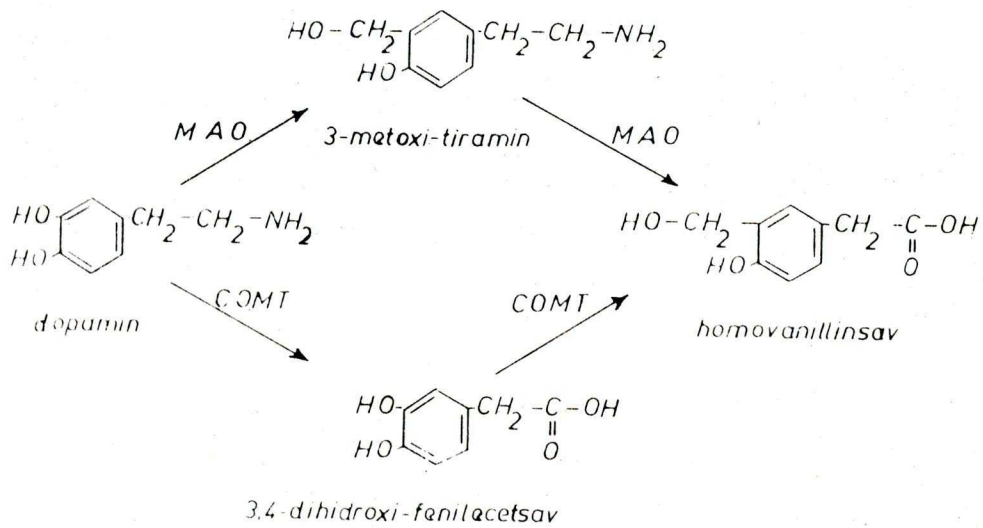
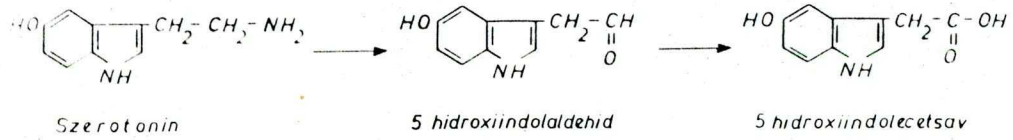
Feniletanolamin-N-metil-transzferáz

A fenti enzim az adrenalin szintézisében játszik jelentős szerepet és elsősorban a mellékvesében fordul elő, noha már

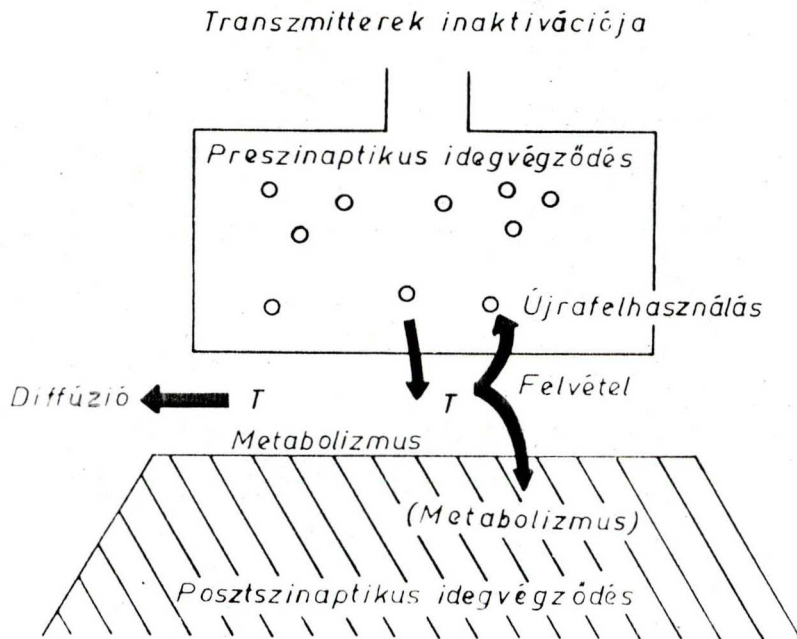
kimutattak emlős szivben és agyban is. A dekarboxilázhoz hasonlóan homogenizálás után az enzimet szintén a felüluszból tudták kimutatni. Az aktivitás kimutatásához szükséges a metil donor S-adenozil metiljonin jelenléte. A mellékveséből nyert enzim csak enyhén szubsztrátspecifikus és számos β -hidroxilált amin nitrogénatomjára képes átvinni a metilcsoportot. Minthogy a fenti enzimek közül szerotonin és a katecholamin szintézis esetében a tirozin- és a triptofán-hidroxiláz enzim aktivitása határozza meg a szintézis sebességét, így a szerotonin és katecholaminszint csökkentése a lépések gátlásával érhető el és így az egyik legalkalmasabb módszer a szerotoninszint és a viselkedési válaszok közötti korreláció keresése. Ujabban azonban elterjedt a szerotoninerg rendszer gátlására az 5,7- ill. az 5,6-dihidroxitriptamin illetve a katecholamin rendszer gátlására a 6OHDA és a 6-amino-dopamin használata. E vegyületek szelektíven károsítják a szinaptikus neuronokat azáltal, hogy az adrenerg vagy a szerotoninerg rendszereket károsítják és hatásuk tulajdonképpen "kémiai szimpatektómia". A legtöbb esetben ez a kémiai hatás felér a mechanikus uton elvégzett denervációval.

III. Monoaminok hatásának megszűnése

A preszinaptikus idegvégződésekből felszabadult neurotranszmitterek, így a monoaminok biológiai hatásának megszüntetése jelenleg háromféle módon képzelhető el /4. ábra/.



3. ábra: A szerotonin, dopamin és noradrenalin enzimatiskus lebontása



4. ábra: A preszinaptikus idegvégződésből felszabadult monoaminok farmakológiai akciójának megszűnési módjai

Az egyik elképzelés a felszabadult transzmitter diffúziója, eltávozása a szinaptikus résből és az ezt követő felhígulása a környező intracelluláris folyadékban. Az az elképzelés, hogy a diffúzió elég gyors ahhoz, hogy megmagyarázza a transzmitter akciójának megszüntetését pl. a Molluskák ganglionjában /Gerschenfeld és Stefani, 1968/. Jobban ismert az a mechanizmus, amely maga után vonja a felszabadult transzmitter metabolikus átalakítását farmakológiailag inaktív vegyületté /3. ábra/. Ezidáig számos szerzőnek sikerült kimutatni a monoaminok katabolitikus folyamatának köztes,

illetve végtermékeit. Az ötvenes évek elején Blaschko és Hawkins kimutatta monoaminoxidáz jelenlétét *Octopus vulgaris*-ban /Blaschko és Hawkins, 1952/. Juorio és Killick /1972/ leírta, hogy számos cephelopoda *opticus lobus*ában és a csigákban is /*Helix pomatia*, *Helix aspersa*, *Aplysia limacina*/ megtalálhatók a katecholaminok és a szerotonin, valamint ezek savas metabolitjai. *Lymnaea stagnalis* különböző szerveiben is sikerült kimérni a MAO enzim aktivitását. Hiripi mérései szerint *Lymnaea* ganglionban 77, szívben 20 és vesében 270 ug szerotonint képes lebontani 1 g szövet 1 óra alatt. Ugyanebben az állatfajban iproniazid és actomol gátolta a MAO aktivitását /Hiripi, 1970; Sakharov és Zs.-Nagy, 1968/. Nem volt mérhető, vagy csak csekély enzimaktivitást találtak *Helix pomatia* /Cardot, 1966/ ganglionjában. A MAO gátló tranilcipromin hasonlóan az Anodontán kapott eredményekhez /Hiripi és mtsai, 1974/ nem növelték, hanem inkább csökkentették a szerotoninszintet *Lymnaea* ganglionban /Nemcsók és mtsai, 1975/. Mirolli /1968/ nem tudta kimutatni MAO jelenlétét a *Busycon canaliculatum*-ban. Véleménye szerint lehetséges, hogy az idegrendszerben jelenlevő 5HT úgy inaktiválódik, hogy más molekulákkal lép kapcsolatba és azután MAO révén a vesében inaktiválódhat, minthogy ismert az a tény, amely szerint a vesehomogenizátum képes az 5HT-t 5-hidroxiindolecetsavvá metabolizálni /Kerkut és Cottrell, 1963/.

Az inaktiváció egy harmadik típusa a felszabadult neurotranszmitterek membrán transzport rendszerrel történő eltávolítása

a szinaptikus résből. Egy ilyen transzport rendszer általában a preszinaptikus idegvégződésben a posztzinaptikus sejtben vagy a közeli Schwann ill. glia sejtekben helyezkedhetne el. Mégis úgy tűnik, hogy egy ilyen felvételi mechanizmus általában a preszinaptikus idegvégzésekben található /Iversen, 1971/.

Monoaminok felvétele idegszövetben

Számos szerző leírta a szerotonin akkumulációját agyban, amely eleinte úgy tűnt, hogy nem specifikus és csupán ioncserélődési folyamatnak fogható fel /Shanberg, 1963; Robinson és mtsai, 1965/. Az újabb munkák szerint alacsony szerotoninkoncentráció használata mellett bizonyítékot találtak, hogy az agyban létezik egy specifikus, energiaigényes szerotoninfelvétel. Ezt a specifikusságot alátámasztja Snyder és mtsai /1970/ azon felfedezése, hogy sikerült kimutatni patkány agyszövetekben: a szerotonint felvevő rendszer a NA-t felvevőtől eltérő helyen lokalizálódik /Gfeller és mtsai, 1968; Snyder és mtsai, 1969/. Ugy tűnik, hogy kis dózisu intravertikularisan beadott ³H-5HT szintén szelektíven a szerotoninerg neuronokban lokalizálódik /Aghajanian és Bloom, 1967/. Azonban arra vonatkozóan is vannak bizonyítékok, hogy a vas deferensben /Thoa és mtsai, 1969/ a tobozmirigyben /Bertler és mtsai, 1964; Neff és mtsai, 1969/ és az agyban /Lichtensteiger és mtsai, 1967; Fuxe és Ungerstadt, 1968/ a szerotonin a katecholaminerg neuronokba is

akkumulálódik.

A kinetikai vizsgálatok során azt találták, /Shaskan és Snyder, 1970/ hogy az akkumuláció a koncentráció függvényében telítési görbével írható le. Az enzimkinetikából ismert Michaelis-Menten egyenlet alkalmazható az affinitási konstans K_m és a felvétel maximális sebességének V_{max} meghatározására. A Lineweaver-Burk egyenes megszerkesztése során azonban a pontok nem egy, hanem két egyenest határoznak meg, amely azt jelenti, hogy a felvétel egy magas és egy alacsony affinitású rendszer működésén keresztül valósul meg. A striatumban, a hipotalamuszban, az agykéregben, a nyultagyban és a köztiagyban a magas affinitású rendszer és az alacsony affinitású rendszer K_m értéke 2×10^{-7} M, ill. 8×10^{-6} M volt. Számos bizonyíték azt sugallja, hogy az alacsony affinitású rendszer, amely predomináns magas szerotoninkoncentráció mellett, a katecholaminerg végződésekbe történő szerotonin akkumulációt reprezentálja.

Katecholamin felvétel

Az idegvégződések által történő transzmitter felvétel elképzelés eredete a NA-nal kapcsolatos, amely az agyban specifikus neuronokban lokalizálódik és megállapították, hogy a posztganglionáris szinaptikus idegvégződéseknel neurotranszmitterként funkcionál. Figyelemreméltó bizonyíték van arra, hogy a NA neuronális újrafelvétele a szinaptikus akció megszüntetését szolgálja /Axelrod, 1965; Iversen, 1967/. A perifériás szimpatikus idegrendszerben szimpatikus denerváció hatására a NA-felvétel teljesen megszűnik, mintegy igazolván azt,

hogy a NA specifikusan vevődik fel a szinaptikus idegvégződéseknél. A NA és DA in vivo agyban történő felvételét az aminosav intravénás injektálásával /Glowinski és Iversen, 1966/ és in vitro agyszövetek katecholaminokkal történő inkubálásával /Dengler és mtsai, 1962; Snyder és mtsai, 1968 a;b/, valamint izolált szinaptoszómákban /Colburn és mtsai, 1968; Bogdanski és mtsai, 1968/ vizsgálták.

A CA-felvétel specifitásának tanulmányozásához különböző koncentráció mellett megmérték a felvételt és azt amikor ez telítendő volt, meghatározták az agy számos területén a NA affinitási konstansát. A striatumot kivéve minden területen a kettős reciprok érték ábrázolása egy pontba konvergált, ugyanazon $K_m = 4 \times 10^{-7}$ M értéket mutatva. Másrészt a striatumban a NA akkumulációra vonatkozó K_m érték ötször magasabb, kb 2×10^{-6} M. Ez alkalommal mutatták ki először, hogy alapvető különbség van a DA és NA neuronok viselkedésében. A striatumban a DA-nak alacsonyabb a K_m értéke, mint a NA-é, mutatván azt, hogy a dopaminnak magasabb az affinitása a striatális neuronokhoz, mint a NA-é. Mivel a striatumban feltehetően a DA funkcionál katecholamin transzmitterként, ez a megfigyelés nem volt meglepő. Az agy más területein a DA-felvétel kettős reciprok ábrázolása nem valósítható meg egy egyenes vonallal. Azonban a görbék felbonthatók két egyenes vonalra, amely ennek megfelelően $0,8 \times 10^{-7}$ M és $1,4 \times 10^{-6}$ M K_m értéket adnak. A DA-felvétel komponensei hasonlóak voltak

a hipotalamuszban, a cerebrális cortexben, a köztiagyban, a nyultagy hidjában és a cerebellumban. A DA-felvétel közül az egyik ötször nagyobb affinitásu a DA-ra /uptake₁, $K_m = 0,8 \times 10^{-7}$ M/, mint a NA-ra, míg a másik csak negyedolyan affinitásu /uptake₂, $K_m = 1,4 \times 10^{-6}$ M/, mint a NA felvételi rendszer. Vajon ezen rendszerek közül melyik reprezentálhatta a NA helyekre történő belépést? Megpróbálták megfejteni ezt a kérdést oly módon, hogy megmérték ezen két CA-nak az extrastriális agyterületekbe történő felvételért végbemenő kölcsönös kompetícióját. Abban az esetben, ha extrastriális területen DA-nal gátolták a ³H-NA beépülését, akkor azt tapasztalták, hogy ³H-NA-felvétel DA-nal történt gátlásának inhibíciós konstansu /K_i/ a nem striatalis területeken $0,8 \times 10^{-7}$ M volt, hasonlóan a DA felvételére vonatkoztatott affinitási konstanshoz, bizonyítva azt, hogy a DA magas affinitásu felvétele a NA neuronokba is végbemegy. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DA nagyobb affinitással bír a NA transportrendszerhez, mint maga a NA. Ez így összességében nem váratlan, mivel Iversen munkája is azt sugallja, hogy a DA nagyobb affinitással rendelkezik a perifériás szinaptikus idegvégződésekhöz, mint a NA.

Fentiek figyelembevételével kísérleti objektumként Anodonta cygnea-t használva vizsgáltuk az idegrendszerben:

- a./ a szerotoninszint és az aktivitás szezonális változását,
- b./ a noradrenalin és a dopamin aktivitásfüggő változását,
- c./ a katecholaminerg rendszert szelektíven és tartósan

károsító 6OHDA hatását,

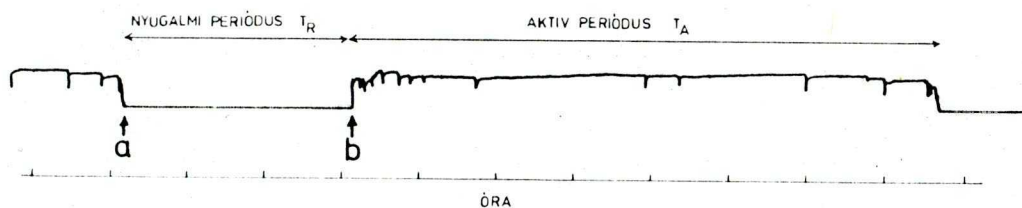
d./ MAO-gátlók hatását a monoaminszintre és az aktivitásra,

e./ a monoaminok felvételét idegrendszerben, mint a neurotranszmitterek farmakológiai hatásmegszüntetésének lehetséges módját.

MÓDSZEREK

a./ A periodikus aktivitás szezonális változásának kiértékelése

A periodikus aktivitás a záróizom tónusos kontrakciójának és relaxált állapotának váltakozása. Amikor a záróizmok elernyednek, a kagylóhéjak kinyílnak és esetenként gyors, ritmikus mozgást végeznek. Ez az aktív periódus. A záróizmok megfeszülése okozza a kagylóhéjak becsukódását és ezt nyugalmi periódusnak nevezzük /5. ábra/.



5. ábra: Anodonta cygnea motoros aktivitásának folyamatos regisztrálása

Ezt a tevékenységet kagylóaktográf /Salánki és Balla, 1964/, valamint mozgásindikátor /Véró és Salánki, 1969/ segítségével regisztráltuk. A periodikus aktivitás évszakos változásának vizsgálatakor évszakonként 25-30 kagyló aktivitását regisztráltuk 15-60 napig laboratóriumi körülmények között. Kísérletünkhöz *Anodonta cygnea* felnőtt 150-200 g-os egyedeit használtuk. Az állatokat természetes vízhőmérséklethez közelálló, átfolyó balatonvizben tartottuk. Az aktivitás kiértékelésekor figyelembe vettük a teljes kísérleti idő alatt mért aktív /A/ és nyugalmi /R/ periódusok számát /n/, valamint az aktív /T_A/ és nyugalmi /T_R/ periódusok időtartamát. Kiszámítottuk az aktív és nyugalmi periódusok átlaghosszát:

$$\frac{\sum T_A}{n_A} \quad \frac{\sum T_R}{n_R}$$

az aktív és nyugalmi periódusban eltöltött idő %-os arányát:

$$\frac{\sum T_A}{\sum T_A + \sum T_R} \times 100; \quad \frac{\sum T_R}{\sum T_A + \sum T_R} \times 100$$

valamint a periodicitás frekvenciáját:

$$\frac{n_A}{T_A + T_R} \quad \frac{n_R}{T_A + T_R}$$

Mint hogy a laboratóriumi körülmények leginkább télen különböznek a természetestől, ezért az aktivitás szezonális változásának

vizsgálatakor 3 kísérleti állat aktivitását a befagyott Balatonba 3 m mélyre helyezve regisztráltuk, speciális mozgásindikátor segítségével /Véró és Salánki, 1969/.

A szerotonin mennyiségét minden évszakban a természetes körülményeknek megfelelő hőmérsékleten tartott kagylók központi idegrendszeréből határoztuk meg. Egy meghatározáshoz 5-10 egyed mindhárom ganglionját felhasználtuk /cerebrális, pedális, viscerális/. Az izolálást és meghatározást Bogdansky és mtsai /1956/ módszere alapján a következőképpen végeztük:

A ganglionok kb. 15 mg-nyi össz mennyiségét 3 ml 0,1 n HCl-ban homogenizáltuk. A homogenizátum pH-ját vízmentes Na_2CO_3 -tal, kb 10-re állítottuk, majd 3 ml borátpuffert /pH = 10; 0,5 M/, NaCl-t és 5 ml tisztított n-butanolt adtunk a mintákhoz, amelyeket azután 15 percig ráztunk, mialatt a szerotonin a butanolos fázisba ment át, míg a savas 5-hidroxindolok /5HTP, 5HIAA/ a vizes fázisban maradtak. A rázás befejeztével centrifugálás következett és azután a minták butanolos fázisából 4 ml-nyit átvittünk egy olyan centrifugacsőbe, amelybe előzőleg 0,5 ml 0,1 n HCl-t és 8 ml tisztított n-heptánt töltöttünk, majd ismét 15 perces rázás következett. A heptán hatására a szerotonin visszaoldódik a savas fázisba. A megfelelő rázás után centrifugáltuk a mintákat, majd a felső szerves fázist leszívtuk. A savas fázis - amely a szerotonint tartalmazta - normalitását 3 n-ra állítottuk be, majd kvarc küvettában fluoriméterrel mértük a fluoreszcencia relativ intenzitását 300/540 nm-on.

Hasonlóképpen történik a szerotonin meghatározása Snyder és mtsai /1965/ módosított módszerével. A különbség csupán annyi, hogy a ganglionokat 1 ml 0,1 n HCl-ban homogenizáltuk és az extrahálás utolsó lépéseként kapott mintákhoz - amely a szervesetlen fázist jelenti - 100 ul 0,1 ninhidrint adtunk. Ezt követően a mintákat 30 percig 75 C^o-on tartottuk, és egy óra elteltével spektrofotofluoriméteren - 380/490 nm-on - mértük a minták fluoreszcenciájának relativ intenzitását.

b./ Dopamin meghatározás Schellenberger és Gordon módszerével

Reagensek: Az extraháláshoz olyan 0,4 n perklórsav szükséges, amely literenként 1 g nátrium-metabiszulfidot /Na₂S₃O₄/ és 0,5 g EDTA-Na₂-t tartalmaz. A procedura során szükséges alumínium-oxidot a következőképpen tisztítjuk: kb. 250 g alumínium-oxidot desztillált vízzel átmoszuk a nem ülepedő, lebegő részecskéket dekantálással eltávolítottuk. Ezután forró savval kezeljük, majd az alumínium-oxidot addig mossuk vízzel, amíg pH-ja eléri a 3,4-et. Ezt követően 200-300 C^o-on szárítjuk. Tris-oldat: 1 liter 0,525 n NaOH oldatot készítünk, amely 25 g EDTA-Na₂-t és 17,9 g Tris-t tartalmaz. Az így készített oldat pH-ja szobahőmérsékleten 12,5.

DA és NA extrahálás

A meghatározáshoz 150 g-os kagylók mindhárom ganglionját felhasználtuk. A kagylók ganglionjait 3 ml 0,4 n a fenti

módon elkészített perklórsavval homogenizáltuk, majd 20 000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A felüluszüt átöntöttük 8 ml Tris-puffert és 300 mg alumínium-oxidot tartalmazó centrifugacsőbe és a mintákat 20 percig ráztuk, majd centrifugáltuk. A rázás ideje alatt a CA-ok az alumínium-oxidon adszorbeálódtak. Ezt követően desztillált vízben az alumínium-oxidot 3-szor átmostuk, majd 0,05 n perklórsavval eluáltuk a CA-okat az alumínium-oxid felületéről 20 perces rázás során.

DA meghatározása

Reagensek:

a./ Foszfátpuffer-EDTA-oldat: 1 liter 0,1 M foszfát-pufferhez 9,0 g EDTA- Na_2 -t adunk és a pH értéket 5 n NaOH-dal 7-re állítjuk. A foszfátpuffert úgy állítjuk elő, hogy 4,27 g vízmentes Na_2HPO_4 -t és 9,25 g KH_2PO_4 -t oldunk fel 1 liter vízben.

b./ 0,1 n jód reagens: 2 g nátrium-jodidot és 0,5 g jódot 40 ml-re hígítunk.

c./ 2,5 %-os lugos nátrium-szulfid oldat: 1 ml 250 mg Na_2SO_3 -t tartalmazó oldatot 10 ml-re hígítunk 5 n NaOH-dal. A reagensek elkészülte után a perklórsavas eluátum 1 ml-nyi mennyiségét pH 6,5-re állítjuk 1,5 ml 0,1 M foszfátpuffer-EDTA oldat hozzáadásával. A mintához 0,2 ml jódos reagenst adunk és pontosan két perc múlva a jódos oxidálást lugos szulfid hozzáadásával leállítjuk, majd újabb 2 perc elteltével 0,4 ml ecetsavval a pH-t 4,4-4,8 értékek közé állítjuk be.

Ezután a mintákat 35-40 percig 100 C^o-on tartjuk, így kifejlődik a DA fluoreszcenciája. Az idő lejártával a mintákat jéggel hűtjük és utána - 325/380 m μ -on - azonnal mérjük a fluoreszcencia relatív intenzitását.

c./ A katecholaminszint aktivitásfüggő változásának meghatározása

A ganglionokat az aktív és nyugalmi periódusok kezdetén kiperparáltuk és mértük ezek katecholamintartalmát. A meghatározásokat 2-5 ugyanazon aktivitású állapotban levő állatokon végeztük el, minthogy ezen meghatározáshoz a katecholaminok relative alacsony mennyisége miatt egy állat ganglionja nem lett volna elegendő. A cerebrális és viscerális ganglionból együttesen, míg a pedális ganglionból külön mértük a katecholaminszintet. A katecholaminszintet a fent leírt Schellenberger és Gordon /1971/, valamint Anton és Sayre /1962/ módszere szerint határoztuk meg.

A katecholaminok meghatározásához szükséges extrahálás Anton és Sayre szerint nem különbözik a Schellenberger és Gordon által leírttól. Eltérés csak a minta katecholamintartalmának meghatározásában van. A két módszer érzékenysége eltérő. Anton és Sayre módszere kisebb mennyiségű katecholamin meghatározását teszi lehetővé. A másik módszer előnye viszont az, hogy ugyanazon mintából meghatározhatjuk a dopamint és noradrenalint is.

A dopamin meghatározása

A méréshez 200 μ l eluátumot használtunk, amelyhez egymás után a következő vegyületeket adtuk: 100 μ l foszfátpuffer; 10 μ l 70 %-os alkohol, 20 μ l NaJO_4 . A nátriumjodát hozzáadása után 1 perccel 100 μ l lugos szulfittal leállítjuk a reakciót, majd a mintákhoz gyorsan adunk 300 μ l vizet; 100 μ l citrátpuffert és 150 μ l foszforsavat. Ezután rögtön mérjük spektrofotofluorimetriásan 339/390 μ m-on a relatív intenzitást.

A noradrenalin meghatározása

A méréshez szintén 200 μ l eluátumot használtunk, amelyhez 20 μ l $\text{K}_3\text{Fe}/\text{CN}/_6$ -t adunk, majd 1 perc elteltével 200 μ l lugos aszkorbinsavval leállítottuk az oxidációt. Ezután 500 μ l víz hozzáadásával szintén spektrofotofluorimetriásan 409/519 μ m-on mértük a minta relatív intenzitását.

d./ MAO-gátlószer alkalmazásának módszere

A kísérletekhez 150 g-os kagylókat használtunk. A mozgásaktivitás regisztrálása aktográf /Salánki és Balla, 1964/ segítségével történt a kezelést megelőzően ill. azt követően összesen 14 napig. A kezelésekhöz actomol, pargylin, nialamid, iproniazid és tranilcipromin 10^{-4} M-os koncentrációját a következőképpen használtuk fel: a farmakonokat 2 l szűrt balatonvizben oldottuk, amelybe az állatokat

már előzőleg belehelyeztük és egy nap elteltével a vizet normál átfolyó balatonvizre cseréltük. A kontroll állatok esetében is az átfolyás 1 napig szünetelt. A fenti feltételek mellett tartottuk azokat a kezelt és kontroll állatokat, amelyek a szerotonin, dopamin és noradrenalin meghatározás kísérleti alanyai voltak.

A szerotonint Snyder és mtsai /1965/, míg a dopamint és noradrenalint Schellenberger és Gordon /1971/ módszere szerint határoztuk meg és a monoaminok koncentrációját a kontroll értékek %-ában adtuk meg.

e./ 6OHDA alkalmazása a monoaminszint és az aktivitás befolyásolására

A farmakont aszkorbinsavas Ringer oldatban oldottuk, majd a lábizomba injektáltuk. A kísérlet során 25 mg/kg, 50 mg/kg és 7,5-7,5-10 mg/kg-os dózisokat használtunk. Az utóbbi 3 dózist egymást követő 1.3. és 5. napokon injektáltuk az állatokba. A monoaminszintet a kezelést követő 1., 3., 5., 10., 15., 20., 35. napon, ill. egyes esetekben a katecholaminszintet még a 40. nap után is meghatároztuk. A szerotonint Snyder és mtsai /1965/, míg a dopamint és a noradrenalint Schellenberger és Gordon /1971/ módszere szerint határoztuk meg és a monoaminok koncentrációját a kontroll értékek %-ában adtuk meg.

A 6OHDA hatását a kagylók aktivitására a már korábban említett mozgásindikátor segítségével regisztráltuk. Kontrollként aszkorbinsavas Ringer oldattal beinjektált állatokat használtunk.

f./ Monoaminok felvétele

A monoaminok felvételének vizsgálatát két évszakban végeztük el. Egyik alkalommal december hónapban vizsgáltuk a 5HT, DA és NA felvételét Anodonta pedális ganglionjában. A másik vizsgálatot május hónapban végeztük el és ez alkalommal csak a szerotonin beépülését tanulmányoztuk, azonban mindhárom /cerebrális, pedális és viscerális/ ganglionban.

5HT, DA, NA beépülés vizsgálata Anodonta pedális ganglionjába

A vizsgálatokhoz a tavikagyló /Anodonta cygnea L./ 200-300 g-os példányait használtuk. A pedális ganglionokat a kipreparálás után az inkubálásig jéghideg fiziológiás oldatban tartottuk /Marczinsky, 1959/. Három állat kb. 6-10 mg pedális ganglionját 25 C^o-on 1 ml fiziológiás oldatban 10 perc előinkubálás után 30 percig inkubáltuk 0,1 - 100 μ M ¹⁴C-jelzett aminok jelenlétében /¹⁴C-5HT 57 mCi/nmol; ¹⁴C-DA 57,3 mCi/nmol; ¹⁴C-NA 52 mCi/nmol Amersham/. Ezt követően a ganglionokat 20 ml jéghideg fiziológiás oldatban mostuk, szűrőpapíron történt leitatás

után nedves sulyát mértük és 2 ml absz. alkoholban homogenizáltuk. A homogenizátum radioaktivitását 10 ml Bray-oldatban, a medium radioaktivitását pedig 2 ml etanol és 10 ml Bray-oldatban Nuclear-Chicago liquidscintillációs spektrométerrel mértük. A korrekciót belső standard segítségével határoztuk meg. A szövet - medium arányt és az amin felvétel sebességét Shaskan és Snyder /1970/ módszerével számítottuk.

5HT beépülésének kinetikai vizsgálata, valamint farmakonok alkalmazása a beépülésre Anodonta cerebrális, pedális és viscerális ganglionjaiban

A kísérletekhez Anodonta 150-250 g-os egyedeit használtuk. A kipreparálás a fentiekhez hasonlóan történt. Az inkubálást 20 C^o-on 10 perc előinkubálás után 30 percig végeztük. Inkubációs elegyként 2 ml kagyló Ringer oldatot használtunk, amelybe két állat megfelelő ganglionjait raktuk. Az inkubációs elegyben levő ³H-5HT koncentráció 0,1 nmol/ml, a felhasznált ³H-5HT specifikus aktivitása pedig 500 mCi/nmol volt. Az inkubálás befejeztével a ganglionokat Ringer oldatban jól lemostuk, majd 0,5 ml NCS solubilizer oldatba raktuk. A felüluszóból pedig 0,1 ml-t 10 ml Bray-oldatba vittünk. Ezután a szövetoldószerben a gangliont 40-50 C^o között 1-2 óra hosszat ráztuk, amíg a szövetminta teljesen feloldódott, majd ezt követően hozzátöltöttünk 40 ul cc. ecetsavat és 10 ml toluolos koktélt. Minthogy a mintáknak az

alkalmazott szövetoldószer miatt erős kemolumineszcenciája van és ez a mérést zavarja, a mintákat egy éjjelen át állni hagytuk. Ezután a mintákat liquidscintillációs spektrométerrel mértük /Isocap 300/. A méréseket májusban végeztük. Mértük a felvétel alakulását 10, 20, 30, 50, 80 perces, valamint 0 C^o, 10 C^o, 20 C^o és 30 C^o hőmérséklet mellett végzett inkubálás után.

Vizsgálatok során meghatároztuk mindhárom ganglion 5HT-felvételére vonatkoztatott K_m értékeket, a beépülés maximális sebességét, valamint a hőmérséklet, a NA; K; Mg-mentes fiziológiás oldatok és különböző farmakonok, így a dopamin, noradrenalin, reserpin, ouabain, tetrabenazin hatását a beépülésre. Ugyancsak vizsgáltuk a szerotonin beépülését a hőmérséklet és az idő függvényében. Az ionmentes fiziológiás oldatokban a nátriumot kolinkloriddal, a káliumot és kalciumot nátriumkloriddal, míg a magnéziumot szacharózzal helyettesítettük. Az alkalmazott farmakonok koncentrációi a következők:

noradrenalin: 5×10^{-7} ; 5×10^{-6} ; 5×10^{-5} mol/ml
dopamin: 5×10^{-8} ; 5×10^{-7} ; 5×10^{-6} ; 5×10^{-5} mol/ml
ouabain: 5×10^{-7} ; 5×10^{-6} ; 5×10^{-5} ; 5×10^{-4} mol/ml
tetrabenazin: 5×10^{-8} ; 5×10^{-7} ; 5×10^{-6} ; 5×10^{-5} mol/ml
reserpin: 5×10^{-8} ; 5×10^{-7} ; 5×10^{-6} mol/ml.

A gátló hatást a kontroll minták beépülésének %-ában fejeztük ki.

EREDMÉNYEK

A szerotoninszint és az aktivitás szezonális változása

1. Az aktivitás szezonális változása

A különböző évszakokban történt regisztrálás eredményei azt mutatják, hogy a tavikagyló aktivitása jelentős szezonális változást mutat, így aktivitásban és nyugalomban eltöltött idő százalékos aránya, az aktiv és nyugalmi periódusok váltakozásának gyakorisága is évszakonként eltérő.

Tavasszal az aktivitásban és nyugalomban eltöltött idő százalékos aránya 52,7 : 47,3; amely nagyon közel áll az 1 : 1 arányhoz /1. táblázat/.

1. táblázat

Anodonta cygnea aktivitásban és nyugalomban eltöltött idejének százalékos változása évszakonként

évszak	aktiv idő	nyugalmi idő
Tavaszi	52,7	47,3
Nyár	66,6	33,4
Osz	65,1	34,9
Tél	58,6	41,4

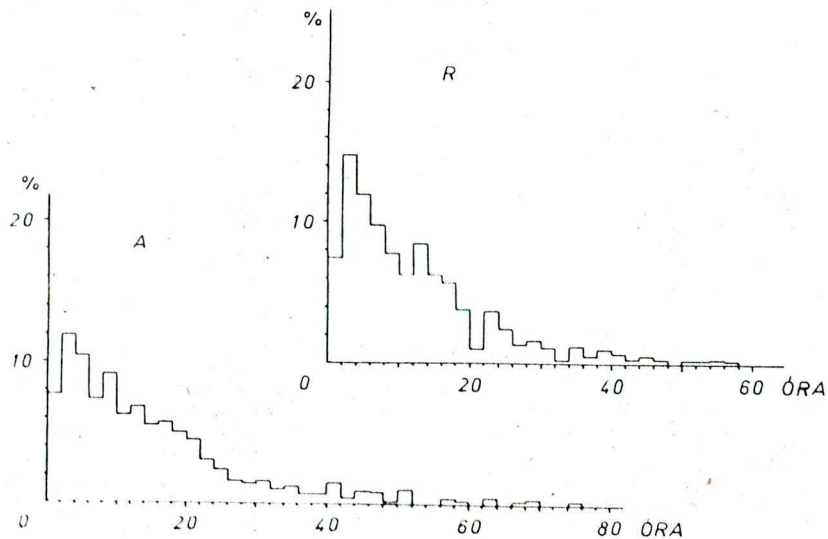
Aktiv és nyugalmi periódusok idejének átlaghossza - 14,77 ill. 13,0 óra - is meglehetősen magas értéket mutat /2. táblázat/.

2. táblázat

Anodonta cygnea aktiv és nyugalmi periódusok átlaghosszának évszakos változása

évszak	p e r i ó d u s	
	aktiv /óra/	nyugalmi
Tavaszi	14,77 ± 13,26	13,03 ± 12,68
Nyár	9,51 ± 13,40	4,74 ± 4,16
Ősz	14,89 ± 16,40	7,90 ± 8,22
Tél	16,33 ± 10,66	11,65 ± 6,47

Az aktiv és nyugalmi periódusok időtartam szerinti megoszlása nagyon hasonló /6. ábra/.



6. ábra: Az aktiv és nyugalmi periódusok időtartam szerinti megoszlása tavasszal

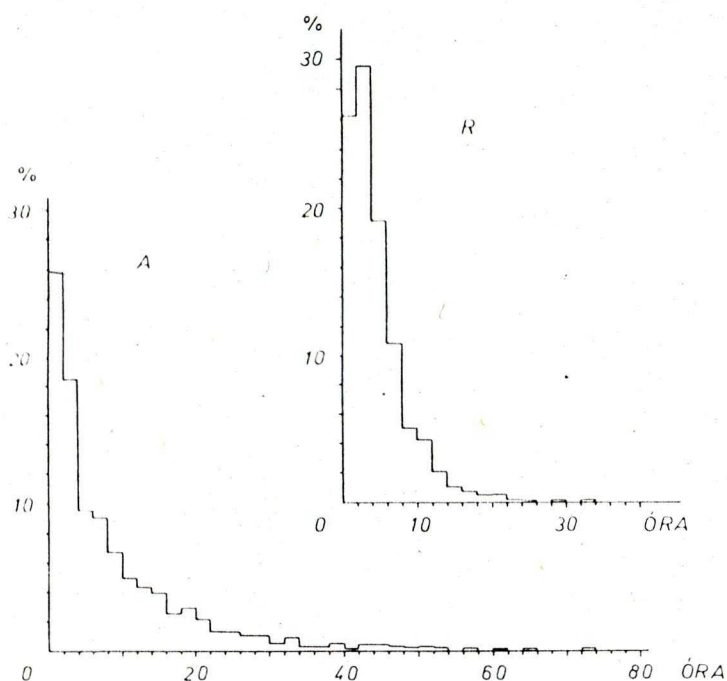
Mindkét esetben a periódusok átlaghossza eltér a leggyakrabban előforduló periódusok átlagos időtartamától. A periodicitás frekvenciája - ami alatt az aktív periódus megjelenésének napi gyakoriságát értjük - tavasszal a legalacsonyabb /2./a táblázat/.

2./a táblázat

A periodicitás frekvenciájának évszakos változása

Évszak	periodicitás frekvenciája
Tavaszi	0,857
Nyár	1,679
Ősz	1,049
Tél	0,862

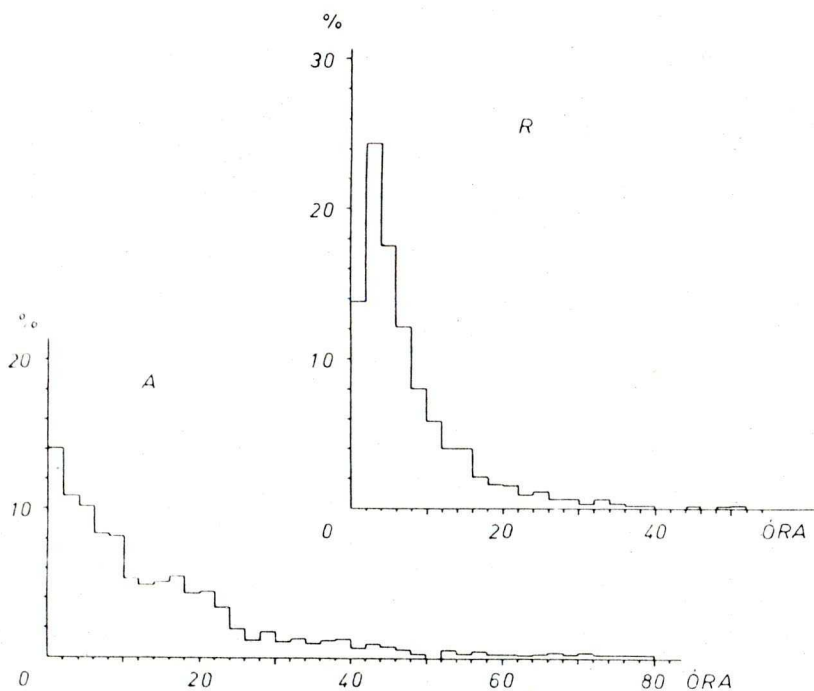
A nyáron mért aktivitási értékek nagymértékben eltérnek a tavasziaktól. Az aktív periódusok átlaghossza 40 %-kal lecsökkent. Ezt a csökkenést jól tükrözi az aktív és nyugalmi periódusok időtartam szerinti eloszlása /7. ábra/. A 4 óránál rövidebb ideig tartó aktív periódusok fordulnak elő a leggyakrabban, míg a legritkább a 10 óránál hosszabb időtartamu aktív periódusok megjelenése. Megemlítendő, hogy noha nagyon ritkán, de mégis előfordultak 30-80 óráig tartó aktív periódusok is. Ez eredményezte az átlaghossz értékek nagymértékű - mintegy 140 %-os - szórását /2. táblázat/.



7. ábra: Az aktív és nyugalmi periódusok időtartam szerinti megoszlása nyáron

A tavaszi értékhez viszonyítva ugyancsak lecsökkent a nyugalmi periódusok átlaghossza. A 6 óránál rövidebb periódusok száma 2-3-szorosára nőtt, míg a 10 óránál hosszabb periódusok száma erőteljesen csökkent és 35 óránál hosszabb ideig tartó nyugalmi periódusok egyáltalán nem fordulnak elő. A leggyakrabban előforduló nyugalmi periódusok átlaghossza gyakorlatilag megegyezik az összátlaghosszal. Az aktív és nyugalmi periódusok hosszának együttes csökkenése 100 %-osan növelte a periodicitás frekvenciáját /2./a táblázat/. Ugyanakkor az aktív és nyugalmi periódusok százalékos aránya 67 : 33 lett /1. táblázat/. Ősszel az aktív és nyugalmi periódusok aránya gyakorlatilag megegyező a

nyáron mért értékkel /1. táblázat/. Ezzel egyidejűleg mindkét periódus átlagos időtartama megnövekedett /2. táblázat/ amely természetesen magával hozta a periodicitás frekvenciájának lecsökkenését /2. táblázat/. Az aktív periódusok átlaghossza eléri a télen és tavasszal mért értékeket és a 2-6 óráig tartó aktív periódusok jelentek meg a leggyakrabban /8. ábra/.

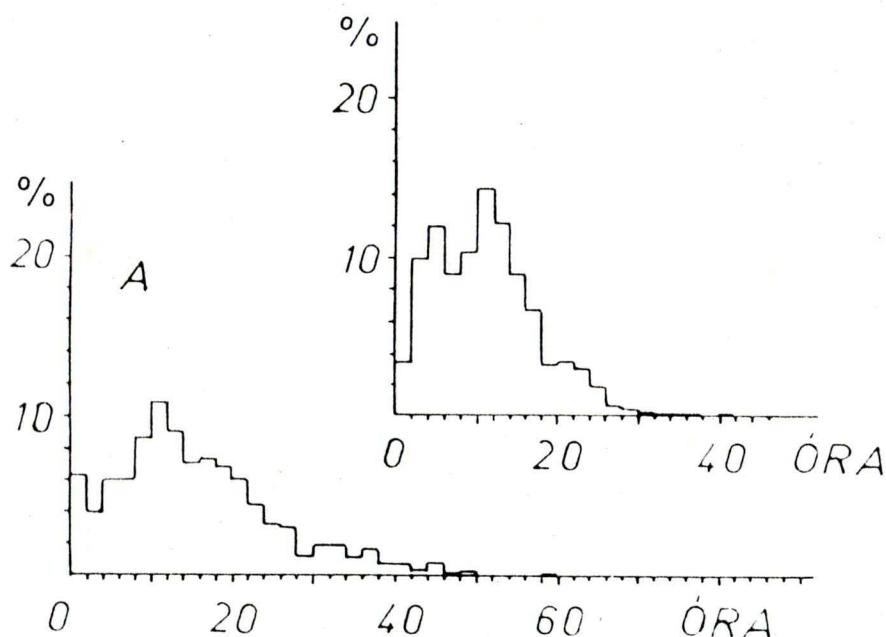


8. ábra: Az aktív és nyugalmi periódusok időtartam szerinti megoszlása ősszel

A nyárihoz viszonyítva a nyugalmi periódusok átlaghossza szintén nőtt, de ezek még mindig rövidebbek, mint a télen regisztrált értékek. A két óráig tartó rövid nyugalmi periódusok aránya kb. felére csökkent és megjelentek 30-50 óráig tartó nyugalmi periódusok is. A nyárihoz viszonyítva csökkent

a periodicitás frekvenciája, azonban ez az érték még mindig magasabb a télinél és a tavaszinál.

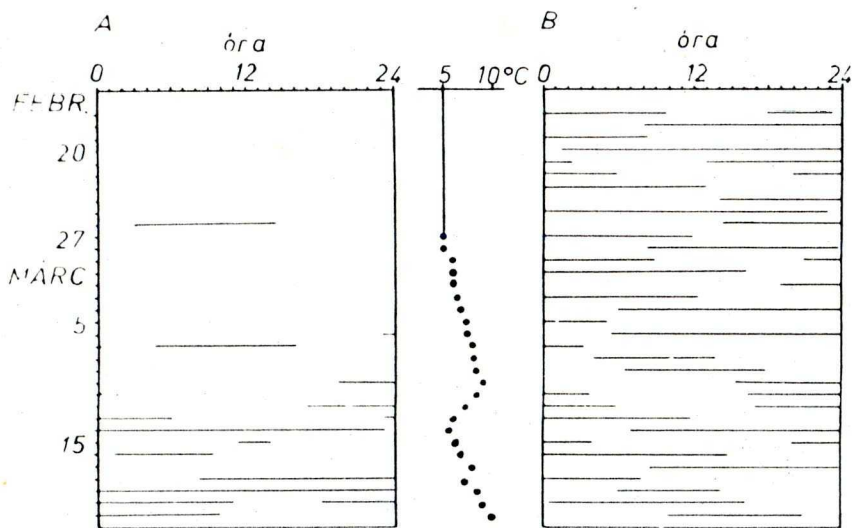
A téli időszakban mind az aktív, mind pedig a nyugalmi periódusok átlagos időtartama kisebb-nagyobb mértékben megnövekedett /2. táblázat/. Ebben az évszakban ritkán fordultak elő 50 óránál hosszabb periódusok és az értékek szórása is kevesebb. A leggyakrabban a 12-14 órás aktív és nyugalmi periódusok fordulnak elő /9. ábra/.



9. ábra: Az aktív és nyugalmi periódusok időtartam szerinti megoszlása télen

A periodicitás frekvenciája csökkenő tendenciát mutat és ezáltal közelít a tavaszi értékhez /2. táblázat/. Az aktív és nyugalmi periódusban eltöltött idő aránya 59 : 41, amely az őszi és a tavaszi adatok közé esik.

Az állatok téli aktivitása ettől eltérő volt, ha az állatok aktivitását nem laboratóriumi, hanem természetes körülmények között regisztráltuk. A jég alatt tartott állatok viselkedésére a rövid ideig tartó aktív és a néhány napig tartó nyugalmi periódus volt a jellemző. A jég olvadása után a vízhőmérséklet emelkedésével gyakoribbá váltak az aktív periódusok és ezek időtartama is megnövekedett /10. ábra/.



10. ábra: Télen jég alatt /A/ és laboratóriumi körülmények között élő /B/ állatok aktivitásának időgrafikonja. A középső kiégésítő az A ábrára vonatkozik és a víz hőmérsékletét mutatja.

A ganglion 5HT tartalmának szezonális változása

A kagylók idegrendszerének 5HT tartalma nyáron és ősszel csak csekély ingadozást mutatott. A legmagasabb volt a nyáron mért 5HT szint. A legkevesebb szerotonint a télen jég alatt tartott állatok ganglionjai tartalmazták. Ez mintegy 20 %-kal volt alacsonyabb a nyári legmagasabb szintnél. Azonban télen a laboratóriumi körülmények között a szerotoninszint alig mutatott különbséget a tavaszi, nyári és őszi értékekhez viszonyítva /3. táblázat/.

3. táblázat

A ganglionok szerotonintartalma

évszak	t C ⁰	kísérletek száma	ug/g _n S.D.	a mért min-max értékek
Tavaszi	8 - 15	16	38,4 _± 11,5	23 - 56,7
Nyár	12 - 25	23	42,2 _± 4,8	36 - 54,3
Ősz	10 - 18	20	38,2 _± 6,4	27 - 49,5
Tél	jég alatt	7	33,7 _± 3,8	28 - 38,0
Télen laboratóriumban	8 - 12	58	37,3 _± 6,5	23 - 50,3

2. A noradrenalin és dopamin aktivitásfüggő változása

Az aktív periódus kezdetét követő 15. percben mért dopamin- és noradrenalin szint szignifikánsan különbözött a nyugalmi

periódus kezdete utáni 15. percben mért értéktől /4. táblázat/.

4. táblázat

DA és NA szint eltérése az aktív és nyugalmi periódusok kezdetén

	kísérletek száma	aktív periódusok kezdete ug/g nedves súly	nyugalmi kezdete ug/g nedves súly	szignifikancia
NA	10	0,896 ± 0,081	0,714 ± 0,074	P < 0,001
DA	9	25,400 ± 2,050	19,150 ± 2,170	P < 0,01

A táblázatból leolvasható, hogy a cerebrális és viscerális ganglionban mért dopamin- és noradrenalin szint különbözött az aktív és nyugalmi periódusok kezdetén. Mindkét katecholamin az aktív periódusok kezdetén nagyobb mennyiségben volt jelen a cerebrális és viscerális ganglionokban, mint a nyugalmi periódusok megfelelő időpontjában. A dopamin mennyisége az aktív periódus kezdetén 25,4 ug/g, nyugalmi periódus kezdetén pedig 19,15 ug/g volt. Ugyanezen időpontokban meghatározott noradrenalin mennyisége 0,896 ug/g ill. 0,714 ug/g volt. Mindkét eredmény szignifikáns, ugyanakkor a pedális ganglionban a különböző aktivitású periódus kezdetén mért dopamin- és noradrenalin szint között nem volt szignifikáns különbség.

3. MAO-gátlók hatása az aktivitásra és a monoaminszintre

A kagylók MAO-gátlókkal történt kezelése nem változtatta meg szignifikánsan a központi idegrendszer szerotoninszintjét /5. táblázat/.

5. táblázat

MAO-gátlószer hatása a ganglionáris szerotoninszintre. Az eredmények a kontroll %-ában kifejezve

MAO-gátlószer	kezelés utáni idő /nap/			
	1	2	4	7
Actomol	104,3	109,4	109,9	-
Paragylin	114,2	106,9	104,9	104,9
Nialamid	94,7	117,9	105,1	99,2
Iproniazid	106,3	116,2	105,0	115,8
Tranilcipromin	93,4	109,3	89,0	94,7

A kezelés után kapott értékek azt mutatják, a szintnövekedés maximuma is alig éri el a 18 %-ot, a tranilcipromin pedig egyenesen csökkentette a szerotoninszintet.

Hasonlóan a szerotoninhoz, a központi idegrendszer dopamin- és noradrenalin szintje sem változott meg szignifikánsan a kezelést követően, azonban kismértékben eltérően hatott a kezelés a dopamin- és noradrenalin szintre /6.,7. táblázat/.

6. táblázat

MAO-gátlószerrek hatása a ganglionáris DA szintre
DA-szint a kontroll %-ában kifejezve

MAO-gátlószerrek	kezelés utáni idő /nap/		
	1	2	4
Actomol	97,3	89,1	80,9
Pargylin	82,8	91,3	114,7
Nialamid	105,9	106,9	103,4
Iproniazid	110,2	122,2	89,9
Tranilcipromin	86,8	98,0	90,5

7. táblázat

MAO-gátlószerrek hatása a ganglionáris NA-szintre
NA-szint a kontroll %-ában kifejezve

MAO-gátlószerrek	kezelés utáni idő /nap/		
	1	2	4
Actomol	103,2	103,5	96,7
Pargylin	108,4	110,9	119,7
Nialamid	96,8	123,7	121,0
Iproniazid	108,0	112,4	107,1
Tranilcipromin	89,7	133,3	99,7

A gátlószeres általában megnövelték a noradrenalin szintjét. A nialamid, az iproniazid megnövelte, míg a többi gátlószer csökkentette a dopamin szintjét, azonban a változások nem voltak nagyobbak 25 %-nál.

Annak ellenére, hogy a MAO-gátlók csak kismértékben hatottak a monoaminszintre, az aktivitást jelentősen befolyásolták. Jelentős változást okoztak a periódusok átlaghosszában és az aktivitás periodicitásában. Valamennyi felhasznált gátlószer csökkentette az aktív periódusok átlaghosszát /8. táblázat/.

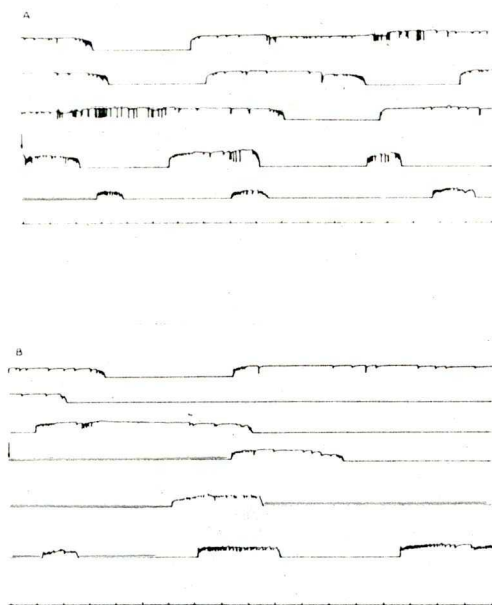
8. táblázat

MAO-gátlószeres hatása az aktív és nyugalmi
periódusok átlaghosszára

MAO-gátlószeres	aktív p e r i ó d u s o k /a kontroll %-ában/	nyugalmi
Actomol	- 69,5	- 11,1
Pargylin	- 50,0	+ 68,7
Nialamid	- 28,0	- 32,8
Iproniazid	- 17,4	+ 17,4
Tranilcipromin	- 44,4	- 12,3

A legnagyobb csökkenést az actomol, míg a legkisebbet az iproniazid okozta. A nyugalmi periódusok átlaghosszát a pargylin

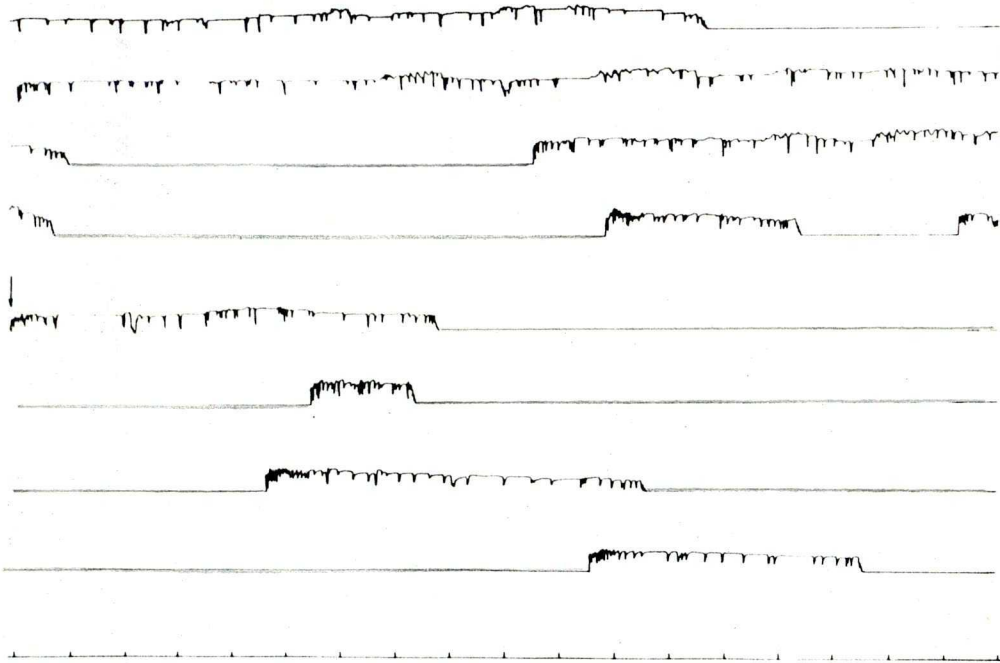
és iproniazid megnövelte, míg az actomol, nialamid és tranilcipromin lecsökkentette. Csak a pargylin és a nialamid okoztak a nyugalmi periódusok átlaghosszának 20 %-ánál nagyobb változást. A nialamid és iproniazid bizonyult a legkevésbé hatásosnak. Actomol esetében a hatás függött a kezelést megelőző aktivitási állapottól. Az aktív periódusok időtartama, függetlenül a kezelést megelőző aktív periódusok hosszától, minden esetben csökkent /11. ábra/.



11. ábra: Az actomol hatása a periodikus aktivitásra
A - a kezelést megelőzően hosszú aktív és rövid nyugalmi periódusok
B - a kezelést megelőzően rövidebb aktív és hosszabb nyugalmi periódusok

Ezzel szemben a nyugalmi periódusok hossza csak olyan állapot esetében csökkent, amelyeknél a kezelést megelőzően a rövid

aktiv és hosszú nyugalmi periódusok domináltak /11. b. ábra/.
Ha a kontroll állatok aktivitását a tartós aktiv és rövid nyugalmi periódusok jellemezték, akkor az actamol nem csökkentette a nyugalmi periódusok átlaghosszát. Pargylin hatására a kezelést megelőző aktivitástól függetlenül csökkent az aktiv periódusok időtartama és megnövekedett a nyugalmi periódusoké /12. ábra/.



12. ábra: A pargylin hatása Anodonta periodikus aktivitására

A tranilcipromin hatása kétfázisúnak bizonyult. Rögtön a kezelést követően egy, vagy két hosszú ideig tartó aktiv periódus volt a jellemző és ezen periódusok alatt a ritmikus kontrakciók száma megnövekedett. Ez a szerotonin hatására

emlékeztet. A hosszú ideig tartó aktív periódus után a rövid aktív és nyugalmi periódusok váltakozása volt a jellemző. Az aktív és nyugalmi periódusok átlaghosszának változásával párhuzamosan megváltozott a frekvencia is /9. táblázat/.

9. táblázat

A periodicitás frekvenciájának változása MAO-gátlókkal történt kezelés után

MAO-gátlószer	A periodicitás frekvenciája kezelés előtt	kezelés után	Változás %
Actomol	1,17	2,23	91
Pargylin	1,26	1,59	26
Nialamid	1,66	2,27	37
Iproniazid	1,44	1,56	8
Tranilcipromin	1,14	1,89	66

Az actomol és tranilcipromin mind nyugalmi és mind az aktív periódusok időtartamát csökkentette és így a periodicitás frekvenciája jelentős mértékben megnövekedett. A pargylin és az iproniazid az aktív és nyugalmi periódusok időtartamát ellentétesen változtatta meg, következésképpen a periodicitás frekvenciája alig változott. A nialamid kivételével valamennyi MAO-gátló lecsökkentette 10-20 %-kal az aktív állapotban eltöltött idő arányát /10. táblázat/.

10. táblázat

Az aktív állapotban eltöltött idő százalékos aránya
MAO-gátlókkal történt kezelés után

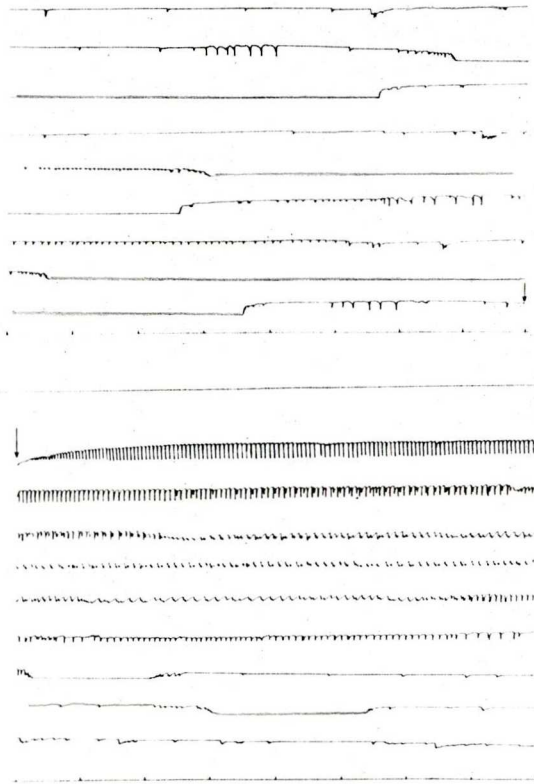
MAO-gátlószer	Az aktív idő százalékos aránya		
	kezelés előtt	kezelés után	csökkenés %
Actomol	63,4	52,3	17,5
Pargylin	77,8	58,4	24,9
Nialamid	68,6	68,4	0,3
Iproniazid	73,5	65,7	10,6
Tranilcipromin	69,5	58,2	16,2

A farmakológiai kezelések következtében az állatok 15-20 %-a elpusztult. A gátlószer magasabb koncentrációja, olyan mint 5×10^{-4} M, nem használható, mivel actomolos és pargylinos kezelés esetében ilyen koncentráció mellett az állatok 50 %-a elpusztult.

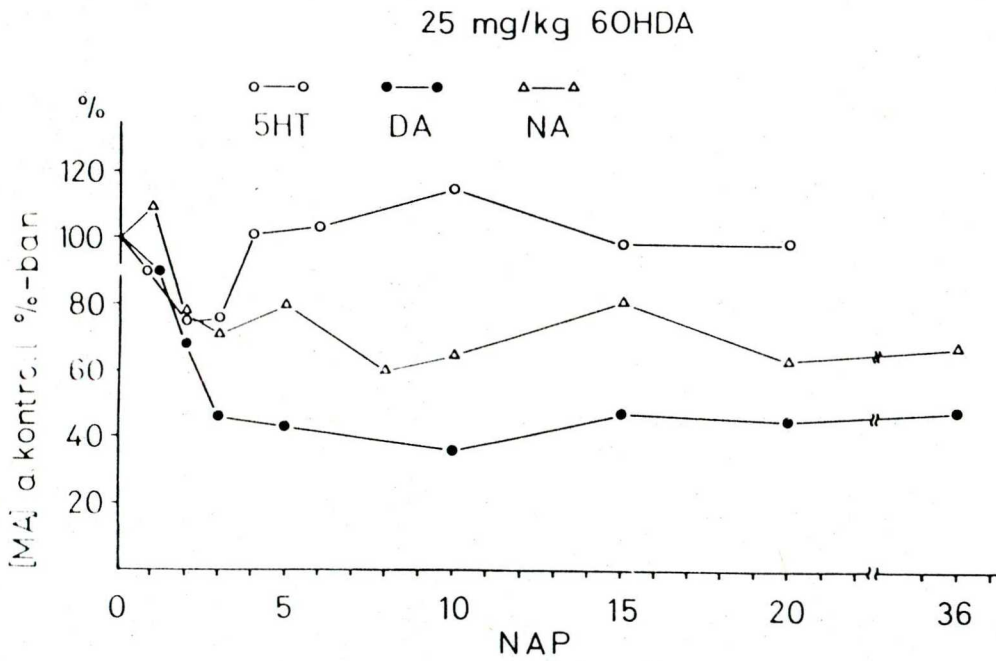
4. 6OHDA hatása Anodonta cygnea monoaminszintjére és az aktivitásra

25 mg/kg dózis hatása a MA szintre

25 mg/kg 6OHDA-nal történt kezelést követő 2. és 3. napon az állatok szerotoninszintjében 25 %-os csökkenés következik be, mely a 4. napon helyreállítódik és a kontroll szintjén marad a vizsgált periódusban /14. ábra/.



13. ábra: A periodikus aktivitás alakulása 6OHDA kezelés hatására /A/ aktivitás a kezelés előtt, /B/ aktivitás a kezelés után.

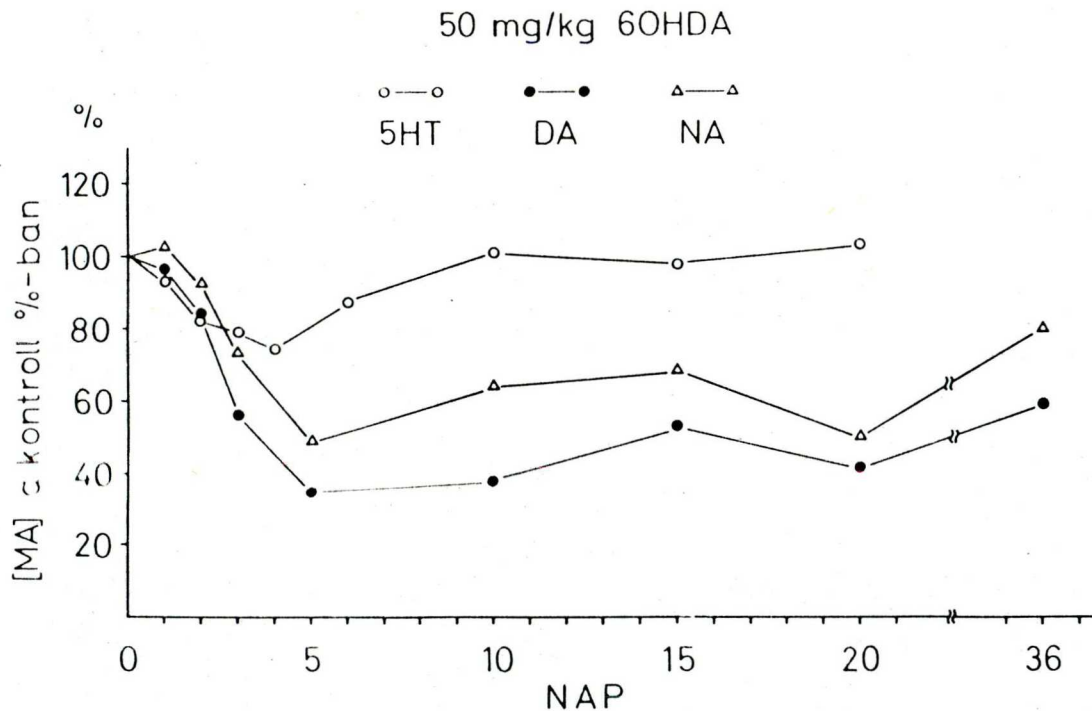


14. ábra: 25 mg/kg dózisu 6OHDA hatása a monoamin-szintre.

A dopaminszint lényeges csökkenése a 2. napon következik be és a 10. napon mutat maximális, 64 %-os csökkenést. A vizsgált 36 napos periódusban a dopaminszint a kontroll érték 50 %-os szintjén marad és nem történik helyreállítódás. A noradrenalinszint csökkenése hasonló a DA szint csökkenéséhez, de csak kisebb mértékű. Jelentős csökkenés a 2. napon következik be, a maximális csökkenés 40 %-os és nem történik helyreállítódás 36 napon át /14. ábra/.

50 mg/kg dózis hatása a MA szintre

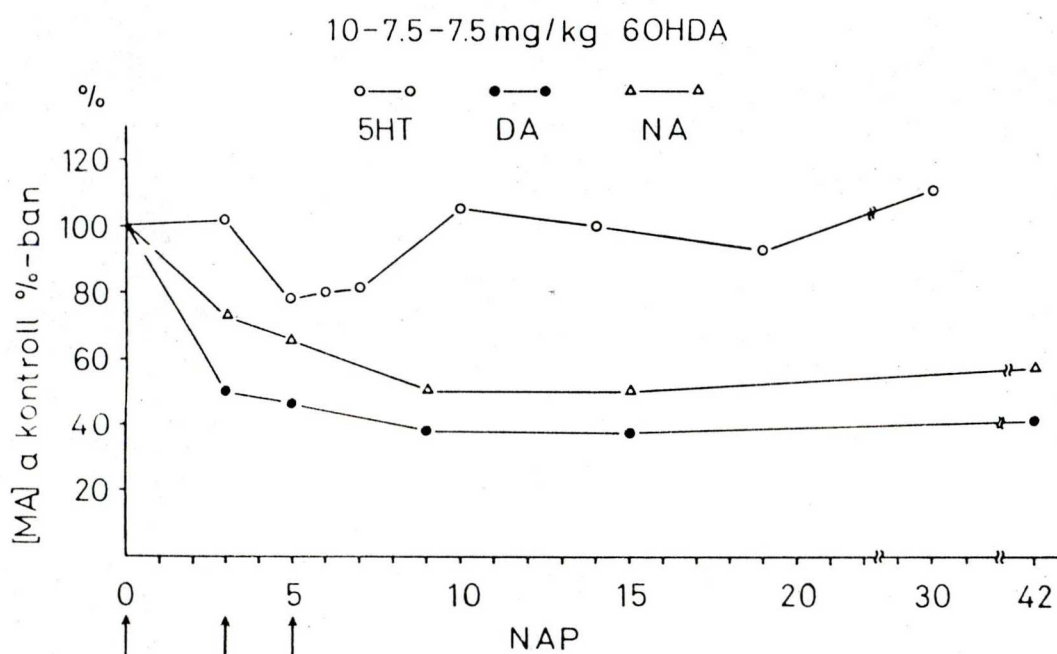
50 mg/kg dózisu 6OHDA kezelés hatására a monoaminszint csökken, a csökkenés mértéke azonban nem nagyobb, mint a 25 mg/kg dózis esetében /15. ábra/.



15. ábra: 50 mg/kg dózisu 6OHDA hatása a monoaminszintre

7,5 - 7,5 - 10 mg/kg dózis hatása a MA szintre

A hatás lényegében nem tér el számottevően az előbbi két dózistól, ha csak nem abban, hogy a 40. nap után mért DA és NA szint itt éri el a minimumot az előző két dózishoz viszonyítva /16. ábra/.



16. ábra: 7,5 - 7,5 - 10 mg/kg 6OHDA hatása a monoaminszintre

6OHDA hatása az aktivitásra

25 mg/kg-os dózis lábba történő injektálása azonnal feltűnő jelenséget okozott a kagyló periodikus aktivitásában /13.

ábra/. A kezelést követően a kagyló azonnal gyors, ritmikus mozgásba kezdett és 48 órán keresztül állandó aktív állapotban maradt. 2 nap eltelte után is az aktív periódusok tulsulya

volt a jellemző, majd a kísérleti alanyok egy része elpusztult.

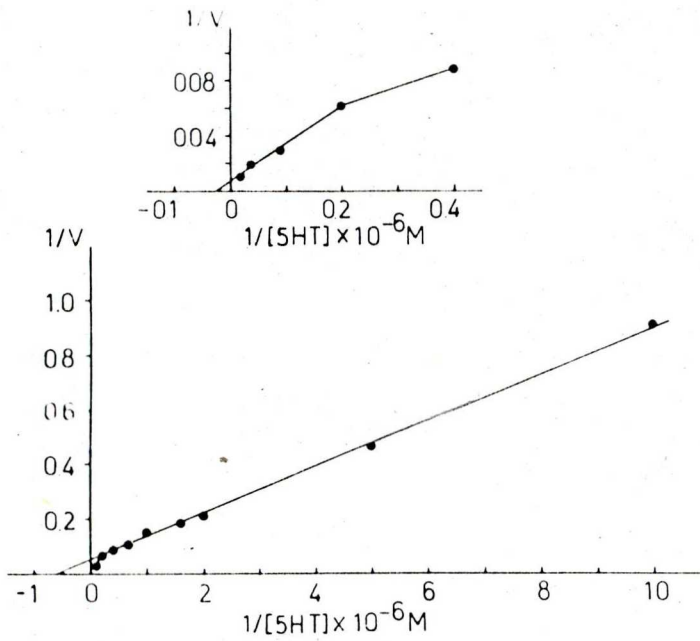
5. Monoaminok beépülése Anodonta pedális ganglionjába

Vizsgálataink szerint a ^{14}C -jelzett szerotonint, dopamint és noradrenalinat a tavikagyló pedális ganglionja felveszi az inkubációs folyadékból. Az akkumuláció legalább 30 percig lineáris mindhárom monoamin esetén, így az inkubációt 30 percig végeztük. $0,1 \mu\text{M}$ aminkoncentráció mellett mért szövet-medium arány közel azonos mindhárom monoaminra és a szerotoninra $11,08$ -nak, a dopaminra $11,62$ -nek, míg a noradrenalinra $10,4$ -nek adódott. A kinetikai vizsgálatok során a szövet-medium arányt $0,1 - 100 \mu\text{M}$ aminkoncentráció mellett vizsgáltuk. Növelve az amin koncentrációját az inkubációs elegyben a szövet-medium aránya csökken mindhárom monoamin esetén /11. táblázat/, amely arra utal, hogy az aminakkumuláció egy telítéletes folyamat. A kinetikai paraméterek analizéséhez a szövet-medium arányából számított akkumuláció sebesség reciprok értékét ábrázoltuk a medium aminkoncentráció reciprok értékének függvényében és megszerkesztettük a Lineweaver-Burk egyenest. A pontokat azonban nem lehet egyetlen egyenessel összekötni, hanem csak két egyenessel /17-19. ábrák/. Ez arra utal, hogy mindhárom monoamin esetén az akkumuláció két eltérő affinitású folyamat közreműködésével történik.

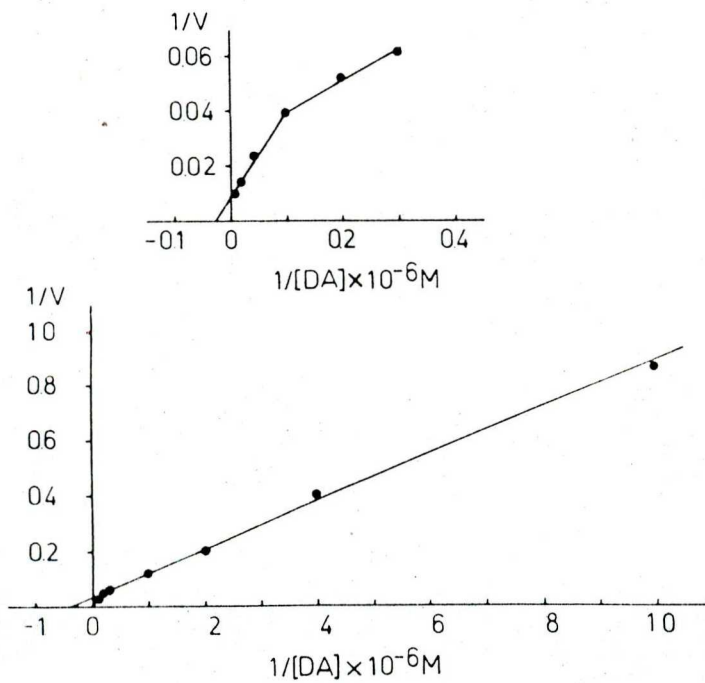
11. táblázat

Szövet-medium arány alakulása az inkubációs elegy
aminkoncentrációjának változásával

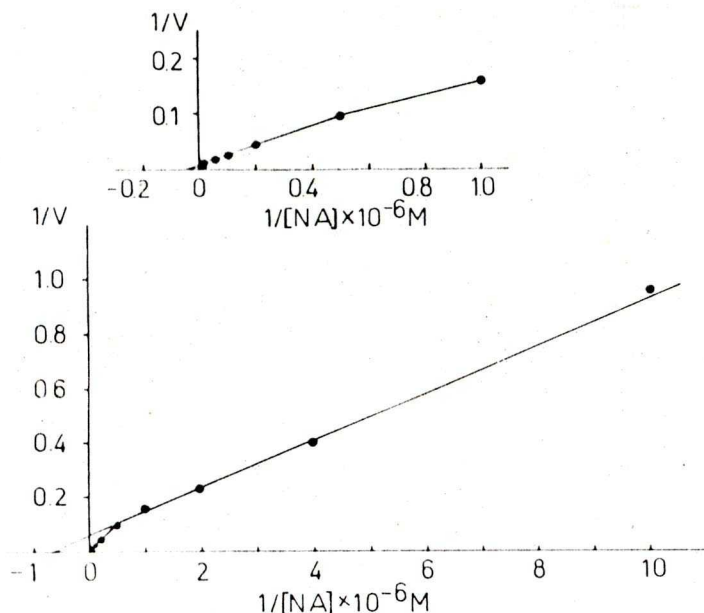
aminkoncent- ráció / μ M/	s z ö v e t - m e d i u m		h á n y a d o s NA
	5HT	DA	
0,10	11,80	11,62	10,40
0,20	10,65	-	-
0,25	-	9,85	9,93
0,50	9,38	9,68	8,65
0,63	8,42	-	-
1,00	7,08	8,39	6,28
1,45	6,57	-	-
2,00	-	-	5,20
2,45	4,65	-	-
3,30	-	4,87	-
5,00	3,21	3,88	4,50
10,00	-	2,54	4,02
12,00	2,91	-	-
20,00	-	-	2,56
25,00	-	1,68	-
28,00	1,91	-	-
50,00	-	1,47	1,94
56,60	1,52	-	-
100,00	-	1,04	-



17. ábra: A szerotonin akkumuláció reciprok értékének változása a pedális ganglionban a koncentráció reciprok értékének függvényében



18. ábra: A DA akkumuláció reciprok értékének változása a pedális ganglionban a koncentráció reciprok értékének függvényében



19. ábra: A NA akkumuláció reciprok értékének változása a pedális ganglionban a koncentráció reciprok értékének függvényében

A két akkumulációs folyamat paramétereit a K_m és a V_{max} értékeket grafikusán meghatároztuk és a 12. táblázatban tüntettük fel. A nagyobb affinitású rendszer /felvétel₁/ paramétereit K_{m_1} és V_{max_1} , alacsony affinitású rendszer /felvétel₂/ paramétereit K_{m_2} és V_{max_2} szimbólumokkal jelöltük. A magas affinitású rendszer affinitási konstansai között alig mutatkozik különbség a három amin esetén. A beépülés maximális sebessége szerotonin és noradrenalin esetén közel azonos, míg a dopaminé 50-80 %-kal magasabb. Az alacsony affinitású rendszer affinitási konstansa, K_{m_2} , egy nagyságrenddel nagyobb, mint a K_{m_1} és legalacsonyabb a NA-ra, míg legmagasabb a 5HT-ra.

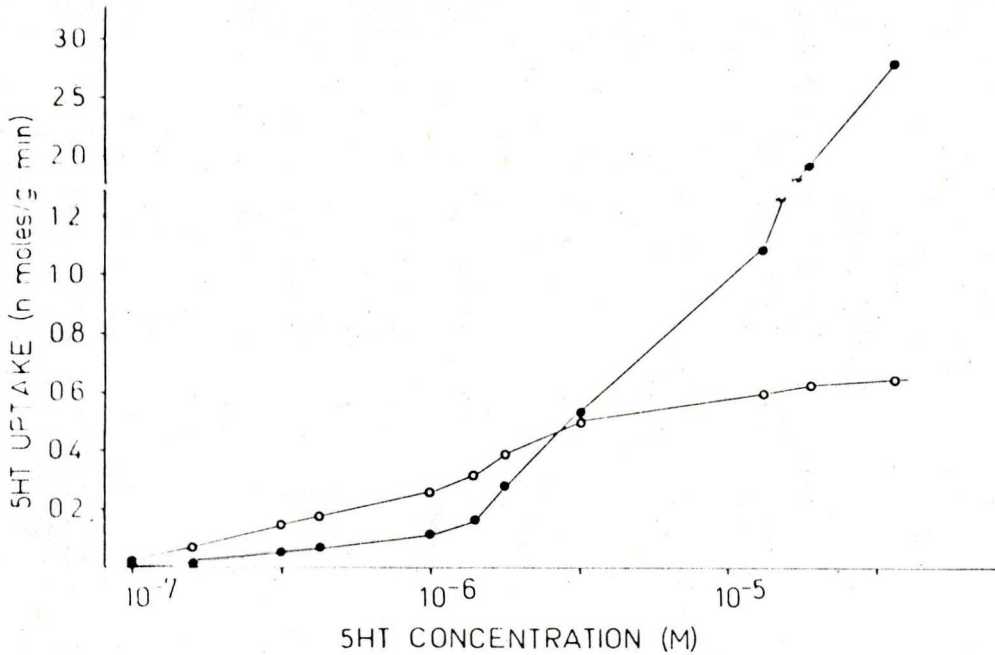
12. táblázat

^{14}C -5HT, ^{14}C -DA és ^{14}C -NA akkumuláció

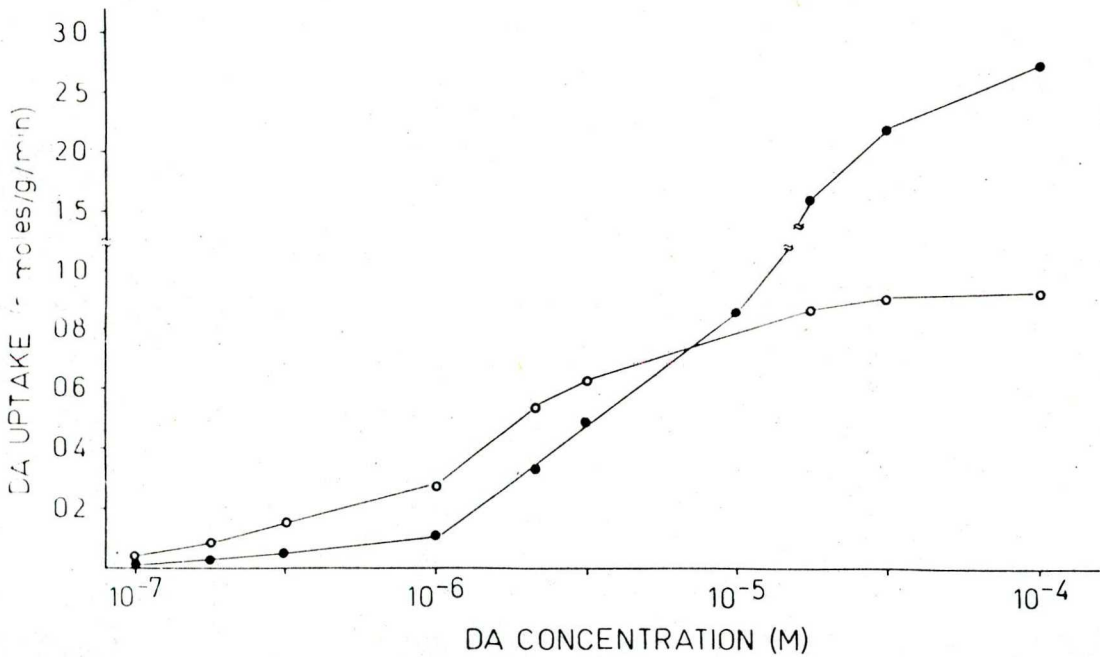
kinetikai konstansai

Monoaminok	K_m értékek		V_{max} értékek	
	felvétel ₁	felvétel ₂	felvétel ₁	felvétel ₂
	Mol		Mol	
5HT	$1,66 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-5}$	0,66	4,74
DA	$2,50 \times 10^{-6}$	$3,33 \times 10^{-5}$	0,95	3,70
NA	$1,33 \times 10^{-6}$	$1,66 \times 10^{-6}$	0,555	3,33

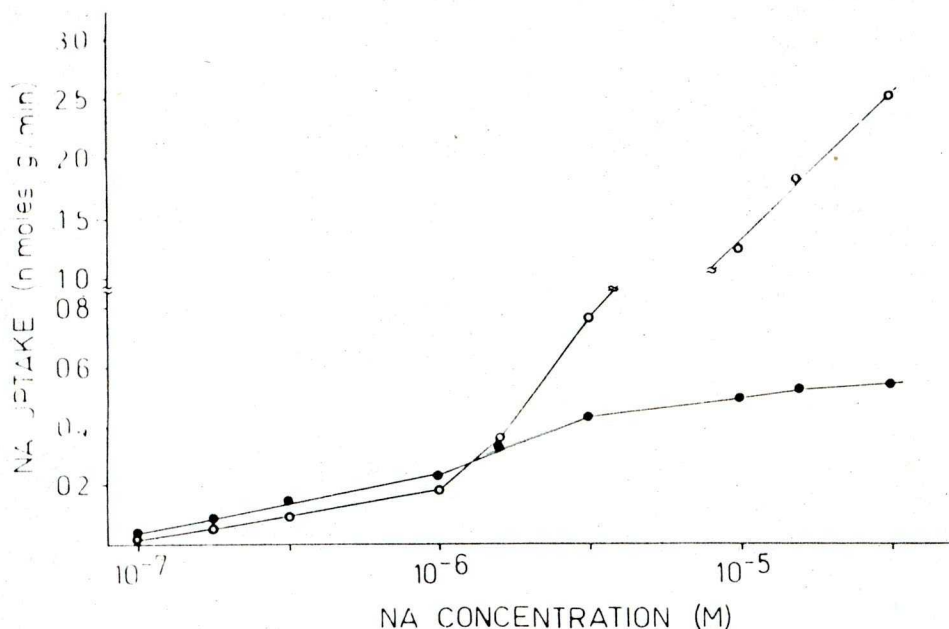
A V_{max_2} értékek a NA és a DA esetén közel azonosak, míg a 5HT-ra az 40 %-kal nagyobb. A Michaelis-Menton egyenlet segítségével kiszámítottuk, hogy a felvétel₁ és a felvétel₂ folyamatok milyen mértékben járulnak hozzá a totál aminakkumulációhoz /20-22. ábrák/. Alacsony aminkoncentrációnál szerotonin esetén 10^{-7} és 10^{-6} M között az uptake₁ sebessége 2-3-szor nagyobb az uptake₂ sebességénél, 5×10^{-6} M-nál a két sebesség számértéke közel azonos, míg nagyobb koncentrációnál az uptake₂ sebessége gyorsan nő, a felvétel₁ sebessége pedig határértékhez közelít. 5×10^{-5} M-nál a felvétel₂ sebessége 4-szer nagyobb a felvétel₁ sebességénél /20. ábra/.



20. ábra: Az 5HT akkumuláció sebességének változása pedális ganglionban a koncentráció függvényében a felvétel₁ és felvétel₂ folyamatok során



21. ábra: A DA akkumuláció sebességének változása pedális ganglionban a koncentráció függvényében a felvétel₁ és felvétel₂ folyamatok során

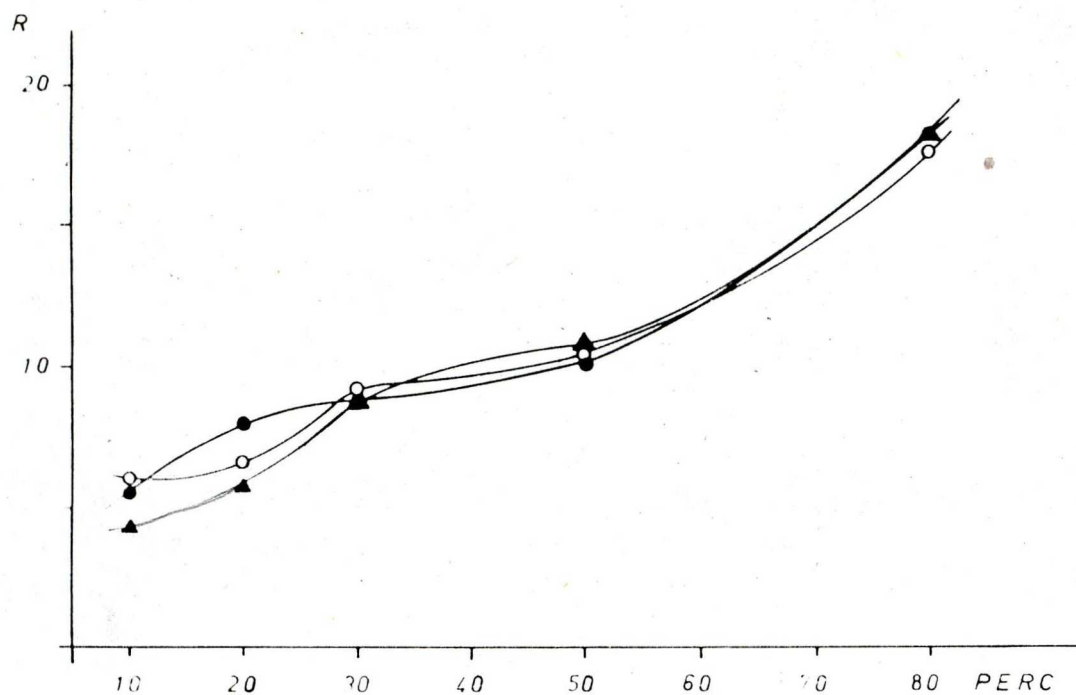


22. ábra: A NA akkumuláció sebességének változása a pedális ganglionban a koncentráció függvényében a felvétel₁ és felvétel₂ folyamatok során

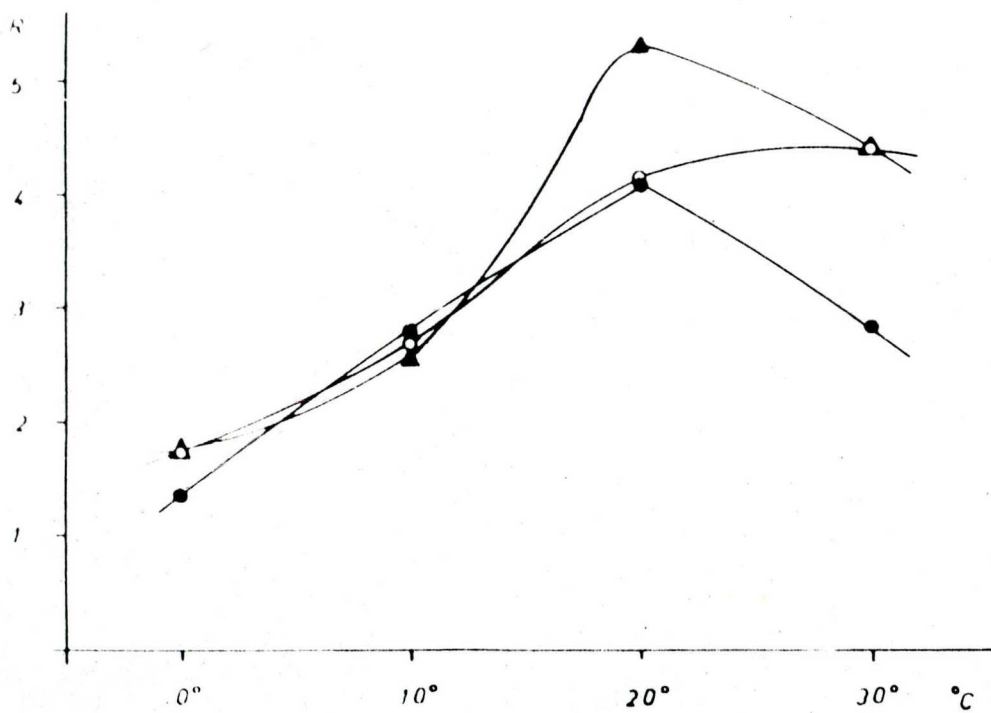
Dopamin esetén a felvétel₁ sebessége 10^{-7} - 8×10^{-6} M koncentrációtartományban nagyobb a felvétel₂ sebességénél, majd 10^{-5} M-tól a felvétel₂ sebessége nagyobb /21. ábra/. Noradrenalin esetében a felvétel₁ sebessége nagyobb a felvétel₂ sebességénél a 10^{-7} - 10^{-6} M koncentrációtartományban, a különbség azonban lényegesen kisebb, mint a 5HT és a DA esetén. A két sebesség számértéke közel azonos mértékben nő 10^{-6} M-ig, majd e koncentrációtól kezdve a felvétel₂ sebessége jelentősen meghaladja a felvétel₁ sebességét és e folyamat nagyobb mértékben járul hozzá a totál akkumulációhoz /22. ábra/.

A szerotoninbeépülés kinetikai vizsgálatának eredményei.

Az elvégzett kísérletek igazolták, hogy Anodonta cygnea mindhárom gangliontípusa közel hasonló módon akumulálja a radioaktív szerotonint. A szerotoninbeépülés az idő, valamint a hőmérséklet függvényében a következőképpen alakult: mindhárom ganglion esetében mért időtartam /80 perc/ folyamán csaknem lineárisan növekedett a felvétel /23. ábra/. Hőmérséklet hatására /20 C^o-ig/ szintén egyenletesen növekszik a felvétel. 30 C^o-on csak a pedális ganglionban történő felvétel növekszik, míg a cerebrális és viscerális ganglionban jelentős visszaesés következik be /24. ábra/. Az amin koncentrációt növeljük az inkubációs elegyben, akkor a szövet-medium aránya csökken mindhárom ganglion esetében /13. táblázat/. A kinetikai paraméterek meghatározását a korábbihoz hasonlóan Lineweaver-Burk módszerével végeztük el. Ennek alapján megállapítható, hogy mindhárom ganglion esetében az akkumuláció két eltérő affinitású - a felvétel₁ és felvétel₂ - folyamat révén történik /25.-27. ábrák/. A K_m értékek mind a felvétel₁ mind pedig a felvétel₂ rendszer esetében mindhárom ganglion nagyságrendben azonos tartományba esik, azonban különbségek is adódnak, a 3 gangliontípus K_m értékei között. Az alacsony koncentrációtartományban a cerebrális ganglion K_{m1} értéke a legmagasabb /2 x 10⁻⁶ M/, míg a pedális ill. a viscerális ganglion közel megegyező értékű /0,74 x 10⁻⁶ M, 0,70 x 10⁻⁶ M/.



23. ábra: A ^3H -5HT felvétele az idő függvényében

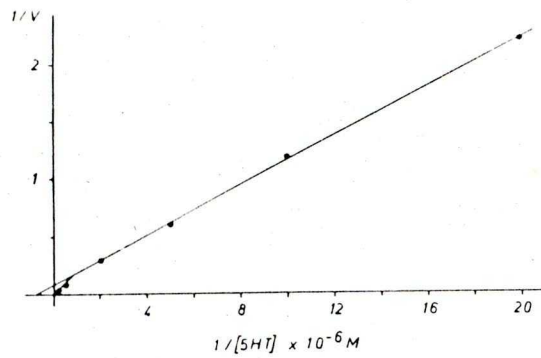
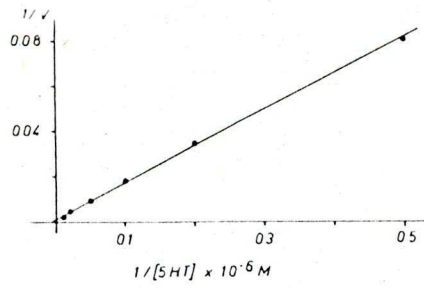


24. ábra: A ^3H -5HT felvétele hőmérséklet hatására

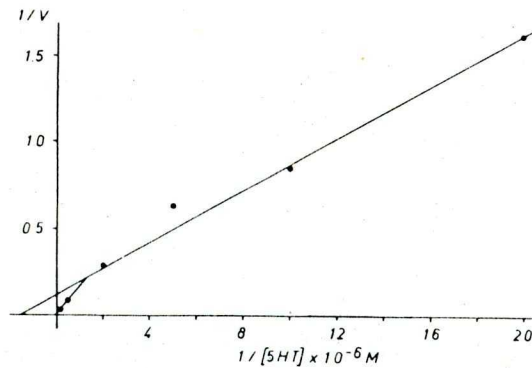
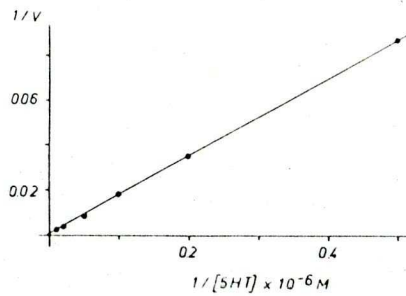
13. táblázat

A szövet/medium arány alakulása cerebrális, pedális és viscerális ganglionban az inkubációs elegy 5HT-tartalmának változásával

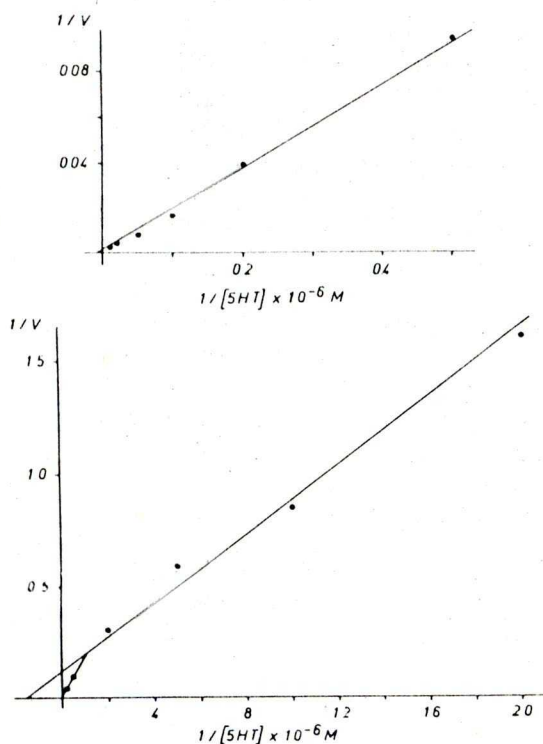
5HT koncent- ráció /mmol/	s z ö v e t / m e d i u m cerebrális g a n g l i o n o k	h á n y a d o s pedális viscerális	h á n y a d o s viscerális
0,02	15,67	19,52	19,89
0,05	9,02	12,32	12,52
0,1	8,46	11,68	11,78
0,2	8,33	7,84	8,44
0,5	6,96	7,05	6,57
2,0	6,18	5,74	5,31
5,0	5,78	5,49	5,04
10,0	5,55	5,64	5,72
20,0	5,18	5,85	6,19
50,0	3,83	4,84	4,56
100,0	3,90	3,98	4,22



25. ábra: A szerotoninakkumuláció reciprok értékének alakulása a koncentráció reciprok értékének függvényében cerebrális ganglionban



26. ábra: A szerotonin akkumuláció reciprok értékének alakulása a koncentráció reciprok értékének függvényében pedális ganglionban



27. ábra: A szerotonin akkumuláció reciprok értékének alakulása a koncentráció reciprok értékének függvényében viscerális ganglionban

A magas koncentrációtartományban a K_{m_2} értékek már eltérő sorrendet mutatnak, ugyanis a legmagasabb a pedális $/20 \times 10^{-5} \text{ M}/$, a legkisebb a cerebrális ganglion esetében $/8,7 \times 10^{-5} \text{ M}/$. A viscerális ganglion K_{m_2} értéke $16,6 \times 10^{-5} \text{ M}$. A V_{\max} értékek alakulása hasonló a K_m értékekhez /14. táblázat/. Alacsony koncentrációtartományban a cerebrális ganglion V_{\max} értéke $/0,61 \text{ mumol/g/perc}/$ kb. kétszerese a viscerális $/0,30 \text{ mumol/g/perc}/$ és a pedális ganglionban $/0,32 \text{ mumol/g/perc}/$ meghatározott értékeknek, felvétel₂ rendszer esetében viszont a pedális és viscerális ganglionok V_{\max_2} értékei $/57,04$ ill. $31,7 \text{ mumol/g/perc}/$ közel kétszer nagyobbak, mint a cerebrális ganglionban $/8,51 \text{ mumol/g/perc}/$.

14. táblázat

³H-5HT cerebrális, pedális és viscerális ganglionba történő akkumulációjának kinetikai konstansai

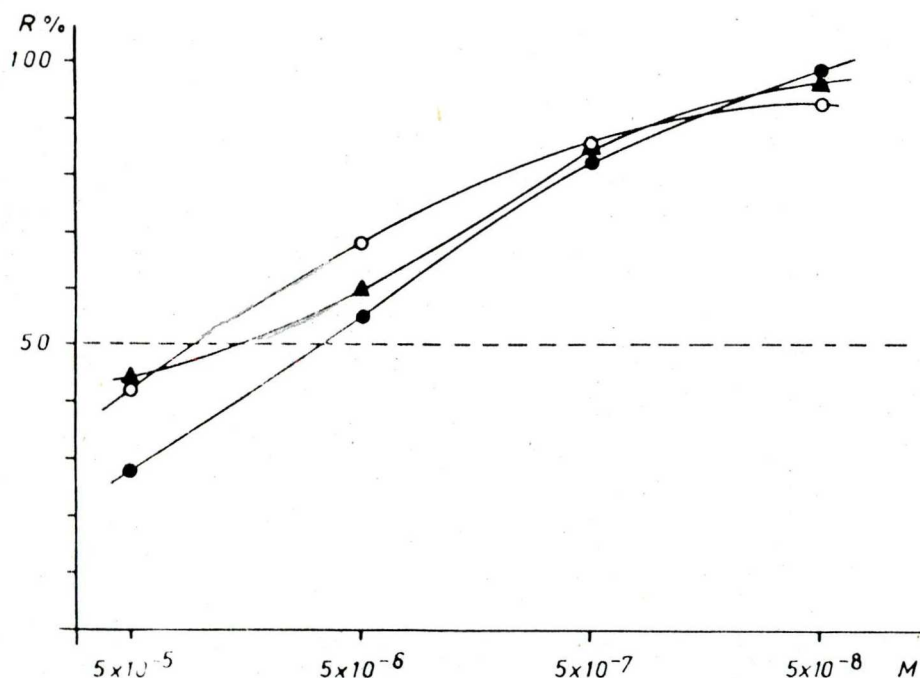
Ganglionok	K _m értékek		V _{max} értékek	
	felvétel ₁	felvétel ₂	felvétel ₁	felvétel ₂
	Mól		mumol/g/perc	
Cerebrális	2,0 x 10 ⁻⁶	8,7 x 10 ⁻⁵	0,61	18,52
Pedális	0,74x 10 ⁻⁶	20,0 x 10 ⁻⁵	0,32	37,04
Viscerális	0,7 x 10 ⁻⁶	16,6 x 10 ⁻⁵	0,30	31,70

Ismeretes, hogy kagylókban a dopamin és noradrenalin is neurotranszmitterként funkcionálnak, valamint az a tény, hogy a reserpin és a tetrabenazin monoaminüritő hatással bír, az ouabain pedig gátolja többek között az aktiv transzportban szerepet játszó Na-K ATP-áz rendszer működését, ezért vizsgáltuk ezen anyagok hatását a szerotonin felvételére úgy, hogy meghatároztuk az I₅₀ értékeket /28-32. ábrák, 15. táblázat/. Ennek alapján eredményeink a következők. A dopamin minden esetben egy nagyságrenddel kisebb koncentrációtartományban már 50 %-os gátlást okoz a noradrenalinhoz viszonyítva. Ezen belül gangliontípustól függően is megfigyelhetünk egy érdekes nagyságrendi sorrendet.

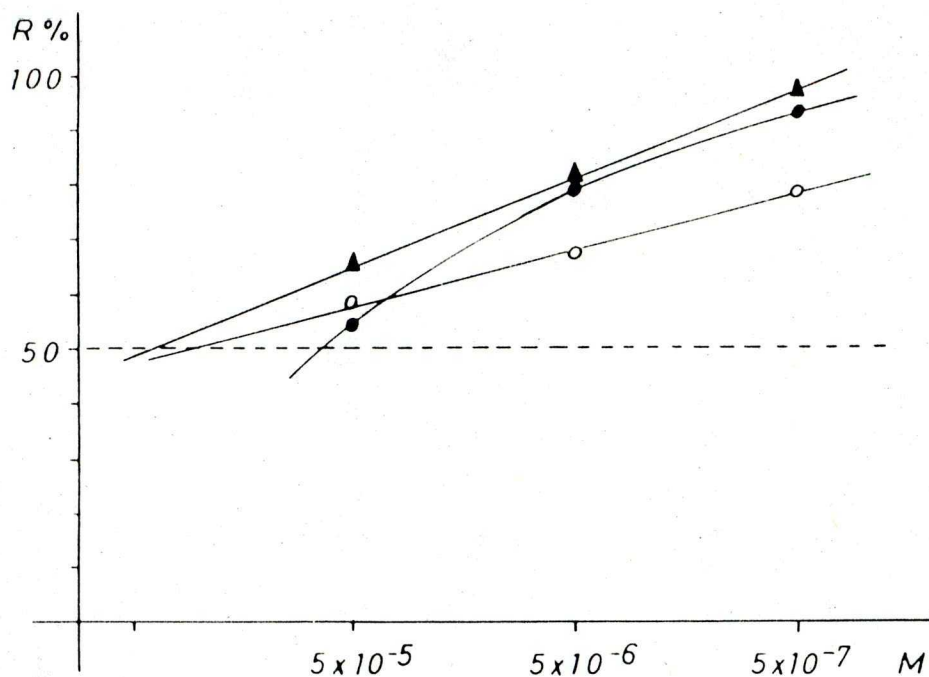
15. táblázat

Farmakonok in vitro gátló hatása cerebrális, pedális és viscerális ganglionok ^3H -5HT felvételére. I_{50} értékek

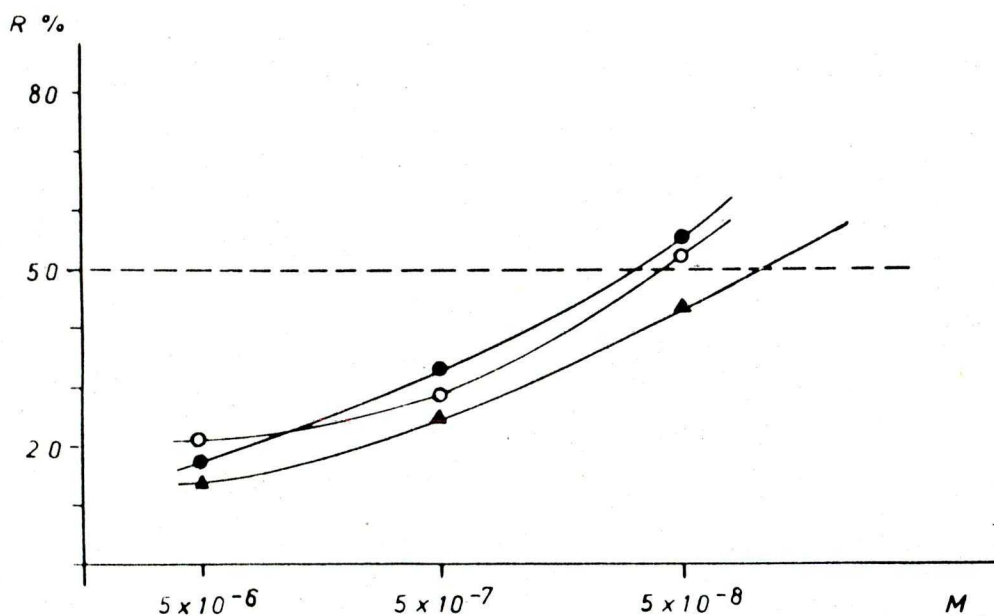
Farmakon	cerebrális koncentráció / Mól /	pedális ganglionok koncentráció / Mól /	viscerális
Dopamin	$7,0 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-5}$	10^{-5}
Noradrenalin	$6,45 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$
Reserpin	$6,5 \times 10^{-8}$	$5,5 \times 10^{-8}$	$2,75 \times 10^{-8}$
Ouabain	$3,25 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-4}$
Tetrabenazin	$4,5 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-5}$	$3,25 \times 10^{-5}$



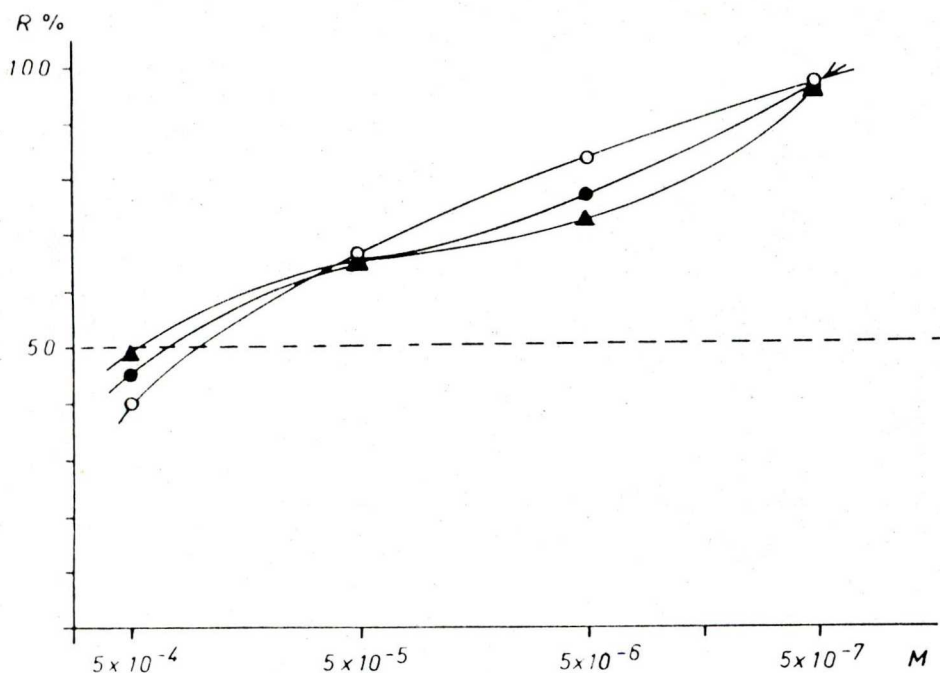
28. ábra: DA in vitro gátló hatása cerebrális, pedális és viscerális ganglionok ^3H -5HT felvételére
 - - - - - cerebrális ggl.; o-o-o-o pedális ggl.,
 ▲-▲-▲- viscerális ggl.



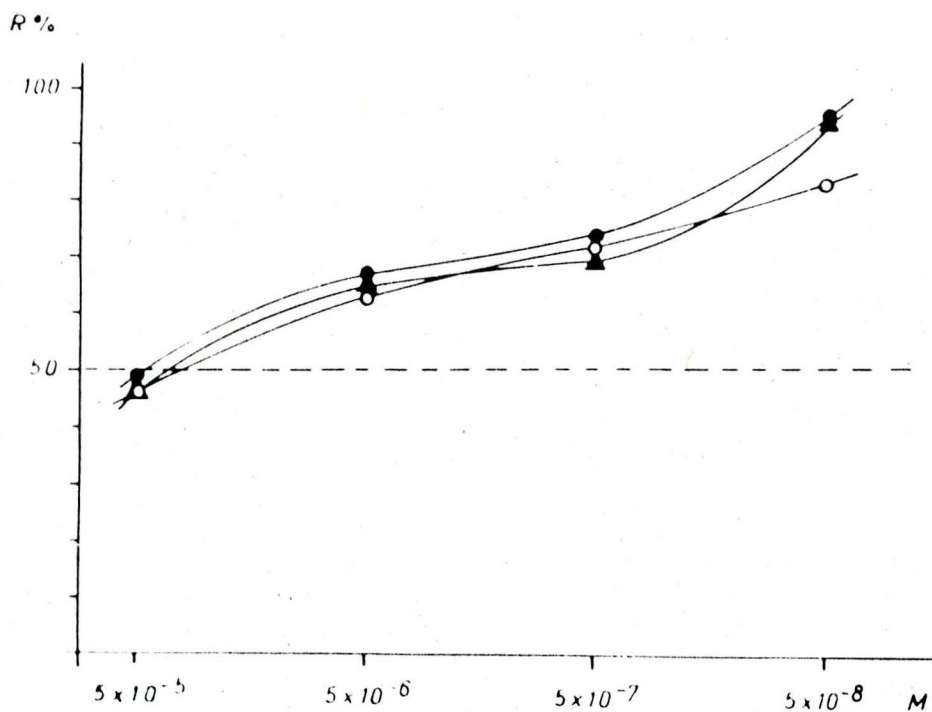
29. ábra: NA in vitro gátló hatása cerebrális, pedális és viscerális ganglionok ^3H -5HT felvételére



30. ábra: Reserpin in vitro gátló hatása cerebrális, pedális és viscerális ganglionok ^3H -5HT felvételére



31. ábra: Ouabain in vitro gátló hatása cerebrális, pedális és viscerális ganglionok ^3H -5HT felvételére



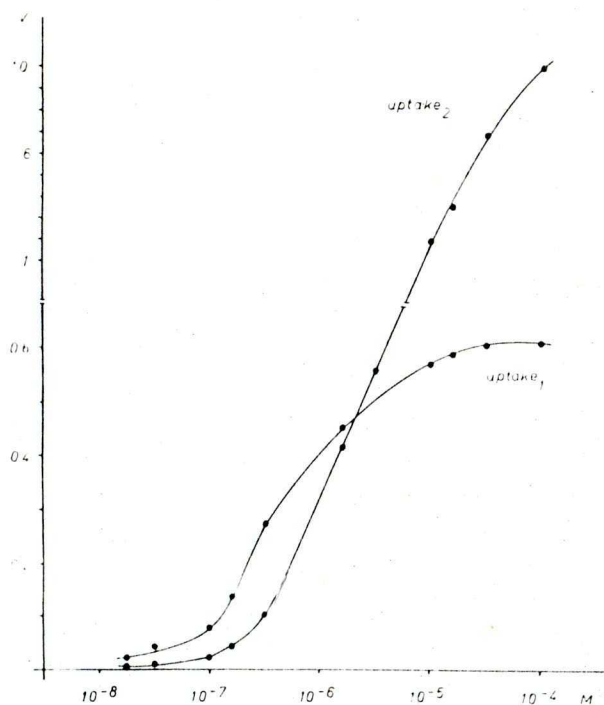
32. ábra: Tetrabenazin in vitro gátló hatása cerebrális, pedális és viscerális ganglionok ^3H -5HT felvételére

A cerebrális ganglionba történő szerotonin felvétel NA-nal történő gátlása egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációval érhető el, mint a pedális és viscerális ganglionokba történő felvétel gátlása. Pedális ganglionban az I_{50} érték $2,5 \times 10^{-5}$ M, viscerálisban 10^{-5} M a dopamin esetében. A pedális és viscerális ganglion esetében a noradrenalin $2,5 \times 10^{-4}$ ill. 4×10^{-4} M koncentrációja váltja ki a szerotoninfelvétel 50 %-os gátlását.

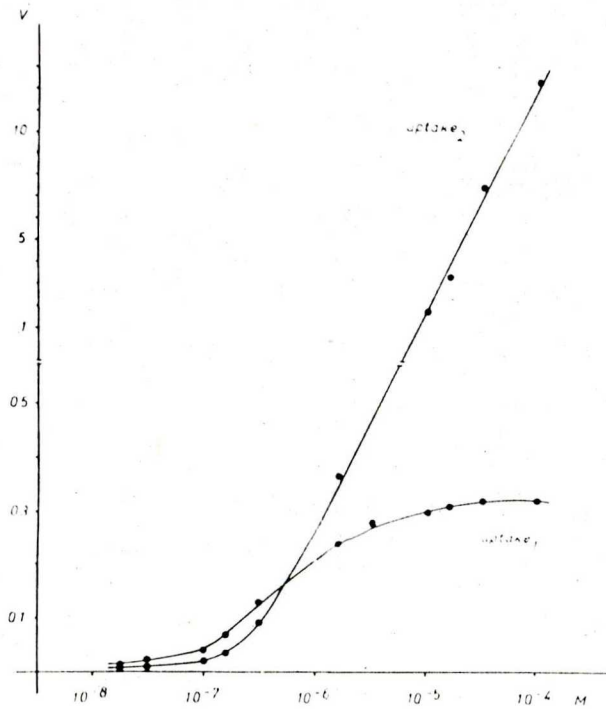
A felhasznált farmakonok közül a reserpin gátolta leghatásosabban a szerotoninfelvételt. Mindhárom ganglion esetében 10^{-8} M nagyságrendű koncentrációk már 50 %-os szerotoninfelvétel gátlást idéztek elő /cerebrális ganglion $6,5 \times 10^{-8}$; pedális ganglion $5,5 \times 10^{-8}$; viscerális ganglion $2,75 \times 10^{-8}$ M/. A tetrabenazin csak 3 nagyságrenddel nagyobb koncentrációtartományban okozott hasonló gátlást /cerebrális ganglion $4,5 \times 10^{-5}$; pedális ganglion 3×10^{-5} ; viscerális ganglion $3,2 \times 10^{-5}$ M/.

Többek között az aktiv transzportot is gátló ouabain is gátló hatást fejtett ki a felvételre. A leghatásosabban a pedális ganglionban gátol / $I_{50} = 1,5 \times 10^{-4}$ M/ míg a cerebrális és viscerális ganglionokban ugyanakkora gátló hatást közel két és fél - háromszoros mennyiség fejt ki / $3,25 \times 10^{-4}$; $4,5 \times 10^{-4}$ M/. A Michaelis-Menten egyenlet alapján számított értékek szerint a két 5HT felvételi rendszer a következőképpen járul hozzá a cerebrális, pedális és viscerális ganglionba történő totál akkumulációhoz: alacsony koncentrációtartományban

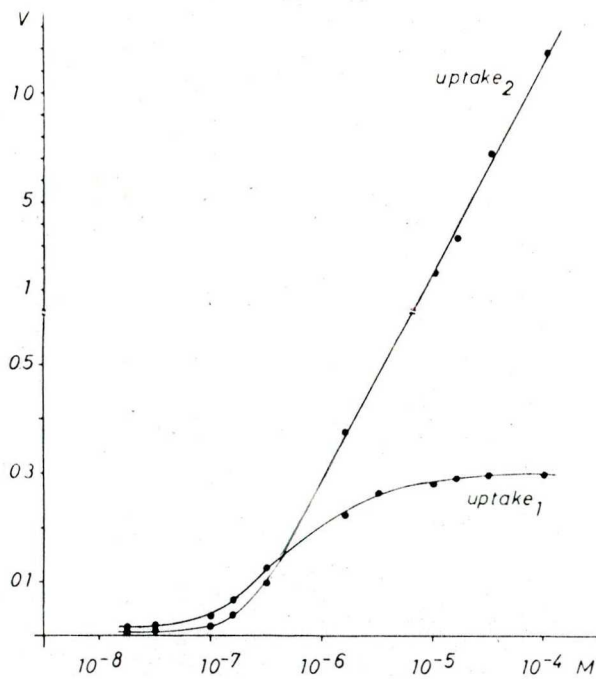
mindhárom ganglion esetében /33-35. ábrák/ kb. 5×10^{-7} M-ig a felvétel₁ rendszer kétszer annyi szerotonint akkumulál, mint a felvétel₂. A felvétel₁ rendszer ennél magasabb koncentráció mellett 5×10^{-5} M-ig még növekvő mértékben vesz fel szerotonint, azután a felvétel telítettnek mutatkozik. Ezzel szemben a felvétel₂ rendszer által történő 5HT-akkumuláció 5×10^{-7} M felett a következőképpen alakul: kb. 10^{-6} M koncentráció mellett pedális és viscerális ganglion 5HT felvétele ugrásszerűen megnövekszik és 10^{-4} M-nál már kb. 40-szer nagyobb, mint a felvétel₂.



33. ábra: Az 5HT akkumuláció sebességének változása cerebrális ganglionban a koncentráció függvényében a felvétel₁ és felvétel₂ folyamatok során

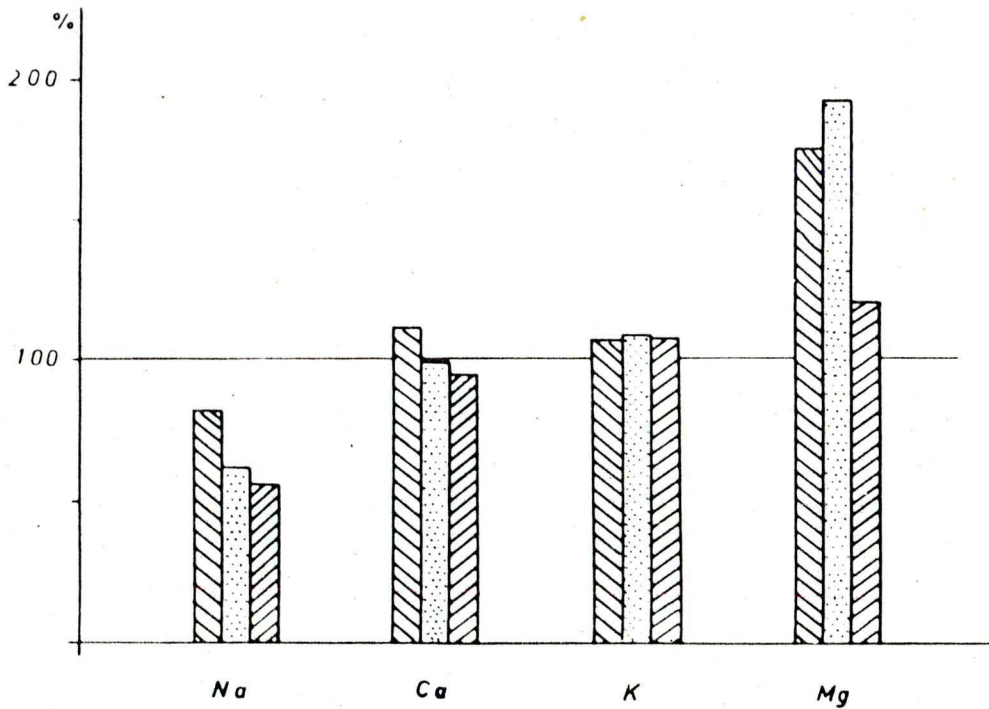


34. ábra: Az 5HT akkumuláció sebességének változása pedális ganglionban a koncentráció függvényében a felvétel₁ és felvétel₂ folyamatok során



35. ábra: Az 5HT akkumuláció sebességének változása visceropetalis ganglionban a koncentráció függvényében a felvétel₁ és felvétel₂ folyamatok során

A cerebrális ganglion esetében viszont a felvétel₁ rendszer közel kétszer annyi szerotonint akkumulál, mint a másik két ganglion megfelelő rendszere. A magas koncentrációtartományban domináns felvétel₂ mechanizmus révén akkumulált szerotonin mennyisége pedig a három gangliontípus közül itt a legkevesebb. Az ionhiányos Ringer-oldatok közül Na-mentes közegben jelentősen csökken, míg Mg-hiányos oldatban ugrásszerűen megnövekszik a felvétel. A K- és Ca-ionok hiánya nem befolyásolta a szerotoninfelvételt /36. ábra/.



36. ábra: K-, Na-, Ca-, Mg-ionok hiányának hatása a szerotonin felvételre / ▨ cerebrális ggl., ▩ pedális ggl., ▪ viscerális ggl./

M E G B E S Z É L É S

1. A szerotoninszint és az aktivitás szezonális változása

Az aktivitás periodicitása kagylók esetében azonos összefüggésben van a táplálkozás és a légzés periodicitásával /Gallstoff, 1928; Salánki és Lukacsovics, 1967/, valamint ez utóbbiakkal párhuzamos az emésztés intenzitása /Morton, 1969/ és a szív működés frekvenciája /Schleper és Kowaksi, 1957; Pécsi és Salánki, 1964/. Így tehát a kagylóhéjak nyitott és csukott állapota nemcsak az adduktor izmok pillanatnyi állapotát, hanem a kagyló egyéb fiziológiai állapotát is jelenti. Ezáltal tehát a héjak nyitott és csukott helyzetének változása az életfolyamatok szezonális változását is tükrözi.

Jól ismert más puhatestű állatok, mint pl. a csigák viselkedésének szezonális változása, amelynek egy igen szembetűnő jele az állatok téli hibernálódása. Cardot /1971/, valamint Hiripi és Salánki /1973 b/ már korábban leírták a *Helix pomatia* ganglion 5HT tartalmának szezonális változását és ez utóbbiak kimutatták, hogy a szerotoninszint és az aktivitás bizonyos külső faktorokkal befolyásolható. Anodonta esetében sikerült kimutatnunk évszakos változásokat mind az aktivitásban, mind pedig a szerotoninszintre vonatkozólag. Az állatok aktivitása és központi idegrendszerük szerotoninszintje nyáron volt a legnagyobb, míg télen a

befagyott Balaton jege alatt a legkisebb. Abban az esetben, ha az állatokat télen laboratóriumi körülmények között akváriumban 8-10 C^o-on tartottuk, a szerotoninszint nem sokban különbözött a tavasszal és ősszel mért értékektől. Ettől eltérően azonban a laboratóriumi körülmények között tartott állatok aktivitása különbözött télen, tavasszal és ősszel.

Eredményeink szerint nyáron, amikor a magas szerotoninszint a jellemző, nem növekedett az aktív periódusban eltöltött idő, azonban megnövekedett a periodicitás frekvenciája, amely abból állt, hogy a rövid aktív és nyugalmi szakaszok váltak dominánssá /1. táblázat/. A jég alatt tartott állatoknál - a szerotoninszint csökkenésével együtt - nagymértékben csökkent a periodicitás frekvenciája. Így előfordult, hogy a kagyló 4 napon keresztül zárva volt /10. ábra/. Fennmarad a kérdés, vajon van-e összefüggés a periodikus aktivitás és a szerotoninszint között. Ismert tény, hogy a szerotonin részt vesz a kagylók aktivitásának szabályozásában /Salánki, 1971/. Exogén szerotonin ganglionra történő applikálásával /Salánki, 1963/, valamint a tárolt szerotonin mobilizálásával /Hiripi, 1973/, el lehet érni azt, hogy megnövekszik az aktivitás, míg a szerotonin szintézis gátlásával ugyanez lecsökken /Hiripi, 1973/. Minthogy a szerotonin neurotransmitternek tekinthető, mind interneuronális, mind pedig neuroeffektor szinten /Hiripi és mtsai, 1973; Salánki és Hiripi, 1970/ feltételezhető, hogy a nyáron megnövekedett és télen lecsökkent aktivitás szoros összefüggésben áll a hasonló módon

megváltozott szerotoninszinttel. Mivel a szerotonin szintézis és tárolás kizárólag a központi idegrendszerben történik /Hiripi és Salánki, 1969/, nyilvánvalónak tűnik, hogy az idegvégződések és a különböző szervek szerotonintartalma függ a ganglionok 5HT tartalmától. Ezt erősíti meg Lagerspitz és Tirri /1968/ eredménye, akik kimutatták, hogy Anodonta szive télen kevesebb szerotonint tartalmaz, mint nyáron. Ezek a tények megmagyarázhatják azt, hogy a nyári megnövekedett aktivitás a magas szerotoninszint eredménye, míg a téli alacsony aktivitás a lecsökkent szerotoninszinttel van kapcsolatban, ami a szerotoninszintézis csökkenésének lehet a következménye. Kísérleteink eredményei szerint a környezeti tényezők közül a hőmérséklettel van összefüggésben mind a szerotoninszint, mind pedig az aktivitás szezonális változása. Ezt alátámasztja az a tény, hogy a legalacsonyabb szerotonin- és aktivitási szintet akkor mértük, amikor az állatok télen jég alatt éltek. Feltehetően az aktivitás elsődleges meghatározásáért a felszabaduló, funkcionáló szerotonin a felelős, amely nyilvánvalóan a ganglionáris szerotoninszint függvénye, azonban ezt különböző endogén és exogén faktorok is képesek modulálni.

2. A katecholaminszint alakulása az aktív és nyugalmi periódusok kezdetén

Az eddigi eredmények alapján feltételezhető, hogy a tavikagyló aktivitása katecholaminerg és szerotoninerg rendszer

pillanatnyi egyensulya határozza meg. Ez azt jelenti, hogy az aktiv állapot fenntartásáért a szerotoninerg, a nyugalmiért viszont a katecholaminerg rendszer a felelős. Korábban már kimutatták, hogy a szerotoninszintézis sebességét meghatározó pCPA csökkenti a kagylók központi idegrendszerének szerotonintartalmát és ezáltal az állatok aktivitását is. Ugyanakkor az exogén szerotonin növeli az aktivitást /Hiripi, 1973/.

A nyugalmi állapot fenntartásáért felelős dopamin exogén adagolása csökkenti az aktiv és nyugalmi periódusok átlaghosszát, ugyanakkor az exogén noradrenalin kifejezetten aktivitáscsökkentő, azáltal, hogy az aktiv periódusok átlaghosszának csökkentésével párhuzamosan növeli a nyugalmi periódusok átlaghosszát /Hiripi, 1973/.

Az elképzelések szerint a monoaminok a következőképpen befolyásolnák a kagyló aktivitását: Az aktiv periódusok kezdetén a ganglionokból egy jelentős szerotoninfelszabadulás történik a záróizmok irányában és ezáltal az izmok relaxált állapotba kerülnek. Salánki és Hiripi /1970/ kimutatták, hogy ingerlés hatására a szerotonin a ganglionból a záróizom irányába szállítódik és így okozza az izmok elernyedését. Továbbá Salánki és mtsai /1974/ irták le azt is, hogy az aktiv periódusok kezdetén a ganglionáris szerotoninszint alacsonyabb, mint a nyugalmi periódus kezdetén, mintegy megerősítve, hogy a záróizmok elernyedését a szerotonin okozta.

Egyes hipotézisek szerint a tartós tónusos kontrakcióban a Ca^{2+} egy stabil aktin miozin kötést létesít. Az izom elernyedésekor

a szerotonin felszakítja e kötést azáltal, hogy eltávolítja a Ca^{2+} -ot. E feltevással értelmezhető a ganglionáris szerotoninszint csökkenése a relaxáció kezdetekor. A DA és NA aktivitási állapottól függő szintváltozása a következőképpen magyarázható. Ismeretes, hogy gerincesek központi idegrendszerében a szerotonin és noradrenalin szint napszakos változása ellentétes irányú és ugyancsak napszakosan változik a szerotonin szintézise és felhasználása is. Újabb vizsgálatok során a 6-hidroxidopaminnal kezelt állatok monoaminszintjének valamint a 5HT szintézis és felhasználás korábbi napszakos változásának módosulásából arra a következtetésre jutottak, hogy a szerotoninszintézis és felhasználás periodicitását a katecholaminok szabályozzák. Ezek alapján feltételezően kagylók esetében is a katecholaminszint megváltozása a szerotonin szintézis és felhasználás módosítása révén szabályozza a periodikus aktivitást.

3. MAO-gátlók hatása a monoaminszintre és az aktivitásra

Puhatestűek központi idegrendszerében napjainkban még nem teljesen világos a MAO szerepe a monoaminok inaktiválásában. Számos faj idegrendszerében tudták azonosítani a monoaminok savas metabolitjait, valamint *in vitro* mérni a MAO enzim aktivitását /Osborne és Cottrell, 1970 ; Myers és Sweeney, 1972; Marsden, 1972; Juorio és Killick, 1972/. Ugyanakkor akadtak olyan fajok is, amelyekben nem tudták azonosítani a savas metabolitokat, valamint nem volt mérhető a MAO aktivitás

/Cardot, 1964; 1966; McCaman és Dewhurst, 1971; Juorio és Killick, 1972/. Hiripi és Salánki /1971/ azt találták, hogy Anodonta esetében a MAO résztvesz mind a szerotonin, mind pedig a katecholaminok enzimatis lebontásában. Ennek alapján az várható, hogy a MAO-gátlók alkalmazása megnöveli az Anodonta központi idegrendszerének monoaminszintjét. Ennek ellenére az alkalmazott gátlók sem a szerotonin sem pedig a katecholaminok szintjét nem növelték meg szignifikánsan, azonban jelentős változást okoztak a kagylók aktivitásában. Eredményeink jó megegyezést mutatnak Kerkut és Cottrell /1963/, valamint Kerkut és mtsai /1966/ adataival, akik azt találták, hogy *Helix aspersa* idegrendszerében a nialamid sem a szerotonin, sem pedig a dopamin szintjét nem növelte meg. *Helix* pargylinnel való kezelése után Juorio és Killick /1972/ sem tudta kimutatni a monoaminszint valamilyen megváltozását. Az a tény, hogy a MAO-gátlók nem növelik Anodonta központi idegrendszerében a szerotoninszintet, a következőképpen magyarázható: Az Anodonta különféle szövetei tartalmazzak szerotonint de a szintézis kizárólag az idegrendszerben történik /Hiripi, 1968; Hiripi és Salánki, 1969/. A szerotonin szállítása a periféria felé - így pl. a záróizomhoz - axonális transzport, vagy pedig a keringés révén történik. Abban az esetben, amikor a szerotonin enzimatis lebontását az idegrendszerben MAO-gátlók révén megakadályozzuk, a felesleges szerotonin a fent említett folyamatok segítségével jut a perifériás

szervekhez. A farmakológiai vizsgálatok szerint /Hiripi és Salánki, 1973 a/ a periférián a megnövekedett szerotonin fokozza az izom motoros aktivitását. Jelen vizsgálataink során a motoros aktivitás növekedése a tranilcipromin hatásának első fázisában volt látható. Feltehetően az aktivitás megnövekedését a tranilcipromin mellékhatása okozta /Knoll és Magyar, 1972/ azáltal, hogy felszabadította a szerotonint. A többi MAO-gátló csökkentette az aktivitást, amely abban mutatkozott, hogy csökkent az aktív periódusok időtartama és százalékos aránya. Az ilyen hatás a katecholaminokra jellemző /Hiripi, 1973/. A tranilcipromin-hatás második fázisa, az actomol, valamint a nialamid hatása hasonló volt a dopaminéhoz, míg a pargylin és az iproniazid hatása a noradrenalinéra emlékeztetett. A MAO-gátlók hatása a katecholaminszintre azzal is magyarázható, hogy a katecholaminok lebontásában a COMT-nak is van szerepe, ezenkívül nem elhanyagolható az a tény sem, hogy minden bizonnyal a katecholaminok hatásának megszüntetésében jelentős szerepe lehet még az újrafelvételnek. Hiripi /1973/ korábbi megfigyelése szerint noradrenalinosis kezelést követően csökken az aktív periódusok időtartama és ugyanakkor megnövekszik a nyugalmi periódusok hossza, ezzel magyarázható az is, hogy a pargylin, nialamid és iproniaziddal történt kezelést követően a megnövekedett noradrenalin szint okozta az aktivitás csökkenését. A tranilciprominnal való kezelés nem okozott egyértelmű változást a dopamin- és noradrenalin szintben és így e farmakonnak a kétfázisú hatása inkább

a monoaminok mobilizálásának /Knoll és Magyar, 1972/, mint a MAO gátlásának következménye.

A monoaminszint csekély változása a MAO-gátlókkal történt kezelést követően egy másik problémát is felvet, nevezetesen azt, hogy a funkcionális monoaminszint meglehetősen alacsony az össz tárolt monoaminszinthez képest. Kísérleteink során a totál aminszintet mértük. Mivel az aktív pool szintje csekély az inaktív monoaminszint mellett, így a mérés során ez a magas inaktív pool elfedheti a funkcionális aminszintben bekövetkezett változást.

4. 6OHDA hatása a monoaminszintre, az aktivitásra

Kísérleti eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a 6OHDA jelentősen befolyásolja a ganglionáris monoamin szintet és az állatok aktivitását. Az aktivitásra kifejtett hatásnak két fázisa különíthető el; egy kezdeti mely nagymértékben hasonló az exogén szerotonin hatására /Salánki, 1963; Salánki, Hiripi és Nemcsók, 1975/ valamint az ismételt kezelést követő tartós hatás, mely nem hasonlítható egyik eddig vizsgált, a monoaminszintet befolyásoló farmakon hatásához sem /Hiripi, 1973/. A 6OHDA a tavikagyló idegrendszerében a gerincesekhez hasonlóan /Burkard és mtsai, 1969; Hery és mtsai, 1973; Uretsky és Iversen, 1969/ jelentős mértékű és tartós csökkenést csak a dopamin és a noradrenalin szintben okozott. A szerotonin szintben bekövetkező csökkenés csak a kezelés kezdetén jelentkezik. A kezelés hatására

létrejött tartós aktív periódus tartama /64,8 óra/ időben egybe-
esik a ganglionáris szerotonin szint csökkenésével. Ez annak
lehetőségét veti fel, hogy a 6OHDA a ganglionból vagy neuro-
musculáris szinten 5HT mobilizációt okoz és ennek következménye a
tartós aktív periódus létrejötte és a ritmikus kontrakciók
frekvenciájának növekedése. Ismert, hogy az aktív periódus kez-
detekor fiziológias viszonyok mellett a ganglionáris szerotonin
szint csökken az izomban ugyanakkor nő /Salánki és Hiripi, 1970/.
Mollusca izmok ernyedését kívülről adott szerotonin jelentősen
fokozza /Lowry és Millman, 1963/, ill. a tónusosan kontrahált
izom ernyesztéséért szerotonin felelős /Twarog, 1964/. Mint-
hogy a szerotonin csak az idegrendszerben szintetizálódik az
izomban nem /Hiripi és Salánki, 1970/, a záróizom megnövekedett
szerotonin felhasználása az aktív periódusban transzport útján
a ganglionból elégitódik ki.

Gerinceseken végzett vizsgálatok valószínűsítik a
6OHDA szelektív neurotoxicitását a katecholaminerg neuronokon
/Bloom és mtsai, 1969; Breese és Taylor, 1970; Hökfelt és
Ungerstedt, 1973/, de nagy dózisban jelentős szerotonin csökkentő
hatását is leirták /Laguzzi és mtsai, 1971/. A szerotonin csök-
kenés mértéke tavikagylón nem haladta meg a fiziológias viszonyok
között is észlelhető, az aktivitás periodicitásával összefüggő
ingadozást /Salánki és Hiripi, 1970/. E változás analóg a 6OHDA
kezelés hatására patkány agyban létrejött változással, ahol a
6OHDA kezelés a katecholamin szint csökkentése mellett módo-
sitja a szerotonin szintézis mértékét és a szerotonin szint

napszakos változását /Héry és mtsai, 1973/.

Korábbi farmakológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a szerotoninerg rendszer tulsulya az aktiv, a katecholaminerg rendszer tulsulya pedig a nyugalmi periódusok előtérbe kerülését eredményezi /Hiripi, 1973; Salánki, Hiripi és Nemcsók, 1975/. Az ismételt kezelés utáni tartós hatás, a nyugalmi periódusok hiánya amikor a dopamin és a noradrenalin szint tartós csökkenése következik be nyilvánvalóan a katecholaminerg neuronok károsodásának az eredménye. Az aktivitást ebben a fázisban jellemző tartós aktiv periódusok azonban különböznek a kezdeti hatás tartós aktiv periódusaitól, mert nem jellemzi őket a gyors ritmikus kontrakciók frekvenciájának növekedése mely elsősorban az 5HT liberáció eredménye. A kezdeti hatásra nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a 6OHDA nemcsak a katecholaminerg, hanem a szerotoninerg neuronon okozott közvetlen hatásnak is az eredménye. A tartós hatás alkalmával azonban valószínűleg nemcsak a központi idegrendszer, hanem a záróizom neuromusculáris kapcsolatai is károsodnak. Erre utal az izom tartós tónusos kontrakciójának hiánya és a szerotoninra adott izomválasz is.

5. Monoaminok beépülése Anodonta pedális ganglionjába

Kísérleti eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a tavikagyló központi idegrendszere a gerinces állatokhoz hasonlóan rendelkezik olyan aktiv transzport rendszerrel, mely akumulálja a radioaktiv szerotonint, dopamint és noradrenalint.

Gerincesek központi idegrendszerében a noradrenalin akkumulációja egy nagy affinitású /felvétel₁/ míg a dopamin és a szerotonin akkumulációja egy nagy /felvétel₁/ és egy alacsony /felvétel₂/ affinitású rendszer közreműködésével valósul meg /Shaskan és Snyder, 1970; Snyder és Coyle, 1969; Iversen, 1970; Iversen, 1971/. A tavikagyló pedális ganglionjában is működik e két eltérő affinitású rendszer azzal a különbséggel, hogy itt a noradrenalin akkumulációjában a felvétel rendszer is közreműködik, ahhoz hasonlóan, mint azt a gerincesek perifériás szöveteiben találták /Iversen, 1970/.

A patkány agyszeleten mért adatokhoz hasonlóan /Shaskan és Snyder, 1970/ a tavikagylón mért értékek szerint is a felvétel₁ rendszer affinitási konstansai nagyságrenddel kisebbek, mint a felvétel₂ rendszeré és kisebb a beépülés sebessége is. A patkány agyszeleten mért adatokhoz viszonyítva a felvétel affinitása és a beépülés sebessége is alacsonyabb a tavikagyló pedális ganglionjában. Ez részben a fajspecifitással, részben azzal magyarázható, hogy az alkalmazott fiziológiás hőmérséklet kagylón 10 C^o-kal alacsonyabb mint patkányon. Ugyanakkor *Quadrula pustulosa* pedális ganglionja esetén mért K_m érték /Myers és Sweeney, 1973/ jó egyezést mutat a tavikagyló pedális ganglionja esetén mért K_{m1} értékkel.

Az akkumuláció affinitási sorrendje a három monoaminra a nagy affinitású rendszer esetén NA 5HT DA, míg a kis affinitású rendszer esetén NA DA 5HT. Az összes akkumulált 5HT

és DA nagyobb része a felvétel₁ mechanizmussal épül be a ganglionszövetbe az alacsony, 10^{-7} - 10^{-6} M médium koncentráció mellett. Nagyobb koncentráció tartományban viszont a felvétel₂ mechanizmus nagyobb részét szállítja az össz akkumulált aminnak, mint a felvétel₁ mechanizmus. E szempontból a noradrenalin eltér a szerotonintól és a dopamintól, minthogy a NA esetén az alacsony koncentráció tartományban a felvétel₁ és a felvétel₂ sebessége hasonló mértékben változik. Így az akkumulálódó NA-nak közel azonos hányadát szállítja a beépülés során a két rendszer ebben a koncentráció tartományban. Ez valószínűleg kapcsolatban van az endogén NA pool-al is, minthogy az 5HT és a DA endogén pool-ja kb. tízszer nagyobb, mint a NA-é. Így elképzelhető, hogy a kis NA pool miatt a NA DA pool-ba épül be a felvétel₂ mechanizmus közreműködésével.

Valószínűleg a felvétel₁ a specifikus, míg a felvétel₂ a nem specifikus folyamatot képviseli az akkumuláció folyamán. Erre utalnak az autoradiográfiás vizsgálatok is. Kagylón végzett vizsgálatok szerint /Elekes, 1975/ 10^{-6} M koncentrációt használva, ahol a felvétel₁ mechanizmus a domináns, a jelzett szerotonin idegelemekre lokalizálódik. Hasonló eredményeket kaptak az ilyen vizsgálatok során a *Quadrula pustulosa*-n dopaminra /Myers, 1974/. Ugyanakkor az 5HT és a DA nagy koncentrációit alkalmazva a radioaktív szerotonin és dopamin nem specifikus kötődését találták *Helix*-en /Asher és mtsai, 1968/.

A szerotonin beépülés kinetikai sajátosságai

A szerotoninfelvétel részletes kinetikai vizsgálata alapján megállapítható, hogy ezen neurotranszmitter felvétele mindhárom ganglionban - a gerinces állatokhoz hasonlóan /Shaskan és Snyder, 1970; Snyder és Coyle, 1969; Iversen, 1970; 1971/ - egy magas felvétel₁ és egy alacsony affinitású felvétel₂ rendszer segítségével történik. Alacsony koncentráció-tartomány mellett mindhárom ganglionban a felvétel₁ rendszer kb. 2-szer annyi szerotonint akkumulál, mint a magasabb 5HT koncentráció mellett. Ez nyilvánvalóan specifikusan a szerotonintartalmu idegelemekbe történő beépülést reprezentálja. Ezzel ellentétben a felvétel₂ rendszer segítségével a magas szerotoninkoncentráció mellett történő nagymértékű akkumuláció annak a következménye, hogy a jelzett szerotonin már nemcsak a szerotonint, hanem a katecholaminokat tároló idegelemekbe is beépül.

A cerebrális ganglionban működő magas affinitású felvétel₁ rendszer azt bizonyíthatja, hogy a három ganglion közül itt működik a legmagasabb affinitású felvétel₁ mechanizmus, ami annál is érdekesebb, minthogy az aktivitás szabályozásában a cerebrális ganglionnak kulcsszerepe van.

A meghatározott K_m értékek közül a pedális ganglionra vonatkoztatott értékek különböznek a korábbi kísérletek során ugyancsak meghatározott K_m értékektől. Az eltérés oka minden bizonnyal az, hogy e méréseinket különböző évszakokban végeztük és

igy valószínűnek látszik, hogy tavikagyló esetében a szerotonin felvételi mechanizmusa hasonlóan a szerotoninszint évszakos változásához /Salánki és mtsai, 1974/ szezonális változást mutat. A szerotonin felvétele gátolható DA-nal és NA-nal. 50 %-os és annál nagyobb mértékű gátlás esetében 10^{-6} M koncentrációtól kezdődően, - amely jó megegyezést mutat Ross és Rényi /1975/ által egéragyban meghatározott I_D 50 % értékkel - míg a NA esetében 10^{-5} M koncentráció felett történik, amely feltehetően annak következménye, hogy e koncentrációtartomány felett a szerotoninnak a katecholaminokat tároló vezikulákba történő beépülése kompetitív gátlódik a DA ill. a NA révén. A szerotonin akkumuláció hőmérséklettől, időtől, iontól és farmakon-tól függő beépülése azt mutatja, hogy ez mindhárom ganglionban aktív folyamat eredménye. A cerebrális és viscerális ganglionban $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ felett lecsökkent, viszont a pedális ganglionban még $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is fokozódott a szerotoninfelvétel. A folyamat magyarázata az lehet, hogy tavikagyló esetében a záróizmok közvetlen beidegzéséért felelős cerebrális és viscerális ganglionok optimális működéséhez szükséges környezet hőmérséklete kb. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A felvételi mechanizmus gerinces állatokéhoz hasonlóan Na-igényes. Ezenkívül a Mg-mentes közegben nagymértékben megnövekvő beépülés azt mutatja, hogy a Mg-ionok a szerotoninfelvétele szabályozó szereppel bírnak. A felhasznált farmakon közül az ouabain felvétele gátló hatása azt is mutatja, hogy ezen folyamat olyan aktív transzport eredménye, amely szoros összefüggésben

áll a Na- k-függő ATP-áz rendszerrel. Az általunk használt koncentrációju ^3H -5HT felvétele elsősorban az idegsejtek tároló vezikuláiba történik, ugyanis ezen tároló vezikulákból történő szerotonin kiürítését elősegítő reserpin és tetrabenazin jelentős mértékben gátolta az akkumulációt.

ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálva a kagylók aktivitásának alakulását a monoamin-szint változásával összefüggésben a következő eredményeket kaptuk:

1./ Az aktivitás és a szerotoninszint évszakos változást mutat. Az állatok aktív periódusban nyáron töltik el az össz idő legnagyobb százalékát, míg télen nagyjából passzív, azaz csukott állapotban vannak. A szerotoninszint ugyanakkor télen alacsonyabb, mint nyáron.

2./ Az aktív és nyugalmi periódusok kezdetén mért DA és NA szintek azt mutatják, hogy a nyugalmi periódusok kezdetén magasabb a DA és NA szint, mint az aktív periódusok esetében.

3./ A MAO-gátlószer nem okozta a ganglionáris monoaminszint növekedését, az aktivitást azonban jelentős mértékben befolyásolta, főképpen úgy, hogy csökkentette az aktív periódusok átlaghosszát és az aktivitásban eltöltött idő százalékos arányát. Valószínű, hogy a MAO-gátlók az aktív pool szintjét befolyásolják, ami az össz monoamin tartalomnak csak egy kis hányada és ez a körülmény a szignifikáns különbséget elfedi.

4./ A katecholaminerg rendszert szelektíven károsító 6OHDA hatására hosszantartó folyamatos aktív állapotban vannak az állatok. A ganglionáris DA és NA szint ugyancsak lecsökken, míg a szerotoninszint változatlan.

5./ A kagyló központi idegrendszere képes a ^3H -jelzett 5HT, DA és NA akkumulálására. Lineweaver-Burk által leírt kinetikai analízis révén megállapítható, hogy mindhárom monoaminat egy magas és egy alacsony affinitású felvételi rendszer akkumulálja. A ^3H -jelzett 5HT felvétel kinetikai vizsgálatai azt mutatják, hogy e felvétel és akkumuláció aktív transzport eredménye, amely Na-igényes és függ a hőmérséklettől, és gátolható dopaminnal és noradrenalinval.

I R O D A L O M

- Aghajanian G., Bloom F.: Localization of tritiated serotonin in rat brain by electron microscopic autoradiography.- *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1967, 156, 23-30.
- Ascher P., Glowinski J., Tauc L., Taxi J.: "Discussion of stimulation-induced release of serotonin" In: *Advances in Pharmacology /Ed.: Garaffin S., Shore P./*.- 1968, vol.6, A, 365-368, Academic Press, New York.
- Axelrod J.: Metabolism and inactivation of noradrenaline and the effect of drugs.- In: *Proceeding of the Second International Pharmacological Meeting, Prague, Pharmacology of Cholinergic and Adrenergic Transmission /Ed.: Koelle G.B., Douglas W.W., Carlsson A./* 1965, 3, 205-219, Pergamon Press, New York.
- Bertler A., Falck B., Owman C.: Studies on 5-hydroxytryptamine stores in pineal gland of rats.- *Acta Physiol.Scand.*, 1963, 63, suppl. 239, 1-18.
- Blaschko H., Burn J.H., Corter C.W.: L-dopa decarboxylase and pressor amine formation in the adrenal medulla.- *J.Physiol.*, 1951, 115, 37.
- Blaschko H., Hawkins J.: Observation on amine oxidase in Cephalopods.- *J.Physiol.*, 1952, 118, 88.
- Blaschko J.H., Levine W.G.: Metabolism of indolealkylamines.- In: *Handbook of Experimental Pharmacology /Ed.: Erspamer/* 1966, 19, 593-735, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York.

- Bogdanski D.F., Pletscher A., Brodie B.B., Udenfriend S.:
Identification and assay of serotonin in brain.-
J.Pharmacol.exp.Ther., 1956, 117, 82-88.
- Cardot J.: Decarboxilation in vitro du 5-hydroxytryptophane
por le tissu nerveaux du Mollusque Gastropode de
Helix pomatia.- C.R.Acad.Sci.Paris, 1963 a, 256,
1036-1037.
- Cardot J.: Sur la presence de dopamine dans le system nerveaux
et sas relations avec la decarboxilation de la
dioxypyhenylalanine chez le Mollusque Helix pomatia.-
C.R.Acad.Sci.Paris, 1963 b, 257, 1364-1366.
- Cardot J.: Considerations sur le metabolisme de la 5-hydroxy-
tryptamine et de la tryptamine chez le Mollusque
Helix pomatia.- C.R.Acad.Sci.Paris, 1964, 258,
1103-1105.
- Cardot J.: 'La monoamineoxydase chez le Mollusque Helix pomatia
activité sur quatre substrats'.- C.R.Acad.Sci.Paris,
1966, 160, 1264-1268.
- Cardot J.: Variations saisonniers de la 5-hydroxytryptamine
dans les tissue nerveaux et cardiaque chez le Mollusque
Helix pomatia.- C.R.Seanc.Soc.Biol.Paris, 1971, 165,
338-341.
- Colburn R.W., Goodwin J.K., Murphy D.L., Bunney W.E., Davis J.M.:
Quantitative studies of norepinephrine uptake by
synaptosomes.- Biochem.Pharmacol., 1968, 17/6/, 957-964.

- Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H.: The biochemical basis of neuropharmacology.- Oxford University Press, London, Toronto, 1970.
- Coyle J.T., Snyder S.H.: Catecholamine uptake by synaptosomes in homogenates of rat brain: Stereospecificity in different areas.- J.Pharmacol.Exp.Ther., 1969, 170, 221-231.
- Dahl E., Falck B., von Mecklenburg C., Myhrberg H., Rosengreen E.: Neuronal localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some Mollusca.- Z.Zellforsch., 1966, 71, 489-498.
- Dengler J.J., Michaelson I.A., Spiegel M.E., Titus E.: The uptake of labelled norepinephrine by isolated brain and other tissues of the cat.- Int.J.Neuropharmacol., 1962, 1, 23-38.
- Elekes K.: Light microscopic autoradiography of ³H-5HT uptake in the central nervous system of fresh water mussel, *Anodonta cygnea* L.- Acta biol.Hung.Acad.Sci., 1975, /in press/.
- Erspamer V.: 5-hydroxytryptamine and related indolealkylamines.- Handbook of Experimental Pharmacology 19, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1966.
- Friedman A.M., Walker G.A.: Circadian rhythms in rat brain and caudate nucleus biogenic amine levels.- J.Physiol., 1968, 197, 77-85.
- Fuxe K., Ungerstadt U.: Histochemical studies on the distribution of catecholamines and 5-hydroxytryptamine after intraventricular injections.- Histochemie, 1968, 13, 16-28.

- Galstoff P.S.: Experimental study of the function of the oyster gill and its bearing on the problems of oyster culture and sanitary of the oyster industry.- Bull.V.S.Fish., 1928, 44, 1-39.
- Gerschenfeld H.M.: Observations on the ultrastructure of synapses in some pulmonate molluscs.- Z.Zellforsch., 1963, 60, 258-275.
- Gerschenfeld H.M., Stefani E.: Evidence for an excitatory transmitter role of serotonin in molluscan central synapses.- Adv.Pharmac., 1968, 6A, 369-392.
- Gfeller E., Green A., Snyder S.H.: Regional differences in ^3H -norepinephrine uptake in monkey brain /*Maccaca irus*/.- Brain Res., 1968, 11, 263-267.
- Glowinski Y., Iversen L.L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain I. The disposition of ^3H -norepinephrine, ^3H -dopamine and ^3H -DOPA in various regions of the brain.- J.Neurochem., 1966, 13, 655-669.
- Harri M.: Effect of season and temperature acclimation on the 5-hydroxytryptamine level and the utilization in the brain and intestine of the frog, *Rana temporaria*.- Comp.gen.Pharmac., 1972 a, 3, 11-18.
- Harri M.: Effect of season and temperature acclimation on the tissue catecholamine level and utilization in the frog, *Rana temporaria*.- Comp.gen.Pharmac., 1972 b, 3, 101-112.

- Hiripi L.: Paper chromatographic and fluorimetric examination of the serotonin content in the nervous system and other tissues of three freshwater molluscs.- *Annal.Biol.Tihany* 1968, 35, 3-11.
- Hiripi L.: A szerotonin metabolizmusa és funkcionális szerepének vizsgálata puhatestű állatokon.- Egyetemi doktori értekezés, 1970.
- Hiripi L.: Pharmacological investigations on the regulation mechanisms of the periodic activity of the fresh water mussel /*Anodonta cygnea* L./.- *Annal.Biol.Tihany*, 1973, 40, 27-53.
- Hiripi L., Salánki J.: 5HTP-DOPA decarboxylase in the nervous system and other tissues of *Anodonta cygnea* L. /*Pelecypoda*/.- *Annal.Biol.Tihany*, 1969, 36, 19-24.
- Hiripi L., Salánki J.: The role of monoamino oxydase in the inactivation of serotonin in the nervous system and other tissues of *Anodonta cygnea* L.- *Annal.Biol.Tihany*, 1971, 38, 31-38.
- Hiripi L., Salánki J.: Role of monoamines in the central regulation of periodic activity in *Anodonta cygnea* L. /*Pelecypoda*/.- In: *Neurobiology of Invertebrates* /Ed.: Salánki J./ 1973 a, Akadémiai Kiadó, Budapest, 391-401.
- Hiripi L., Salánki J.: Seasonal and activity-dependent changes of the serotonin level in the CNS and the heart of the snail /*Helix pomatia*/.- *Comp.gen.Pharmac.*, 1973 b, 4, 285-292.

- Hiripi L., Salánki J., Zs.-Nagy I., Muskó I.: Subcellular distribution of biogenic monoamines in the central nervous system of *Anodonta cygnea* L. as revealed by density gradient centrifugation.- *J.Neurochemistry*, 1973, 21, 791-797.
- Hiripi L., S.-Rózsa K.: Fluorimetric determination of 5-hydroxytryptamine and catecholamines in the central nervous system and heart of *Locusta migratoria migratorioides*.- *J.Insect.Physiol.*, 1973, 19, 1481-1485.
- Hiripi L., Nemcsók J., Salánki J.: The effect of monoamine oxydase inhibitors on the ganglionic serotonin and catecholamine levels and on the activity in the fresh water mussel /*Anodonta cygnea* L., Pelecypoda/.- *Annal.Biol.Tihany*, 1974, 41, 25-33.
- Iversen L.L.: The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves.- Cambridge Univ.Press, London, New York, 1967.
- Iversen L.L.: Neuronal uptake processes for amines and amino acids.- In: *Biochemistry of simple neuronal models.* /Ed.: Costa E. Giacobini E./. *Adv.in Biochemical Pharmacology*, 1970, 2, 109-132, Raven Press.
- Iversen L.L.: Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic transmission.- *Brit.J.Pharmac.*, 1971, 41, 571-591.
- Jaeger C.P.: Action of 5-hydroxytryptamine antagonists on the heart of *Anodonteus trapesialis*.- *Rev.Brasil.Biol.*, 1966, 26/1/, 69-72.

- Janakidevi K., Dewey V.C., Kidder G.W.: Serotonin in Protozoa.-
Arch.Biochem.Biophys., 1966, 113, 758.
- Juorio A.V., Killick S.W.: Catecholamines and 5-hydroxytryptamine
in nervous tissue of cephalopods.- J.Physiol., 1971,
216, 213-226.
- Juorio A.V., Killick S.W.: Monoamines and their metabolism in
some molluscs.- Comp.gen.Pharmac., 1972, 3, 282-295.
- Juorio A.V., Killick S.W.: The effect of drugs on the synthesis
and storage of monoamines in nervous tissues of molluscs.-
Intern.J.Neuroscience, 1972, 4, 195-202.
- Kerkut G.A., Cottrell G.A.: Acetylcholine and 5-hydroxytryptamine
in the snail brain.- Comp.Biochem.Physiol., 1963,
8, 53-63.
- Kerkut G.A., Sedden C.B., Walker R.J.: The effect of dopa,
 α -methyl-dopa and reserpine on the dopamine content
of the brain of snail *Helix aspersa*.- Comp.Biochem.
Physiol., 1966, 18, 921-930.
- Kerkut G.A., Sedden G.B., Walker R.J.: Uptake of DOPA and 5-hydroxy-
tryptophan by monoamine forming neurones in the brain
of *Helix aspersa*.- Comp.Biochem.Physiol., 1967,
23/1/, 159-162.
- Knoll J., Magyar K.: Some puzzling pharmacological effects of
monoamine oxydase inhibitors.- Adv.Biochem.Psychopharmac.,
1972, 5, 393-408.
- Koe B.K., Weissman A.: The pharmacology of parachlorphenylalanine a
selective depletor of serotonin stores.- Adv.Pharmacol.,
1968, 6B, 29-47.

- Lagerspetz K.Y., Tirri R.: Transmitter substances and temperature acclimation in Anodonta /Pelecypoda/.- *Annal.Zool. Fennici*, 1968, 5, 396-400.
- Lichtensteiger W., Mutzner V., Langemann H.: Uptake of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan by neurons of the central nervous system normally containing catecholamines.- *J.Neurochem.*, 1967, 14, 389-397.
- Loveland R.E.: 5-hydroxytryptamine, the probable mediator of excitation in the heart of *Mercenaria mercenaria*.- *Comp.Biochem.Physiol.*, 1963, 9, 95-104.
- Malmfors T., Sachs Ch.: Degeneration of adrenergic nerves produced by 6-hydroxydopamine.- *Eur.J.Pharmacol.*, 1968, 3, 89-92.
- Marczinsky T.: The fresh water clam *Anodonta cygnea* L., as a test object for serotonin and related compounds.- *Bull. Acad.Polon.Sci.Biol.*, 1959, 7, 147-150.
- Marsden C.A.: The occurrence of 5-hydroxyindoleacetic acid in the central nervous system of *Planorbis corneus*.- *Comp. gen.Pharmac.*, 1972, 3, 1-5.
- McCaman R.E., Dewhurst S.: Metabolism of putative transmitters in individual neurons of *Aplysia californica*. Acetylcholinesterase and catechol-o-methyl transferase.- *J. Neurochem.*, 1971, 18, 1329-1335.
- Mirolli M.: Discussion of evidence for an excitatory transmitter role of serotonin in molluscan central synapses.- *Adv. Pharmac.*, 1968, 6A, 393-394.

- Morton B.: Studies on the biology of *Dreissena polymorpha*
II. Correlation of the rhythms of adductor activity
feeding, digestion and excretion.- *Proc.Malac.Soc.*
London, 1969, 38, 401.
- Myers P.R.: Dopamine: localization of uptake in the pedal
ganglion of *Quadrula pustulosa* /Pelecypoda/.- *Tissue
and Cell*, 1974, 6/1/, 49-64.
- Myers P.R., Sweeney D.C.: The determination on the catecholamines
and their metabolites in the pedal ganglion of *Quadrula
pustulosa* /Mollusca, Pelecypoda/.- *Comp.gen.Pharmac.*,
1972, 3, 277-282.
- Myers P.R., Sweeney D.C.: Dopamine: the kinetics of uptake in the
pedal ganglion of *Quadrula pustulosa* /Pelecypoda/.-
Comp.gen.Pharmacol., 1973, 4, 321-325.
- Neff N.H., Barrett R.E., Costa E.: Kinetic and fluorescent histo-
chemical analysis of the serotonin compartments in rat
pineal gland.- *Eur.J.Pharmacol.*, 1969, 5, 348-356.
- Nemcsók J., Markova L.N., Hiripi L.: Monoamines in the central
nervous system of *Lymnaea stagnalis* /Gastropoda/ and
the effect of pharmacons on the monoamine level.- *Annal.
Biol.Tihany*, 1975, 42, /in press/.
- Osborne N.N., Cottrell G.A.: Occurrence of noradrenaline and
metabolites of primary catecholamines in the brain
and heart of *Helix*.- *Comp.gen.Pharmac.*, 1970,
1, 1-10.

- Osborne N.N., Cottrell G.A.: Distribution of biogenic amines in the slug, *Limax maximus*.- *Z.Zellforsch.*, 1971, 112, 15-30.
- Pécsi T., Salánki J.: The role of pressure in the periodical changes of cardiac action in the fresh water mussel /*Anodonta cygnea* L./.- *Annal.Biol.Tihany*, 1964, 31, 65-76.
- Pentreath V.W., Cottrell G.A.: Selective uptake of 5-hydroxytryptamine by axonal processes in *Helix pomatia*.- *Nature New Biology*, 1972, 239, 213-214.
- Pentreath V.W., Cottrell G.A.: Uptake of serotonin, 5-hydroxytryptophan and tryptophan by giant serotonin-containing neurones and other neurones in the central nervous system of the snail /*Helix pomatia*/.- *Z.Zellforsch.*, 1973, 143, 21-35.
- Quay W.B.: Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod.- *Gen.Comp.Endocrinol.*, 1963, 3, 473-479.
- Quay W.B.: Twenty-four-hour rhythms in cerebral and brainstem contents of 5-hydroxytryptamine in a turtle, *Pseudemys scripta elegans*.- *Comp.Biochem.Physiol.*, 1967, 20, 217-221.
- Robinson J.D., Anderson J.H., Green J.P.: The uptake of 5-hydroxytryptamine and histamine by particulate fractions of brain.- *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1965, 147, 236-243.

Rude S.:

Ph.D.Thesis, Harvard University, Cambridge, Mass., 1967.

Sakharov D.A., Zs.-Nagy I.: Localization of biogenic monoamines in cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis* L.- *Acta biol. Acad.Sci.hung.*, 1968, 19, 145-157.

Salánki J.: The effect of serotonin and catecholamines on the nervous control of periodic activity in fresh water mussel /*Anodonta cygnea* L./.- *Comp.Biochem.Physiol.*, 1963, 8, 163-171.

Salánki J.: Oxygen level as a specific regulator in the rhythmic activity of fresh-water mussel /*Anodonta cygnea* L./.- *Acta biol.Acad.Sci.hung.*, 1965, 15/3/, 299-310.

Salánki J.: Endogén ritmusok szabályozása.- Doktori értekezés, 1970.

Salánki J.: Control of periodicity by non oscillating external factors in Pelecypoda.- *J.Interdiscipl.Cycle Res.*, 1971, 2, 181-186.

Salánki J.: Serotonin in the neural regulation of the bivalve mollusc, *Anodonta cygnea* L.- In: *Recent Development of Neurobiology in Hungary III. Res. in Neuroanat., Neurophysiol., Neuropathophysiol., Neuropharmacol.* /Ed.: Lissák K./, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1972, 67-89.

Salánki J., Balla L.: Ink level equipment for continuous recording of activity in mussels.- *Annal.Biol.Tihany*, 1964, 31, 117-121.

- Salánki J., Lukacsovics F.: Filtration and O₂ consumption related to the periodic activity of fresh water mussel /*Anodonta cygnea* L./.- *Annal.Biol.Tihany*, 1967, 34, 85-98.
- Salánki J., Zs.-Nagy I., Hiripi L.: Nissl substance and serotonin level in the ganglia of the fresh-water mussel /*Anodonta cygnea* L./ after treatment with actinomycin-D, in relation to activity regulation.- *Comp.Biochem.Physiol.*, 1968, 27, 817-825.
- Salánki J., Hiripi L.: Increase of serotonin in the adductors of *Anodonta cygnea* L./Pelecypoda/ relaxed by nerve stimulation and in relation to the periodic activity.- *Comp.Biochem. Physiol.*, 1970, 32, 629-636.
- Salánki J., Hiripi L., Nemcsók J.: Seasonal variations of activity and serotonin level in the fresh-water mussel, *Anodonta cygnea* L.- *Zool.Jb.Physiol.*, 1974, 78, 369-377.
- Schellenberger M.K., Gordon J.H.: A rapid, simplified procedure for simultaneous assay of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine from discrete brain areas.- *Anal. Biochem.*, 1971, 39, 356-372.
- Schlieper C., Kowalski R.: Weitere beobachtungen zur ökologischen Physiologie der Milsmuschel *Mytilus edulis* L.- *Kieler Meeresforsch.*, 1957, 13, 3-10.
- Sedden C.B., Walker R.J., Kerkut G.A.: The localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in neurones of *Helix aspersa*.- *Symp.Zool.Soc.London*, 1968, 22, 19-32.

- Shaskan E.G., Snyder S.H.: Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain: relationship to catecholamine uptake.- *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1970, 175, 404-418.
- Snyder S.H., Axelrod J., Zweig M.: A sensitive and specific fluorescence assay for tissue serotonin.- *Biochem.Pharmacol.*, 1965, 14, 831-835.
- Snyder S.H., Green A.J., Hendley E.D.: Kinetics of ^3H -norepinephrine accumulation into slices from different regions of the rat brain.- *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1968, 164, 90-102.
- Snyder S.H., Coyle J.T.: Regional differences in ^3H -norepinephrine and ^3H -dopamine uptake into rat brain homogenates.- *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1969, 165, 78-86.
- Snyder S.H., Hendley E.D., Gfeller E.: Regional differences in accumulation of ^3H -norepinephrine ^3H -5-hydroxytryptamine and ^3H -gamma-aminobutyric acid in brain slices of Spider and Rhesus monkey.- *Brain Res.*, 1969, 16, 469-477.
- Snyder S.H., Kuhar M.J., Green A.J., Coyle Y.T., Shaskan E.G.: Uptake and subcellular localization of neurotransmitters in the brain.- *Int.Rev.of Neurobiology.* /Ed.: Pfeiffer C.C./, 1970, Vol.13, Academic Press, New York, London.
- Spafford D.C., Pengelley E.T.: The influence of the neurohumor serotonin on hibernation in the golden manted ground squirrel, *Citellus lateralis*.- *Comp.Biochem.Physiol.*, 1971, 38A, 239-250.
- S.-Rózsa K., Graul C.: Is serotonin responsible for the stimulative effect of the extracardial nerve in *Helix pomatia*?- *Annal.Biol.Tihany*, 1964, 31, 85-96.

- S.-Rózsa K., Perényi L.: Chemical identification of the excitatory substances released in *Helix* heart during stimulation of the extracardial nerve.- *Comp.Biochem.Physiol.*, 1966, 19, 105-113.
- S.-Rózsa K., Pécsi T.: Comparative studies on the effect produced by biologically active agents on the isolated hearts of *Helix pomatia* L. and *Anodonta cygnea* L.- *Annal.Biol. Tihany*, 1967, 34, 59-72.
- Sweeney D.: Dopamine: its occurrence in molluscan ganglia.- *Science*, 1963, 139, 1051.
- Sweeney D.: The anatomical distribution of monoamines in a fresh water bivalve Mollusc, *Spherium sulcatum* L.- *Comp. Biochem.Physiol.*, 1968, 25, 601-613.
- Sweeney D.: The synthesis of dopamine from DOPA in the ganglia of *Mercenaria mercenaria* /Mollusca, Pelecypoda/.- *Comp. Biochem.Physiol.*, 1969, 30, 903-907.
- Thoa N.B., Eccleston D., Axelrod J.: The accumulation of ^{14}C -serotonin in the guinea-pig vas deferens.- *J.Pharmacol.Exp. Ther.*, 1969, 169, 68-73.
- Thoenen H., Tranzer J.P.: Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxy-dopamine.- *Arch.Exp.Pathol.Pharmacol.*, 1968, 261, 271-288.
- Uuspää V.J.: The 5-hydroxytryptamine content of the brain and some other organs of the hedgehog /*Erinaceus europeus*/ during activity and hibernation.- *Experientia*, 1963, 19, 156-158.

- Véró M., Salánki J.: Inductive attenuator for continuous registration of rhythmic and periodic activity of mussels in their natural environment.- Med.and biol.Engng., 1969, 7, 235-237.
- Welsh J.H.: Serotonin as a possible neurohumoral agent evidence obtained in lower animals.- Annal.N.Y.Acad.Sci., 1957, 66, 618-630.
- Welsh J.H., Moorhead M.: The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in the nervous system.- J.Neurochem., 1960, 6, 146-169.
- Zs.-Nagy I.: Histochemical and electron microscopic studies on the relation between dopamine and dense-core vesicles in the neurons of *Anodonta cygnea* L.- In: Neurobiology of Invertebrates. /Ed.: Salánki J./ Akadémiai Kiadó, Budapest and Plenum Press, New York, 1968.
- Zs.-Nagy I., S.-Rózsa K., Salánki J., Földes I., Perényi L., Demeter M.: Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of Lamelli-branchiates.- J.Neurochem., 1965, 12, 245-251.