

(Na⁺-K⁺)-AKTIVÁLTA ATPÁZ SZEREPE A NEUROKÉMIAI TRANZMISSZIÓBAN

VIZI E. SZILVESZTER és TÖRÖK TAMÁS

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Gyógyszertani Intézete, Budapest

Az evolúció során kialakult, hogy az állati szövetekben az ionok intra- és extracelluláris eloszlása különböző. Az intracelluláris közeg K⁺-ban és organikus anionokban gazdag, ugyanakkor Na⁺-ban és Cl⁻-ban szegény. Ennek ellenkezője érvényes az extracelluláris térben. Ez az egyenetlen ion megoszlás számos fiziológiai jelenségben játszik fontos szerepet. Így pl. az ion grádiensnek döntő szerepe van az impulzusok idegi vezetésében (HODGKIN 1964), az intracelluláris K⁺ viszont nagyon sok enzim működéséhez (acetyl-CoA-szintetáz, purivátkináz, stb.) szükséges.

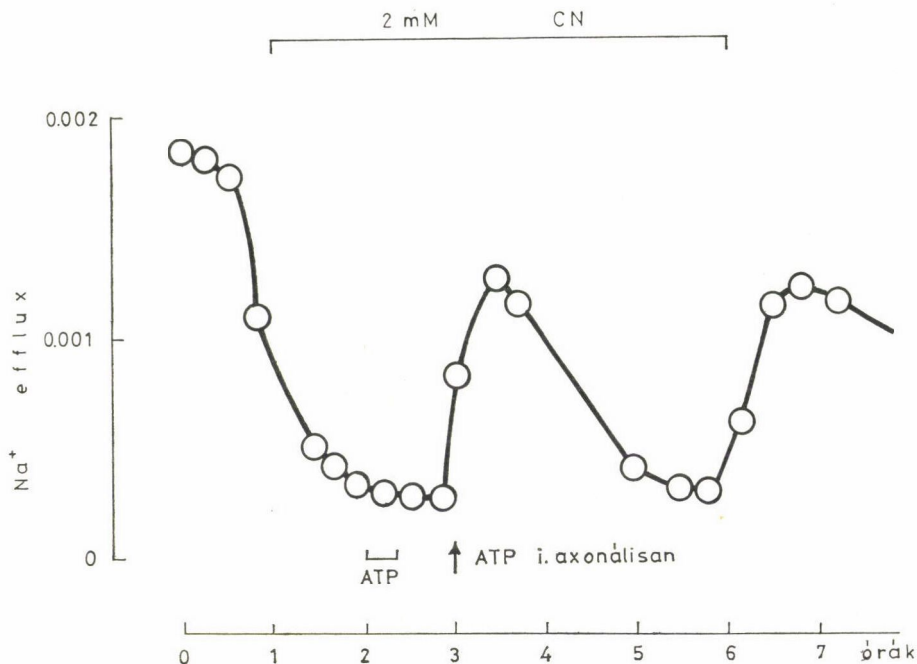
A sejtek membránja polarizált: belső felszínük negatív a külsőhöz viszonyítva. A belső felszín negativitása a K⁺ számára könnyebbé teszi a mozgást, ugyanakkor, a kémiai grádiens is az ilyen irányú mozgást segíti elő. A Na⁺ számára viszont mind a kémiai, mind az elektromos grádiens gátlólag hat. Így a Na⁺ sejtből való kilépéséhez energia szükséges, mely energiát a Na-pumpa szolgáltatja (I. SKOU 1975).

CALDWELL, HODGKIN, KEYNES és SHOW (1960) szolgáltatottak elsőként direkt bizonyítékot arra, hogy a Na⁺ effluxhoz energia szükséges. Kísérleteinkben azt tapasztalták, hogy tintahal óriás axonjából a radioaktív Na⁺ kiáramlása CN-al, DNP-al és aziddal gátlható volt. Az ATP intracelluláris adásánál a Na⁺ kiáramlása ismételtelen megindult (1. ábra). Az extracellulárisan adott ATP viszont hatástalannak bizonyult. Hasonló bizonyítékot kaptak vörösvérsejtek esetében is. A fő probléma azonban annak bizonyítása, hogy melyik energia gazdag vegyület szállítja az energiát. Gárdos által kidolgozott rendkívül szellemes metodikával sikerült végül is igazolni, hogy Na⁺-t csak akkor pumpál ki a sejt, ha intracellulárisan Na⁺ és ATP van jelen. A pumpa aktivitásához tehát ATP jelenléte szükséges.

STRAUB (1952, 1953), GÁRDOS (1954), valamint GÁRDOS és STRAUB (1957) megállapították, hogy vörösvérsejtekben az egyenlőtlen ion megoszlása mindaddig fennáll, amíg a vörösvérsejtekben elegendő ATP van jelen. GÁRDOS és STRAUB (1957) az találta, hogy a K⁺vesztés fordított arányban áll az intracelluláris ATP koncentrációval.

SKOU (1957) felfedezése, hogy az idegszövetben egy membránhoz kötött ATPáz van jelen, amely Na⁺ és K⁺ ionokkal aktiválható, továbbá az a követ-

keztetés, hogy a membrán ATPáz és a Na^+ , valamint K^+ transzport között szoros összefüggés áll fenn, indította meg azokat a kutatásokat, amelyek az enzim részleges vagy teljes fiziológiai szerepének tisztázásához vezettek. Az ATP hidrolízise két lépésből áll (l. SKOU 1965, SOMOGYI 1968, 1973); a protein Na^+



1. ábra. CALDWELL, HODGKIN, KEYNES és SHAW (1960) klasszikus kísérlete, amellyel bizonyították, hogy a Na^+ kipumpálásához energia kell és ezt az energiát ATP szolgáltatni tudja.

függő foszforilációja, melyet K^+ függő defoszforiláció követ. A membrán ATPáz működése közben a Na^+ a membránon keresztül K^+ -ra cserélődik ki, miközben egy intracelluláris ATP lebomlik ADP-re és anorganikus P-ra. A pumpa aktivitásához intracelluláris Na^+ -ra és extracelluláris K^+ -ra van szükség. A Na^+ enzim rendszerhez való affinitás a membrán belső oldalán mintegy 6–8-szor erősebb, mind a K^+ -é. A külső oldalon a helyzet fordított, itt a K^+ affinitása az enzim rendszerhez jóval erősebb, mint a Na^+ -é (GLYNN 1962, LARIS és LETCHWORT 1962, WHITTAM 1962, GARRAHAN és GLYNN 1967 a., b.) Intracellulárisan az enzim aktiválásához Mg^{2+} jelenlétére is szükség van. A membrán külső oldalán számos kation képes helyettesíteni a K^+ -ot az enzim aktiválásában, amelyek hatékonysági sorrendje a következő: $\text{K} > \text{Rb} > \text{NH}_4 > \text{Cs} > \text{Li}$ (SKOU 1965). A Ti^+ hasonló hatású, azonban mintegy 10-szer erősebb a K^+ -nál. (BRITTEN és BLANK 1968).

A preszinaptikus membrán Na⁺-K⁺/-aktiválta ATPáz enzimjének szerepe a transzmitter felszabadulásában.

A transzmitter anyag, amely az elektromos jelenségek kémiai átvitelében játszik fontos szerepet, preszinaptikusan helyezkedik el. Ez az elrendeződés is biztosítja az ideg ingerület egyirányú vezetését. A szinapszis működését a triódához lehet hasonlítani, a transzmitter azt a funkciót tölti be, amit az elektron: egyenirányít.

1. Az ACh felszabadulás, mint a Na⁺-K⁺/-aktiválta ATPáz aktivitás gátlásának eredménye

Korábbi munkáinkban (VIZI 1972, 1973, 1974b, 1975 a, b, 1977, PATON, VIZI és ZAR 1971) kimutattuk, hogy azok a kísérleti feltételek amelyek a (Na⁺-K⁺)-aktiválta ATPáz enzim gátlásához vezetnek ACh felszabadulást okoznak a centrális és perifériás kolinerg ideg végkészülékből. POULSEN (1974) oubain hatására észlelt ACh felszabadulást macska szubmandibuláris paraszimpatikus idegéből. Ouabain, PCMB, Na⁺- és K⁺-hiány, N-etilmaleimid (NEM), Ca²⁺ helyettesítése Ba²⁺-al, etakrinsav, amelyek valamennyien a membrán ATPázt szignifikánsan gátolják, fokozták az ACh felszabadulását a végkészülékből (1. és 2. táblázat). Ezekből a kísérletekből azonban még nem lehet azt a követ-

1. táblázat

(Na⁺ — K⁺)-aktiválta membrán ATPáz gátlás ACh-t felszabadító hatása izolált patkány agykéreg szeletben

Kezelés	Acetil kolin		
	felszabadulás	pmol.g ⁻¹ min ⁻¹	S.E.M.
	kontroll	kezelt *	P
Na ⁺ -hiány (3)	32,2 ± 2,1	92,3 ± 22,7	< 0,01
Ouabain(2 × 10 ⁻⁵ M) (3)	34,4 ± 9,8	218,3 ± 58,2	< 0,01
Ouabain (2 × 10 ⁻⁵ M) + Ca-hiány,EGTA (1 mM) (3)	35,6 ± 4,0	164,8 ± 9,8	< 0,01
Ouabain (2 × 10 ⁻⁵ M) + TTX (1 μM) (4)	23,8 ± 5,6	95,6 ± 23,1	< 0,01
p-kloromerkuribenzoát(PCMB), 5 × 10 ⁻⁴ M	20,5 ± 1,6	72,5 ± 13,2	< 0,01
N-etilmaleimid, 5 × 10 ⁻³ M (6)	25,3 ± 3,1	87,4 ± 7,5	< 0,01
NaF, 4 × 10 ⁻³ M (6)	38,8 ± 2,8	79,1 ± 7,1	< 0,01
Quinidin, 10 ⁻³ M (4)	40,9 ± 5,2	154,2 ± 10,3	< 0,01
Etakrinsav,			
Klorpromazin, 10 ⁻³ M (4)	22,1 ± 1,5	92,4 ± 8,5	< 0,01
Ba ²⁺ , 2 × 10 ⁻³ M + Ca ²⁺ -hiány (3)	30,0 ± 3,2	65,4 ± 3,9	< 0,01
Cu ²⁺ , 1,5 × 10 ⁻⁴ M (8)	33,3 ± 4,8	59,0 ± 17,2	< 0,05

* Az ACh felszabadulást 10 percenként mértük a vegyület adása után 30–70 percig és a legmagasabb (10 perc alatt mért) felszabadulási sebességet vettük figyelembe a táblázat összeállításánál. Krebs oldat, ezerin szulfát (2 μg/ml). Na⁺-hiányos oldatnál az összes Na⁺-t szukrózzal helyettesítettük, a HCO₃⁻-t KHCO₃ formájában tettük az oldatba, a KCl-t és a KH₂PO₄-t elhagytuk.

Bárium oldatnál a CaCl₂-t BaCl₂-al, a MgSO₄-t MgCl₂-al helyettesítettük. Cu²⁺ adásánál CuSO₄-t használtunk.

2. táblázat

(Na⁺-K⁺)-aktiválta membrán ATPáz gátlás ACh-t felszabadító hatása patkány agy különböző részeiben

	Acetil kolin		
	Tartalom, nmol · g ⁻¹ (SEM)	Felszabadulás, pmol · g ⁻¹ · min ⁻¹ (SEM)	
		kontroll	+ ouabain (2 × 10 ⁻⁵ M)
Cortex	4,82 ± 0,55 (4)	18,3 ± 1,3 (6)	210,6 ± 13,4 (10)
Bazális ganglion	8,62 ± 1,03 (4)	24,6 ± 3,1 (8)	97,1 ± 16,5 (4)
Cerebellum, cortex	1,4 ± 0,06 (5)	6,0 ± 0,58 (4)	23,5 ± 1,05 (4)
Cerebellum, n. interpositus	—	7,0 ± 3,1 (3)	13,4 ± 2,5 (3)

Patkány agy kéregnél és bazális ganglionnál a gyűjtési idő: 10 perc, cerebellumnál 30 perc. Izolált szeletek összsúlya 100–200 mg. Ouabain kezelésnél 50–80 percig mértük a felszabadulást és a legnagyobb mért felszabadulási sebességet tüntettük fel a táblázatban. Ezerin szulfát, 2 µg/ml. Zárójelben a kísérletek száma.

keztetést levonni, hogy a membrán ATPáz aktivitás gátlása *per se* lenne az ACh felszabadulás oka. A membrán ATPáz gátlása olyan változásokat is létrehoz a preszinaptikus membránban, amelyek maguk is részben, vagy teljesen felelőssé tehetők az ACh felszabadulásért. A membrán ATPáz gátlása a következő változásokat hozhatja létre:

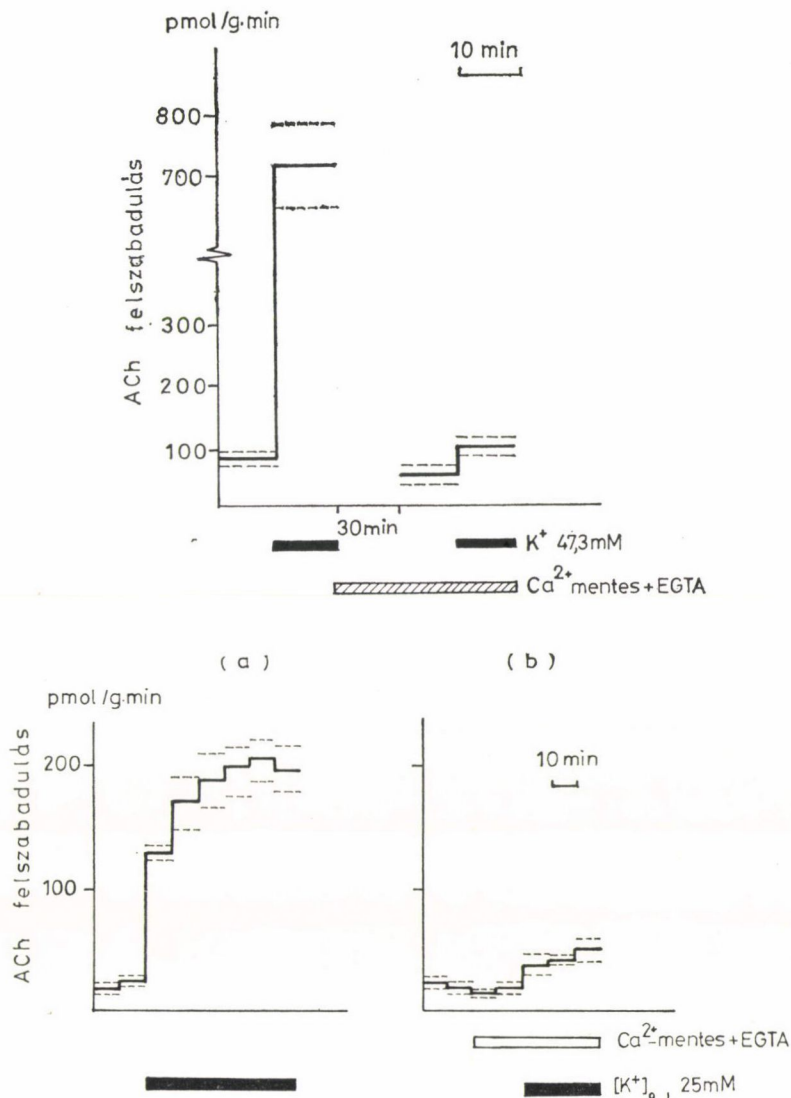
- depolarizációt,
- intracelluláris Na⁺ emelkedést,
- fokozott Ca²⁺ belépést,
- az ACh felvételének gátlását,
- az axon tüzelésének fokozódását.

a) Depolarizáció

LILEY (1956) neuromuszkuláris szinapszisban azt találta, hogy a miniatűr véglemezpotenciálok frekvenciája, amely az ACh felszabadulásnak indirekt jele, a depolarizáció mértékétől függött. Kísérleteinkben (2. ábra a, b) 47.3 ill. 24 mM K-al depolarizáltuk a véglemezt és ACh szabadult fel. Ez a felszabadulás teljesen gátolható volt ha a Krebs oldatból a Ca²⁺ hiányzott és ha 1 mM EGTA pufferrel biztosítottuk, hogy a Ca²⁺ koncentráció ne legyen magasabb 10⁻¹⁰–10⁻⁹ M-nál. Mivel a membrán ATPáz bénítók Ca²⁺ hiányban is képesek voltak ACh-t felszabadítani (VIZI 1972, 1975b), így kizárható az a lehetőség, hogy a membrán ATPáz bénulása következtében létrejövő nyugalmi potenciál csökkenés (depolarizáció) volna az ACh felszabadulás oka.

Ha a végkészülék úgy működik, mint egy K-elektroda és követi a Nerst egyenletet, akkor a membrán potenciál (V_m)

$$V_m \simeq E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{K^+_i}{K^+_o}$$



2. ábra. [K⁺]_o koncentráció emelésével felszabadított ACh felszabadulás [Ca²⁺]_o-függősége perifériás kolinerg ideg (a) és centrális kolinerg ideg (b) végkészülékeiből. Krebs oldat, a NaCl koncentrációját csökkentettük oly mértékben, hogy a KCl koncentrációjának emelése ne változtassa meg az iozmolaritást. Perifériás kolinerg ideg = tengeri malac izolált ileum hosszanti simaizom (Auerbach plexus) PATON és VIZI (1969) módszere szerint preparálva, centrális kolinerg ideg = patkány izolált agykéreg szelet. ACh felszabadulás mérése: lásd PATON és VIZI (1969)

ahol

V_m = membrán potenciál
 E_K = equilibrium potenciál
 R = 8314 joule/fok

$T = 273 + t$, t = kísérleti hőmérséklet

$z = 1$ (K^+ oxidációs száma)

$F = 96500$ Cb (Faraday féle állandó)

K^+_i = extracelluláris K^+ koncentráció

K^+_o = intracelluláris K^+ koncentráció

Patkány agyból preparált szinaptoszóma, mint egy perfekt K-elektroda működik (BLAUSTEIN és GOLDRING 1975). Így jogos feltételezni, hogy a végkészülék funkcionális egységben is hasonlóan viselkedik. A végkészülék intracelluláris K^+ koncentrációját RANG és RITCHIE (1968) vagus C-roston nyert adatait véve figyelembe 165,5 mM-nak vettük. Az egyenletbe behelyettesítve

$$E_K = 0,0611 \log \frac{K^+_i}{K^+_o}$$

$$E_K = 0,0611 \log \frac{165,5}{5,9}$$

$$E_K = 0,0885 \text{ V}$$

$$E_K = 88,5 \text{ mV}$$

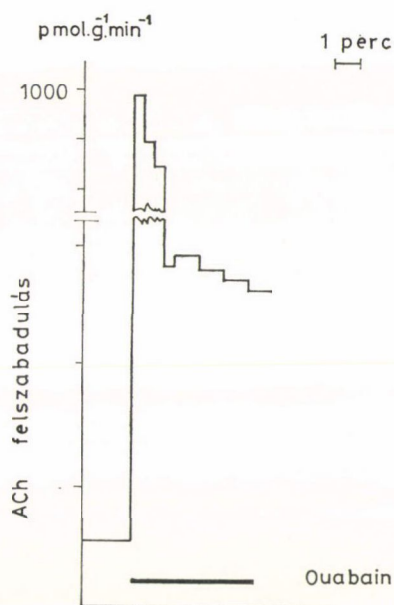
Tehát 5.9 mM $[K^+]_o$ mellett 88.5 mV a nyugalmi potenciál.

Ez az érték 24.7 illetve 47.3 mM $[K^+]_o$ mellett elméletileg 50.5, illetve 33.2 mV. Az ACh felszabadulás sebessége ($\text{pmol g}^{-1}\text{min}^{-1}$) és a külső K^+ koncentráció között 3—4-ed fokú összefüggést találtak (LILEY 1956, PATON és mtsai 1971) akkor, amikor a külső K koncentráció > 20 mM. Mivel a nyugalmi potenciál változása is csak akkor követi a Nerst egyenletet, ha $[K^+]_o > 20$ mM, így igen valószínű, hogy a $[K^+]_o$ koncentráció emeléssel együttjáró nyugalmi potenciál változása okozza az ACh felszabadulást.

b) Intracelluláris Na^+ emelkedése

BIRKS (1963), BIRKS és COHEN (1968) szerint az intracelluláris Na^+ emelkedése szoros összefüggésben van az ACh felszabadulással. Digitálisz glikozidák, amelyek gátolják a membrán ATPáz, fokozták a neuromuszkuláris junkcióban a miniatűr véglemezopotenciálok frekvenciáját (BIRKS 1963), ELMGUIAT és FELDMANN 1965, BIRKS és COHEN 1968, BAKER és CRAWFORD 1975), amely tulajdonképpen a nyugalmi ACh felszabadulás indirekt bizonyítéka. Na^+ -hiányos Krebs oldatban az Auerbach plexus (PATON, VIZI és ZAR 1971), valamint az agykéreg végkészülékeiből (VIZI 1972, 1975b) is észleltünk szignifikáns ACh felszabadulást, amely Ca^{2+} -hiányában is tapasztalható volt. Ilyen kísérleti körülmények között az intracelluláris Na^+ emelkedése semmi esetre sem várható, bár a membrán ATPáz gátolva van. Hogy a membrán ATPáz bénulás nem az intracelluláris Na^+ megemelésével hoz létre ACh felszabadulást, bizonyítja még az a tény is, hogy ha az extracelluláris Na^+ -t teljesen Li^+ -ra cserél-

jük ki, úgy is az ACh felszabadulás szignifikáns emelkedése tapasztalható (VIZI és mtsai 1972, VIZI 1974a). Az a tény, hogy az ouabain alkalmazása után (1. 3. ábra) 10 mp-en belül szignifikánsan fokozódik az ACh felszabadulása, szintén azt bizonyítja, hogy az ACh felszabadulás oka a membrán ATPáz gátlása és nem az intracelluláris Na⁺ felhalmazódásának következménye, hiszen ilyen rövid idő alatt a Na⁺ nem tud felszaporodni. Bár meg kell jegyezni, hogy a vég-



3. ábra. Ouabain ACh felszabadulást okozó hatása. Tengeri malac hosszanti simaizom (Auerbach plexus) preparátum. Krebs oldat, 95% O₂ + 5% CO₂. ACh felszabadulást PATON és VIZI (1969) módszerével mértük. Figyeld meg, az ouabain adása után azonnal (15 mp) jelentkező ACh felszabadulást. VIZI (J. Physiology, 226 95–117, 1972) közleményéből újra rajzolva.

készülék felszínének és térfogatának aránya nagy, így gyors ionális változások képzelhetők el. BIRKS elképzelése ellen szólnak továbbá KATZ és MILEDI (1967), valamint RAHAMIMOFF (1970) kísérletei, akik azt találták, hogy az extracelluláris Na⁺ teljes kicserélése Ca²⁺-ra sem befolyásolja a végkészülék direkt depolarizációjának ACh-t felszabadító hatását. Tehát teljes Na⁺ hiányban, amikor az intracelluláris Na⁺ felszaporodása elképzelhetetlen, ugyancsak van ACh felszabadulás.

c) Fokozott Ca²⁺ belépés

Általánosan ismert, hogy ha az extracelluláris térből megvonjuk a Ca²⁺-t a kémiai szinapszis nem működik, az impulzus nem jut át a preszinaptikus membránról a posztzinaptikus membránra. KATZ és MILEDI (1965, 1969) kimutatták, hogy Ca²⁺ hiányban az idegi impulzus bár deporalizálja a vég-

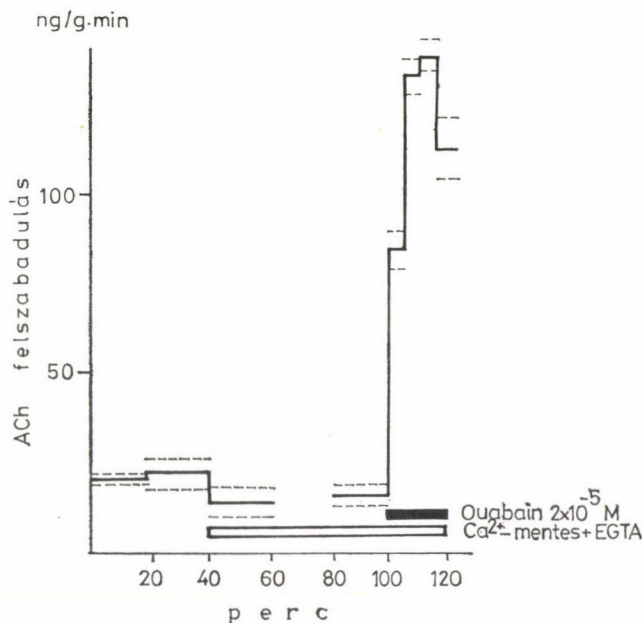
készüléket, transzmitter nem szabadul fel. A 2. ábra mutatja, hogy magas K^+ koncentráció (47.3 mM) okozta depolarizáció ACh-t felszabadító hatása is Ca^{2+} függő. KATZ és MILEDI (1967, 1969) igazolta, hogy a Ca^{2+} influx a legfontosabb az ACh felszabadulásában. BIRKS és COHEN (1968) tovább fejlesztve BIRKS (1963) elméletét, a transzmitter felszabadulást most már nem az intracelluláris Na^+ felszabadulásával, hanem az ezt követő Ca^{2+} belépéssel magyarázta. Ez az elmélet nagyon jól összhangban áll azzal a megfigyeléssel, hogy a Ca^{2+} influx fokozódik ouabain kezelésnél (STAHL és SWANSON 1969), akcióspotenciálnál (KATZ és MILEDI 1965, 1967, MILEDI és SLATER 1966), valamint tartós depolarizációnál (HODGKIN és KEYNES 1957). Valamennyi kísérleti feltételről ugyanakkor ismert, hogy fokozott ACh felszabadulást eredményez.

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

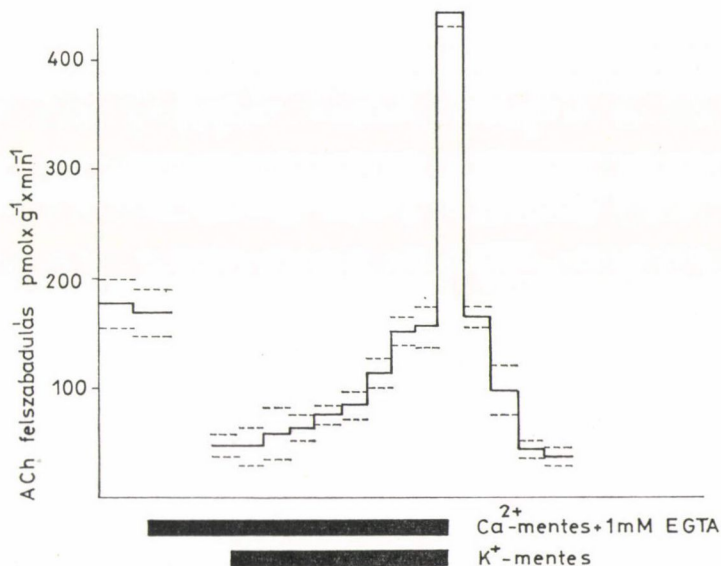
Olyan kísérleti feltételek mellett, amikor a (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz gátoljuk (ouabain, PCMB, Na^+ -hiány, NEM, K^+ -hiány, stb.) az intracelluláris Na^+ felszaporodik és ez egy fokozott Ca^{2+} influxot eredményez. Valóban kimutatták, hogy az ouabain megnöveli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját cortex szeleteken (OKAMOTO és QUASTEL 1970, SWANSON 1968) és izolált szinaptikus végkészüléken (BLAUSTEIN és WEISMANN 1970).

Így jogosan merül fel az a probléma, hogy a membrán ATPáz gátlók alkalmazása esetén a felfokozott Ca^{2+} belépés lenne az ACh felszabadulás oka. Ha a membrán ATPáz gátlás *per se* szabadítja fel az ACh-t, akkor nyilvánvalóan az ATPáz bénítóknak Ca^{2+} hiányában is ACh felszabadulást kell okozniuk. A 4. ábra mutatja, hogy ouabain Ca^{2+} hiányban is megemeli az ACh felszabadulást. Egyébként a Ca^{2+} megvonás a Na^+ hiány ACh felszabadító hatását sem gátolja meg az Auerbach-plexus kolinerg végkészülékeiből (PATON, VIZI és ZAR 1971). Meg kell azonban jegyezni, hogy Ca^{2+} hiányos oldatban az ouabain kevesebb ACh-t szabadított fel (1. 2. táblázat). Minden valószínűség szerint a felfokozott Ca^{2+} belépés additív módon fokozza az ACh felszabadulást. A membrán ATPáz gátlás következtében létrejövő fokozott Ca^{2+} belépés ACh-t felszabadító hatása különösen kifejezetten érvényesül a K^+ mentes oldatban (1. 5. ábra). K^+ -mentes oldatban, amikor Ca^{2+} sines az oldatban az ACh felszabadulás fokozódása 20–30 perc késéssel jelentkezik és lényegesen kisebb, mint amikor Ca^{2+} is van jelen (hasonlítsd össze az 5. és 6. ábrát). Egyébként digoxin Ca^{2+} -hiányban és Mg^{2+} jelenlétében is megemeli a miniatűr véglemmez potenciál frekvenciáját (BIRKS és COHEN 1968).

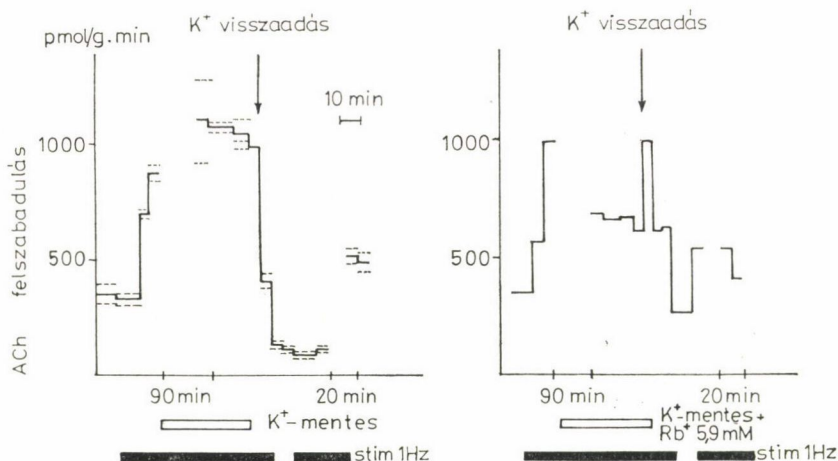
Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy ha membrán ATPáz bénítókat, vagy olyan kísérleti feltételeket alkalmazunk, amikor a (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz gátolva van, nem szükséges az extracelluláris Ca^{2+} jelenléte az ACh felszabaduláshoz.



4. ábra. Ouabain ACh felszabadító hatása Ca²⁺-mentes kísérleti feltételek között.



5. ábra. K⁺-hiány ACh felszabadító hatása Ca²⁺-hiányos Krebs oldatban. Visszaadott K⁺ és Ca²⁺ hatása az ACh felszabadulásra. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom (Auerbach plexus) preparátum. Krebs oldat, 95% O₂ + 5% CO₂. ACh felszabadulást PATON és VIZI (1969) módszerével mértük. Figyeld meg, hogy a Ca²⁺-mentes közegben a K⁺-megvonása megnöveli az ACh felszabadulást. Ca²⁺ és K⁺ visszaadása után egy átmeneti gyors ACh felszabadulás fokozódás, majd csökkenés követi. Az előbbi a gyors Ca²⁺-influx és a következő a membrán ATPáz gátlás, az utóbbi a membrán pumpa fokozott aktivitásával van valószínűleg összefüggésben.



6. ábra. Membrán ATPáz gátlás (K^+ -megvonás) és membrán ATPáz izgatás (K^+ -visszaadás) hatása, az ACh felszabadulásra. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom (Auerbach plexus) preparátum. Krebs oldat, 95% O_2 + 5% CO_2 . „Field ingerlés”, 1 Hz, 1 mesec, szupramaximális inger (10 V/cm). K^+ -megvonás (a) megemeli az ACh felszabadulást ingerlés hatására is, ha KCl-t RbCl-al pótolva van (b), a K^+ -visszaadás hatására nem gátlódik az ACh felszabadulás.

Természetesen felmerül az a lehetőség is, hogy pl. oubain hatására a mitokondriumokból szabadul fel a Ca^{2+} , megnövelve ezáltal az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját s ez az ACh felszabadulás oka. Korábbi kísérleteinkben (VIZI 1972) kimutattuk, hogy KCN (10^{-3} M) vagy DNP (6×10^{-4} M) csak kismértékben emelte meg az ACh felszabadulását, bár a mitokondriumokból jelentős mennyiségű Ca^{2+} -t szabadítanak fel (BAKER és mtsai 1967). Izolált patkány agykéregből DNP után 10 perccel az ACh felszabadulás $34,06 \text{ pmol g}^{-1}\text{min}^{-1}$ -ről $44,68 \text{ pmol g}^{-1}\text{min}^{-1}$ -re emelkedett (VIZI 1972). Ez a növekedés (23,8%-os) lényegesen kisebb, mint amit membrán ATPáz gátlókkal el lehet érni (100–400%). FISCHER és mtsai (1974) kísérleteikben izolált patkány agykéreg szeleten DNP hatására 50%-os emelkedést mértek. BEANI és mtsai (1966) viszont, a DNP-t hatástalannak találták m.e.e.p. frekencicát mérve, ami azt jelenti, hogy nem fokozta az ACh-felszabadulását a neuromuszkuláris junkcióban. Egyébként MILEDI és SLATER (1966) azt észlelte, hogy Ca^{2+} -mentes oldatban tintahal óriás axonjából nem szabadul fel transzmitter ha Ca^{2+} -t adtak intracellulárisan. Ugyanis akkor igen kis mennyiségű Ca^{2+} lokális extracelluláris alkalmazásakor a szinapszis ismét működni kezdett. Néhány évvel később viszont MILEDI (1973) közölte, hogy *Loligo vulgaris* ganglion preparátumán tetrodotoxin jelenlétében Ca^{2+} intracelluláris adása még az extracelluláris Ca^{2+} megkötése (La^{3+} vagy Mn^{2+}) esetében is néhány tized milivoltos depolarizációt okoz a posztzinaptikus membránon, amely valószínűleg a transzmitter felszabadulás jele. Ez azt jelentené, hogy az intracelluláris Ca^{2+} a bazális membrán belső felszínén is olyan változásokat tud létrehozni, amelyek

transzmitter felszabaduláshoz vezetnek. E kísérlet sorozatban azonban nem lehetett kizárni annak lehetőségét, hogy a Ca²⁺-pipetta intracelluláris bevezetésénél a membránnak egy olyan sérülése jön létre, amely lehetővé teszi, hogy a Ca²⁺ kiszökjön (leakage) és így ez intracellulárisan adott Ca²⁺ tulajdonképpen a membrán külső részén gátolná a membrán ATPáz, ami azután transzmitter felszabadulást eredményezne. Természetesen az is lehetséges, hogy a membrán ATPáz nem tesz különbséget a kívülről befelé, vagy belülről kifelé haladó Ca²⁺ között. Bárhonnan is jön a Ca²⁺ (fiziológiásan kívülről befelé) az gátolni képes a membrán ATPáz, melynek eredménye ACh felszabadulás.

Véleményünk szerint fiziológiás körülmények között a Ca²⁺ játssza azt a szerepet, amit a fenti kísérleti körülmények között a membrán ATPáz bénítók.

d) *Acetilcolin felvételének gátlása*

A neurokémiai transzmitter anyagoknak az elbontó enzimen kívül a másik jelentős inaktivációs mechanizmusa a szöveti felvétel (uptake). Noradrenalin esetében ezt egyértelműen bizonyítottuk vehetjük (l. IVERSEN 1967). A NA-nak nincs olyan elbontó enzimje, amely extraneuronálisan helyezkedne el és rendkívül nagy aktivitással bontaná le a felszabadult NA-t. A katekoloximetiltranszferáz (COMT) bár extracellulárisan helyezkedik el, de nagyon lassan bontja a NA-t, így fiziológiásan a gyors felvétel játszik döntő szerepet a NA inaktiválásában. Ezzel szemben viszont az ACh végkészülékbe való visszavétele nem jelentős. Azonban a pre- és posztzinaptikusan elhelyezkedő kolineszteráz gyorsan elbontja a felszabadult ACh-t kolinra és ecetátra és a kolin biológiailag már inaktív. A végkészülék kolin vesztel, mely az ACh reszintézisében játszik szerepet. LIANG és QUASTEL (1969) patkány agykéreg szeleten kimutatták, hogy az ouabain egy nem kompetitív gátlója az ACh felvételnek. Amikor a felszabadult ACh mennyiségét mérjük, akkor kolineszteráz bénítót — ezerint — is alkalmazunk. Ezerin maga is gátolja (MANN és mtsai 1939, ELLIOT és HENDERSON 1951), az egyébként nem jelentős ACh felvételt, így nem volna helyes arra a következtetésre jutni, hogy a membrán ATPáz gátlás esetén azért kapunk fokozott ACh felszabadulást az extracelluláris térben, mert a felvétel gátolva van. 2,4-dinitrofenol, mely szintén gátolja az ACh felvételt (LIANG és QUASTEL 1969) nem fokozta lényegesen az ACh felszabadulását (VIZI 1972, FISCHER és mtsai 1974).

e) *Axonális tüzelés fokozódása*

A membrán ATPáz bénítása megemeli a Na⁺ intracelluláris koncentrációját, ami viszont, ha átmenetileg is, az axonális tüzelés fokozódását hozhatja létre. A kérdés most már az; vajon a fokozott ACh felszabadulásnak, — amelyet

membrán ATPáz bénítás esetén észlelünk, — nem a fokozott axonális tüzelés-e a kizárólagos oka. Ez a kérdés eldönthető volt tetrodotoxinnal, amely a Na^+ belépés gátlásával az idegvezetést teljesen fel tudja függeszteni. Quabain tetrodotoxin jelenlétében is ACh-t szabadít fel, bár a felszabadulás kisebb, mint tetrodotoxin nélkül (VIZI 1974b). Ez azt jelenti, hogy a végkészülék membrán ATPáz aktivitásának gátlása által létrehozott ACh felszabaduláson kívül, valószínűleg az axonok tüzelése által kiváltott ACh felszabadulás is hozzájárul a mért transzmitter felszabaduláshoz. A Na^+ -mentes közeg ugyancsak emelte (300%-os) az ACh felszabadulást, ahol viszont az idegi vezetés már teljesen gátolt s így hatása természetesen nem érvényesülhet. A membrán ATPáz azonban bénítva van, tehát az észlelt ACh felszabadulás ennek tulajdonítható. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a membrán ATPáz gátlása — bár valószínűleg csak átmenetileg — az axonális tüzelés fokozódásával egy addicionális ACh felszabadulást eredményez, de a (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz gátlása *per se* is létrehoz ACh felszabadulást. A Na^+ -mentes oldatban észlelt ACh felszabadulás kizárólagosan a membrán ATPáz bénulásával magyarázható.

ACh és NA felszabadulás, mint a (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz és a hozzátartozó K^+ -függő foszfatáz enzimek aktivitás gátlásának eredménye

Előzőekben bizonyítottuk, hogy a membrán ATPáz bénítók által okozott ACh felszabadulás jelentős részét nem a membrán ATPáz gátlása következményeképpen fellépő depolarizáció, intracelluláris Na^+ emelkedés, fokozott Ca^{2+} -belépés, fokozott axonális tüzelést váltja ki. Így plauzibilis az a feltetelezés, hogy az enzim gátlása *per se* az oka a fokozott ACh felszabadulásnak. Felmerül a kérdés mi történik fiziológiás körülmények között? Az akciós potenciál az idegszövetben a Na^+ -belépése mellett Ca^{2+} -belépést is okoz. A Ca^{2+} -ról viszont patkány agykéreg szeleten kimutatták, (SOMOGYI 1964 a, b), hogy 100 mM Na^+ , 20 mM K^+ és 5 mM Mg^{2+} jelenlétében koncentrációtól függően gátolja a (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz. 5×10^{-6} M koncentrációban a Ca^{2+} kb. 50%-os gátlást okoz. Ma már egyértelműen bizonyítottnak vehető, hogy az idegszövet depolarizációja (HODGKIN és KEYNES 1957), az akciós potenciál (HODGKIN és KEYNES 1957) jelentős Ca^{2+} -influxot eredményez. Így feltételezzük, hogy fiziológiás körülmények között a Ca^{2+} áthatolva a bazális membránon átmenetileg gátolja a (Na^+-K^+) -aktiválta membrán ATPáz és a bazális membrán egy igen rövid időtartamra permeábilissá válik, és az ACh az intracelluláris térből az extracelluláris térbe jut, ahol eleget tud tenni transzmitter funkciójának. HARVEY és MCINTOSH már 1940-ben felismerte, hogy extracelluláris Ca^{2+} mindenképpen szükséges az ACh felszabadulásához. KATZ és MILEDI (1967) igazolta, hogy bár a végkészülék depolarizálható Ca^{2+} hiányában, de transzmitter nem szabadul fel. Kalcium jelenlétében az akciós potenciál után néhány ms. múlva kezdődik csak az ACh felszabadulása.

BAKER és CRAWFORD (1975) béka sartorium-ischiadicus preparátumon miniatűr véglemmez potenciálokat regisztrálva ugyancsak azt találta, hogy a membrán ATPáz gátlása (ouabain, K⁺-hiány) még Ca²⁺ hiányos oldatban is fokozza az ACh felszabadulását. Egyetértve azzal a feltételezésünkkel, hogy a Na⁺-pumpa gátlása kulcs szerepet játszik az ACh felszabadulásában, mint oki tényezőt, az intracelluláris K⁺ lecsökkenését említi. Nem kétséges, ez valóban a Na⁺-pumpa gátlásának eredménye, de oki szerepe könnyen kizárható azzal, miszerint nem valószínű, hogy az ACh felszabadításában szerepet játszon egy olyan tényező, amely egyébként az ACh szintézisének gátlásához vezet (PATON és mtsai 1971). Ismeretes, hogy magas intracelluláris K⁺ koncentráció kell az ACh szintézisében résztvevő acetyl-CoA-szintetáz aktivitásához (WEBSTER 1966), valamint a piruvátkináz működéséhez (TAKAGAKI 1968). Ugyancsak cáfolja az intracelluláris K⁺ hiány szerepét az a kísérleti tény is, hogy ha a K⁺-t Rb⁺-al helyettesítjük (6. ábra) ACh nem szabadul fel, bár az intracelluláris K⁺ koncentráció alacsony. Ez a tény viszont támogatja azt az elképzelésünket, hogy a membrán ATPáz aktivitása felelős az ACh felszabadulásáért. Rb⁺ helyettesíteni tudja a K⁺-ot az enzim aktiválásában (BAKER és CONELLY 1966), így nem gátlódik az ATPáz és nem szabadul fel ACh.

GARCIA és KIRPEKAR (1973) kimutatta macska izolált lép szeleten, hogy Na⁺-hiányos oldatban a NA felszabadulás fokozódik. A NA a végkészülékben a vezikulában dopamin- α -hidroxilázal, ATP-al és kromogranin-A-val együtt helyezkedik el (SMITH és WINKLER (1972). Mivel a NA felszabadulással egyidejűleg a szerzők nem észleltek dopamin- β -hidroxiláz enzim felszabadulást, így a Na⁺-hiány NA-t felszabadító hatását a raktározást befolyásoló gátló hatással magyarázták, és így nem tartották a felszabadulás ezen formáját a fiziológiához hasonlíthatónak. Exocitózisnál a NA-al együtt fent említett alkotórészek is kiürülnek. A kérdés azonban az, hogy vajon fiziológiás körülmények között az exocitózissal szabadul-e fel a NA? LASTOWECKS és TRIFARÓ (1974) viszont azt találta, hogy a Na⁺-megvonás esetén fellépő NA felszabadulás ATP dopamin- β -hidroxiláz ürüléssel jár együtt mellékvese velőállományban. A NA/ dopamin- β -hidroxiláz és a NA/ ATP arány ugyanolyan volt, mint a granulában. Ez azt igazolja, hogy a Na⁺-megvonásra jelentkező NA felszabadulás exocitózissal kapcsolatos. Kis molekulásúlyú citoplazmatikus fehérje és tejsav-dehidrogenáz nem volt a perfuzátumban, ami azt igazolja, hogy nincs sejtkárosító hatása Na⁺-megvonásnak.

Kimutattuk, hogy a noradrenerg transzmissziójú patkány vas deferensből (Na⁺-K⁺)-aktiválta ATPáz bénító ouabain hatására C¹⁴-NA szabadul fel (VIZI 1974), akár volt Ca²⁺ az inkukáló oldatban, akár nem. LASTOWECKS és TRIFARÓ (1974) kísérleteiben a Na⁺-hiány akkor is felszabadította a NA-t, amikor Ca²⁺ nem volt az oldatban. Ezek a kísérleti eredmények arra utalnak, hogy hasonlóan az ACh-ban NA-nál is a bazális membrán ATPáz enzimjének gátlása kulcs szerepet játszik a transzmitter felszabadulásában. Fiziológiás

körülmények között a belépő Ca^{2+} gátolná a membrán ATPáz-t és ez tenné lehetővé a NA felszabadulását (VIZI 1974 b). A Ba^{2+} jobban fokozza a katekolaminok szekrécióját mint a Ca^{2+} (DOUGLAS és RUBIN 1963, 1964), a Ba^{2+} viszont jobban is gátolja a membrán ATPáz-t, mind a Ca^{2+} , és valószínűleg ennek tulajdonítható, hogy hatására az ACh (PATON és mtsai 1971) és a NA felszabadulása intenzívebb.

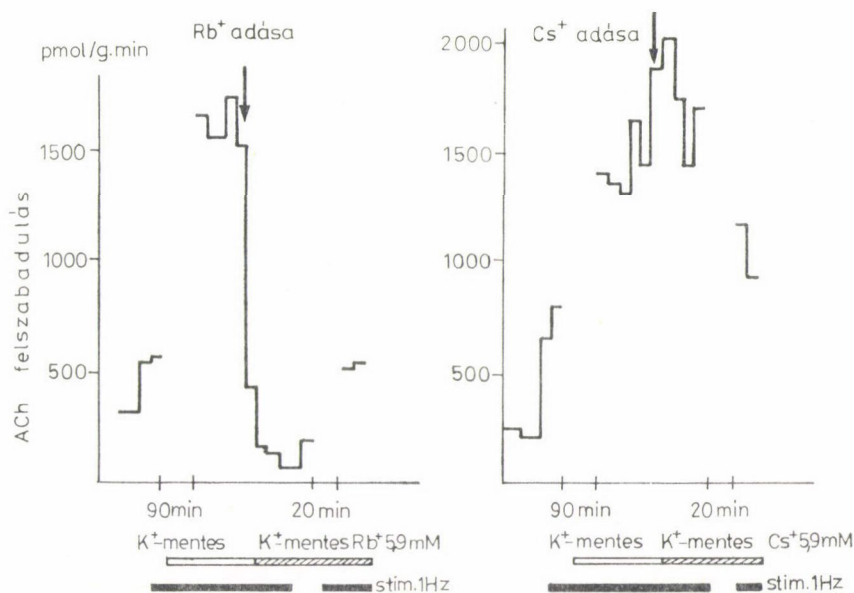
2. Acetilcolin felszabadulásának gátlása, mint a nátrium pumpa fokozott aktivitásának eredménye

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

Számos szerző (RANG és RITCHIE 1968, BOLTON 1973) leírta, hogy tartós K^{+} -megvonás után a K^{+} -t visszaadva aránylag tartós izgalma jön létre a Na^{+} -pumpának, amely elektrogén hiperpolarizációt okoz. Mivel K^{+} -hiányban — ellentétben a Na^{+} -megvonással — ingerelni is lehet az ideget, így egy kitűnő lehetőség adódott, hogy tanulmányozzuk a Na^{+} -pumpa fokozott aktivitásának a hatását az ingerléssel kiváltott ACh felszabadulásra. Tengeri malac hosszanti simaizom-Auerbach plexus (PATON és VIZI 1969) preparátumán vizsgálva a kérdést azt tapasztaltuk, hogy a K^{+} -megvonás hatására szignifikánsan megnőtt az ACh felszabadulás (6. ábra). 90 perc után az 5,9 mM K^{+} visszaadásakor az ACh felszabadulás hirtelen lecsökkent $1112,2 \pm 271,8 \text{ pmol g}^{-1}\text{min}^{-1}$ -ről $130,0 \pm 12,4 \text{ pmol g}^{-1}\text{min}^{-1}$ -re. Az egy ingerre jutó ACh mennyisége $7,9 \text{ pmol g}^{-1}$ ingerület $^{-1}$ -ről $1,0 \text{ pmol g}^{-1}$ ingerület $^{-1}$ -re csökkent le. Ez a csökkenés 15–25 percig tartott, miután az ACh felszabadulás 1 Hz ingerlés mellett fokozatosan visszatért az eredeti értékre. Ha a KCl-t RbCl-al helyettesítettük, akkor nem emelkedett meg az ACh felszabadulás és az nem csökkent, ha 5,9 mM KCl-t adtunk. Ez azt jelenti, hogy a Rb^{+} helyettesíteni tudja a K^{+} -t az ACh felszabadulás mechanizmusában. Ezzel szemben a Cs^{+} nem tudta helyettesíteni a K^{+} -t (7. ábra). A Rb^{+} azonban nemcsak itt, hanem a membrán ATPáz-ra kifejtett hatásában is teljesen képes helyettesíteni a K^{+} -t (I. SKOU 1975). Ez az adat az ACh felszabadulás és a membrán ATPáz aktivitása közötti szoros összefüggés egy újabb bizonyítéka.

Itt is felmerül azonban, hogy esetleg nem a $(\text{Na}^{+}\text{-K}^{+})$ -aktiválta ATPáz aktivitás fokozódása *per se* az oka az ACh felszabadulás gátlásnak, hanem ennek valamelyik következménye. Melyek lehetnek ezek?

a) *Hiperpolarizáció.* Az elektrogén Na^{+} -pumpa aktivitás fokozódásának az eredménye a nyugalmi potenciál emelkedése. Nem valószínű, hogy egyedül a nyugalmi potenciál emelkedése volna felelős az ACh felszabadulásának csökkenéséért. Maga a hiperpolarizáció tulajdonképpen fokozza a véglemez poten-



7. ábra. Rb⁺ hatásossága és a Cs⁺ hatástalansága a K⁺ helyettesítésben az ACh felszabadulás vonatkozásában. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom (Auerbach plexus) preparátum. Krebs oldat, 95% O₂ + 5% CO₂. 1 Hz-es Field ingerlés ahol jelezve van (1 msec, supramaximális inger). K-megvonás után Rb⁺-t adva az ACh felszabadulás gátlódik, Cs = hatástalan.

ciások quantális tartalmát (HUBBARD és WILLIS 1962), bár a nyugalmi ACh felszabadulással azonos miniatűr véglemező potenciálok frekvenciáját csökkenti (LILEY 1956). Egy ingerületre felszabaduló ACh mennyisége kísérleteinkben jelentősen lecsökkent, így ezt a nyugalmi potenciál változásával magyarázni nem lehet.

b) Intracelluláris Na⁺ csökkenése, vagy K⁺ emelkedése

A Na⁺-pumpa az intracellulárisan felszaporodott Na⁺-t kifelé az extracelluláris K⁺-t befelé pumpálja. Kinetikájában vizsgálva a kérdést azonban megállapítható, hogy amíg az ACh felszabadulás gátlása azonnal jelentkezik, addig jelentős ionális koncentráció változás csak később lép fel (3. táblázat) és ennek is a végső eredménye az, hogy az ion koncentráció normalizálódik.

c) Membrán ATPáz aktiválása

Valószínűleg a (Na⁺-K⁺)-aktiválta membrán ATPáz aktivitás fokozódásra vezethető vissza az ACh felszabadulás lecsökkenése. A membrán permeabilitása lecsökken. Ezzel a mechanizmussal lehet magyarázni a noradrenalin (PATON és VIZI 1969) α-receptoron keresztül kifejtett ACh felszabadulást gátló hatását is.

3. táblázat

Intracelluláris ionok koncentráció változása izolált nyúl vagus rostokban
Na-pumpa működésének hatására

	Intracelluláris ion koncentráció (mM kg ⁻¹ nedves súly)		
	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Kontroll, 3 min (1)	31,5	3,2	25,1
Kontroll, 12 min (1)	43,7	7,4	25,1
Kontroll, 35 min (1)	47,7	8,6	23,9
Kontroll, 120 min (5)	70,4 ± 7,8	11,3 ± 2,8	25,6 ± 2,1
K ⁺ -hiány, 120 min (4)	109,7 ± 9,7	12,0 ± 1,4	24,2 ± 1,3
K ⁺ -hiány, 120 min + K ⁺ visszaadás, 30 min (4)	44,9 ± 1,02	12,0 ± 2,6	18,9 ± 1,7
K ⁺ -hiány, 120 min + K ⁺ visszaadás és ouabain (2 × 10 ⁻⁵ M), 30 min (4)	123,0 ± 10,2	10,5 ± 4,8	25,4 ± 2,5
Na ⁺ -hiány, 120 min (szukróz helyettesítés) (5)	26,0 ± 2,8	22,6 ± 1,1	26,5 ± 2,0
Na ⁺ -hiány, 120 min + p-NPP(3 mM) (5)	22,3 ± 5,3	7,53 ± 0,8	30,2 ± 3,6

Nyúl, 2–3,5 kg, cervicalis vagusát, az állat levegővel való megölése után kivettük és Krebs oldatban (95% O₂ + 5% CO₂) 35 C°-on inkubáltuk. Száraz/nedves súly arány = 0,194 ± ± 0,008 (n = 72). A kationok koncentrációját emissziós színképelemzéssel határoztuk meg. Az intracelluláris koncentrációt az extracelluláris tér: 0,608 mg/mg/KEYES és RITCHIE 1965), továbbá a száraz/nedves súly arány segítségével határoztuk meg. p-NPP, nitrofenil foszfát.

Na⁺-hiányos Krebs oldatnál szukrózzal biztosítottuk az izozmolaritást.

Kimutatták, hogy a NA fokozza a K⁺-aktiválta p-nitrofenilfoszfátáz aktivitását (FORMBY és CLAUSEN 1968). Patkány agyban aktiválja a membrán ATPáz működését, ha az Ca²⁺-al, vagy ouabainnal van gátolva (GODFRAIND és mtsai 1974). Ez az adat nagyon jól magyarázza azt a megfigyelésünket, hogy az α-receptor izgatása akkor csökkenti az ACh felszabadulást, ha az Ca²⁺ belépéssel van összefüggésben. Az ouabain által felszabadított ACh mennyiségéből csak annyit gátol a NA, amennyi a fokozott Ca²⁺ belépés rovására írható (VIZI 1972, 1975 a). Patkány agy membrán ATPáz aktivitást mérve GODFRAIND és mtsai (1974) a NA ED 50-jét és ED 100-t 6 × 10⁻⁶ illetve 10⁻⁴ M-nak találták. Kísérleteinkben a NA hasonló koncentrációban gátolta az ACh felszabadulást az Auerbach plexusból (PATON és VIZI 1969). A NA membrán ATPáz izgató hatását mutatta még SCHÄFER és mtsai (1972), valamint YOSHIMURA (1973) is.

A NA ACh felszabadulást gátló hatásánál felmerül egy esetleges hemikoliniumszerű hatás. Ez kizárható, mert hatása egyrészt azonnal jelentkezik, másrészt az endogén és exogén NA fokozza a magas affinitású kolin transzportot (CORROL és BUTERBAUGH 1975). Korábban a NA ACh felszabadítást gátló hatását a K⁺ permeabilitás fokozó hatásával magyarázták (PATON és VIZI 1969). Ma már ismerve az ACh felszabadulás és a (Na⁺-K⁺)-aktiválta ATPáz enzim aktivitása közötti összefüggést (l. 4. táblázat), a NA gátló hatását a Ca²⁺-al gátolt membrán ATPáz izgató hatásával magyarázzuk. Ugyanilyen mechanizmussal magyarázzuk a Mg²⁺ ACh felszabadulást gátló hatását, amely egyébként patkány agykéreg szeleten 5 mM koncentrációban teljesen

4. táblázat

Különböző vegyületek, kationok, (Na⁺-K⁺)-aktiválta membrán ATPáz gátló és acetilkolint felszabadító koncentrációi (agyszövet)

	ACh felszabadulást* okozó koncentráció(M), izolált agykéreg szeletből	(Na ⁺ —K ⁺)-aktiválta ATPáz gátló koncentráció(ED ₅₀) agyszövetben	Irodalmi adatok a membrán ATPáz gátlásra
Ouabain	10 ⁻⁶ —10 ⁻⁴	~ 10 ⁻⁶	AKERA és BRÓDY 1970
Ca ²⁺	10 ⁻⁴ —10 ⁻⁵	5 × 10 ⁻⁴ ; ~ 10 ⁻³	SOMOGYI 1964 és REIDI 1966
Ba ²⁺	10 ⁻⁵	2 × 10 ⁻⁴	REIDI 1966
p-kloromerkuriben- zoát (PCMB)	~ 10 ⁻⁵	~ 5 × 10 ⁻⁶	AKERA és BRODY 1970
Klorpromazin	~ 5 × 10 ⁻⁴	~ 2 × 10 ⁻⁵ ~ 2 × 10 ⁻⁴	AKERA és BRODY 1970 EBADI és CARVER 1970
NEM	10 ⁻⁴		
Cu ²⁺	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	HEXUM 1974
Foszfolipáz A	**		SKOU 1960
Triton — x-100	0,1% W/V***		SOMOGYI és GAÁL 1965

* VIZI (1974, 1975) adatai patkány agykéreg szeleten

** HEILBRONN (1970)

*** FISCHER és mtsai (1974).

5. táblázat

Az acetilkolin felszabadulását kiváltó és gátló tényezők
(Zárójelben a gátlás százaléka)

Az acetilkolin felszabadulása gátolható

ACh felszabadulást kiváltó tényezők	Ca ²⁺ -hiány (< 10 ⁻⁸ M)	Mg ²⁺ -többlet (> 2,5 mM)	α-receptor izga- tása (NA; DA; Catapresan; BAY-1470)	p-nitrofenilfosz- fát	membrán ATPáz izgatása (K ⁺ , 5,9 mM visszaadása K ⁺ -megvonás után)
Fokozott neuronális aktivitás alacsony frekvenciájú (< 3Hz)	igen (100%)	igen (100%)	igen (100%)	—	igen
magas frekvenciájú (> 3Hz)	igen (100%)	nem (0%)	nem	—	igen
K ⁺ -depolarizáció	igen (100%)	részben (50%)	nem (0%)	nem (0%)	igen
Na ⁺ -hiány	nem	nem	nem	igen (100%)	—
K-hiány	részben (50%)	—	—	—	igen (100%)
Ouabain	részben (20—40%)	részben	részben (50%)	nem	—
Veratrin	igen (100%)	igen (100%)	—	—	—

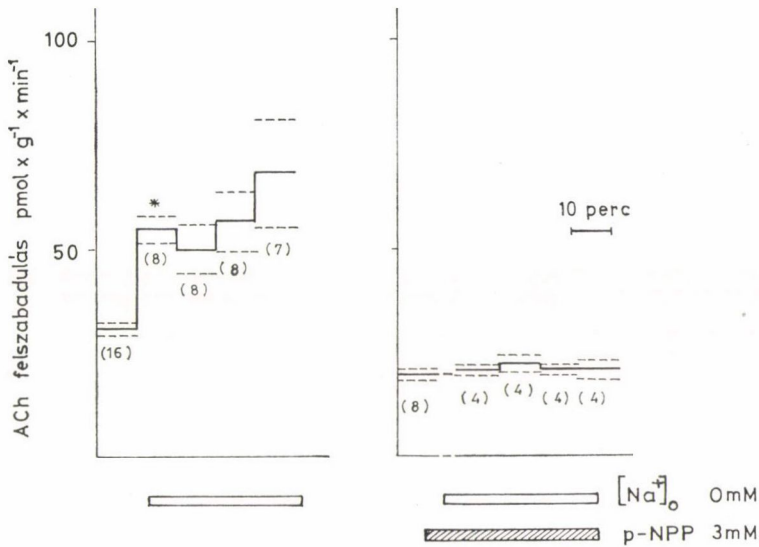
NA = 1-noradrenalin; DA = dopamin

felfüggeszti az 5 mM Ca^{2+} gátló hatását (SOMOGYI 1964). Ami különösen érdekes, hogy a Mg^{2+} a NA-hoz hasonlóan csak az alacsony frekvenciával kiváltott ACh felszabadulást gátló (5. táblázat) és teljesen hatástalan ha az ACh felszabadulást nagy frekvenciás ingerléssel hozzuk létre (VIZI 1972). Véleményünk szerint a nagy frekvenciás ingerlésnél, ahol az egy ingerre jutó ACh felszabadulás kisebb, mint az alacsony frekvenciáknál (KNOLL és VIZI 1970, 1971, VIZI 1975 a) az elektromos ingerlés hatására, valamint fokozott Na^{+} -belépésre a Na^{+} -pumpa aktivitása *sui generis* fokozódik és ez eleve lecsökkenti az ACh felszabadulását, és ekkor már a NA és a Mg^{2+} természetesen hatástalan. Egyébként NA-nak a NA felszabadulást gátló hatását (negatív feedback) ugyanezzel a mechanizmussal magyarázzuk: NA a preszinaptikus membrán α -receptorain keresztül izgatja a $(\text{Na}^{+}\text{-K}^{+})$ -aktiválta ATPáz.

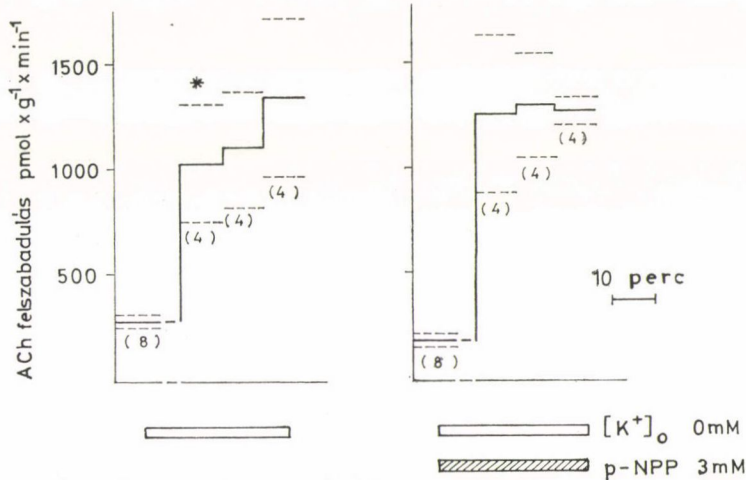
Feltételezhető, hogy az α -receptor megegyezik a $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -aktiválta ATPáz enzimmel. Ezt a véleményt igazolják azok a biokémiai adatok is (GILBERT és mtsai 1975), amelyek kimutatták, hogy a patkány agyból preparált szinaptoszómában (izolált végkészülék) a $(\text{Na}^{+}\text{-Mg}^{+})$ -aktiválta ATPáz mellett, amely nem érzékeny ouabainra, $(\text{Na}^{+}\text{-K}^{+})$ -aktiválta ATPáz enzim is jelen van, melynek aktivitása NA-al (10^{-6} — 10^{-4} M) antagonizálta a NA ($5,0 \times 10^{-6}$ M) ACh felszabadulást gátló hatását.

A $(\text{Na}^{+}\text{-K}^{+})$ -aktiválta ATPáz és K^{+} függő részét és a K^{+} -aktiválta p-nitrofenilfoszfátázét azonosnak tartják (BADER és SEN 1966, JUDAH és mtsai 1962, ALBERS és KOVAL 1966), ezért megvizsgáltuk, hogy a p-nitrofenilfoszfát (p-NPP), amely kitűnő szubsztrátuma a p-NPPáz enzimnek, hogyan befolyásolja az ACh felszabadulást, ha azt az ATPáz enzim Na^{+} - ill. K^{+} -függő részénél gátoljuk. A 8. ábra mutatja, hogy patkány agy kéreg szeleten a p-NPP 3 mM koncentrációban teljesen felfüggeszti a Na^{+} -hiány ACh felszabadító hatását. Ugyanakkor hatástalannak bizonyult, ha az enzim második lépését gátoltuk K^{+} -megvonással (9. ábra). Ez arra utal, hogy a membrán ATPáz első részének gátlása még nem hoz létre ACh felszabadulást, ha a második lépés aktiválva van. Ez azt látszik alátámasztani, hogy az ACh felszabadulásban a második lépésnek van jelentősége.

Nagyon sok szövet mikroszomális frakciójában a $(\text{Na}^{+}\text{-K}^{+})$ -aktiválta ATPázon (ATP foszfohidroláz, EC 3.6.1.3) kívül a neutrális foszfátázok aktivitása is mérhető. E foszfátázok káliummal aktiválhatók és Na^{+} -al gátolhatók. Az enzimek acetilfoszfát (BADER és SEN 1966), p-nitrofenilfoszfát (JUDAH és mtsai 1962, ALBERS és KOVAL 1966) és karbamil foszfát (BADER és SEN 1966) lehet a szubsztrátuma. Nagyon hasonló tulajdonságai arra utalnak, hogy ez utóbbi a membrán ATPáz K^{+} -függő része (BADER és SEN 1966, JUDAH és mtsai 1962, ALBERS és KOVAL 1966). INTURISSI (1969) kimutatta, hogy a Ti^{+} pótolni tudja a K^{+} -t a p-NPPáz aktiválásában. BRITTEN és BLANK (1969) membrán ATPáz vonatkozásában talált hasonlót. Azonos hatást kiváltó koncentrációt illetően a Ti^{+} lox hatékonyabb mint a K^{+} (INTURISSI 1969). Kísér-



8. ábra. p-NPP (3 mM) gátló hatása a Na⁺-megvonás ACh felszabadító hatására. Patkány izolált agykéreg szelet. Krebs oldat, 95% O₂ + 5% CO₂. (VÍZI és RÓNAI nem közölt).



9. ábra. p-NPP (3 mM) hatástalansága a K⁺-megvonás ACh felszabadító hatására. Tengeri malac ileum hosszanti simaizom (Auerbach plexus) preparátum. Krebs oldat, 95% O₂ + 5% CO₂. Ez a preparátum egyébként nagyon alkalmas az extracelluláris tér ion koncentrációjának gyors változására, mivel a diffúziós viszonyok kitűnőek (a preparátum vastagsága kb. 20–50 μ, az Auerbach plexus és a végkészülékek a simaizom felszínén helyezkednek el). Agykéreg szeleten a K⁺-megvonás nem okoz ACh felszabadulást, mivel a Na⁺-pumpa valószínűleg nem gátlódik a szövetből kiáramló K⁺ miatt. Sartorius izom preparátumon is hasonló jelenséget észlelt BIRKS és COHEN (1968), valamint KEYNES (1954) VÍZI és RÓNAI nem közölt adat).

leteink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az ACh felszabadulásáért a $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -aktiválta ATPáz rendszerből a K^+ -aktiválta rész a felelős, amely valószínűleg megegyezik a p-NPP-ázzal. A következő kísérleti adatok igazolják feltételezésünket:

1. A Na^+ -hiányos oldat ACh felszabadító belépést fokozó hatását a p-NPP (3 mM) teljesen felfüggeszti (8. ábra és 3. táblázat).
2. Oligomicin (10–20 $\mu\text{g/ml}$) nem fokozta az ACh felszabadulást (VIZI 1975) és nem gátolta a K^+ -függő p-NPPáz aktivitását sem (ASKARI és KOYAL 1971, SOMOGYI és mtsai közlés alatt, FORMBY és CLAUSEN 1968).
3. Noradrenalin fokozza a p-NPPáz aktivitását és kísérleteinkben gátolta az ACh felszabadulását.

A $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -aktiválta ATPáz enzim, amely egy Na-függő foszforilációs és egy K-függő defoszforilációs részből áll, aktivitása befolyásolja tehát a transzmitter felszabadulást. Minden valószínűség szerint a második rész tehető felelőssé a transzmitter felszabadulásért. ASKARI és RAO (1972) kimutatta, hogy patkány agy $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -aktiválta ATPáz specifikus antiszéruma csak az első lépést gátolja. ASKARI (1974) szerint ez még nem jelenti, hogy két teljesen független enzimről van szó. Valószínűleg az ATPáz enzimnek két antigén szempontból eltérő tulajdonságokkal rendelkező része van.

Összefoglalás

A bazális membránban elhelyezkedő $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -aktivált ATPáz fontos szerepet játszik a preszinaptikus membrán permeabilitás változásának regulálásában. Az akciós potenciál kapcsán a Ba^+ belépést a Ca^{2+} belépése követi és ez ha csak igen rövid időre is, de gátolja a membrán ATPázt illetőleg a p-NPPázt. Úgy tűnik az tehető felelőssé a transzmitter felszabadulásáért (11. ábra). A gátlás után viszont a transzmitter felszabadulásának gátlását eredményezi. Ez mintegy refrakter periódust biztosít a végkészülék számára. Itt azonban felmerül egy nagyon komoly probléma: milyen mechanizmussal szabadul fel az enzim a Ca^{2+} okozta gátlás alól? Mg^{2+} vagy valamilyen eddig még nem ismert molekula aktiválná? Ma még ezt nem tudjuk.

A noradrenalin, amely a membrán ATPázt izgatja valószínűleg alfa-receptoron keresztül a transzmitter felszabadulásának gátlását okozza. Ez a preszinaptikus gátlás tulajdonképpen egy nagyon gazdaságos módja a neurokémiai transzmisszió preszinaptikus modulálásának.

Véleményünk szerint a $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -aktiválta ATPáz K-függő része tehető felelőssé a transzmitter felszabadulás modulálásáért (1. 10. és 11. ábra és 6. táblázat). Ez utóbbi valószínűleg megegyezik a p-NPPáz enzimmel.

6. táblázat

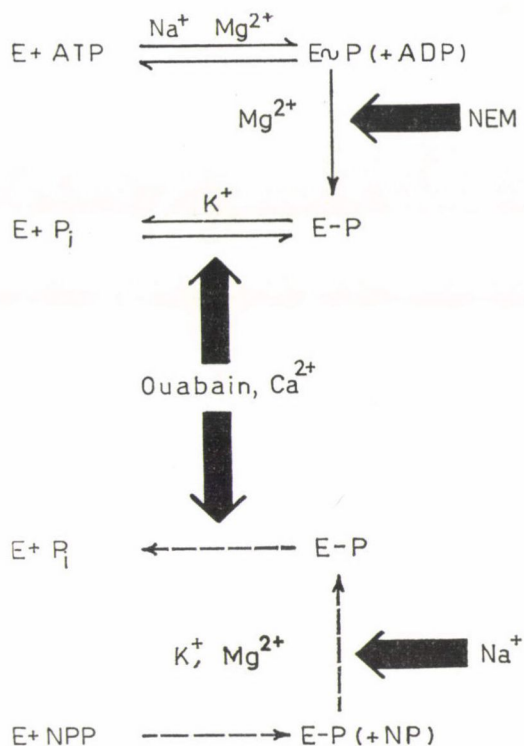
Intracelluláris ion koncentráció változások Ca²⁺-mentes oldatban tartott
nyúl vágusz rostokban K⁺ megvonására ill. visszaadására

	Intracelluláris ion koncentráció (mM · kg ⁻¹ nedves súly)		
	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Kontroll, 120 min. (5)	70,4 ± 7,8	11,3 ± 2,8	25,6 ± 2,1
K ⁺ -hiány Ca ²⁺ -mentes + 1 mM EGTA oldatban 120 min. (5)	101,7 ± 5,1	1,0 ± 0,3	22,6 ± 0,8
K ⁺ -hiány Ca ²⁺ -mentes + 1 mM EGTA oldatban 120 min. K ⁺ visszaadás, 30 min (5)	51,3 ± 9,1	1,1 ± 0,3	31,2 ± 0,9

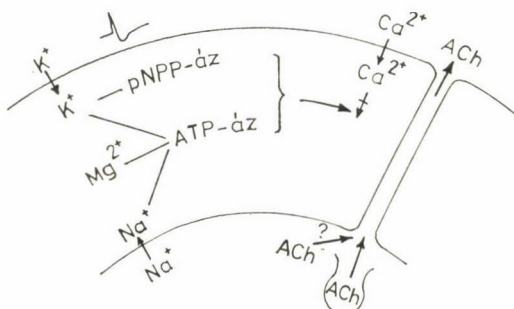
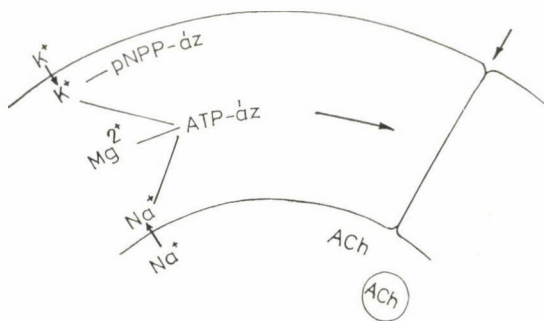
Az intracelluláris ion koncentrációkat emissziós spektrofotometriával mértük.

Krebs oldat, 35 °C, 95% O₂ + 5% CO₂.

Zárójelben a kísérletek számát tüntettük fel.



10. ábra. A Na⁺-K⁺-aktiválta ATPáz enzim vázlatos ábrázolása. A Na⁺-függő foszfoenzim képződést (E ~ P) egy konformáció változás követ (E ~ P → E-P), amely irreverzibilis. A reakció második része egy K⁺-függő defoszforiláció. A p-NPPáz enzim K⁺-függő, Na⁺-al, Ca²⁺-al és ouabainnal gátolható, valószínűleg egyezik a membrán ATPáz K⁺-függő részével.



11. ábra. A végkészülék bazális membránjában levő Na-K-aktiválta ATPáz aktivitása és az ACh felszabadulás közötti összefüggés sémás ábrázolása. Ha a membrán ATPáz enzim gátolva van az akciós potenciál alatt belépő Ca^{2+} hatására, az enzim konformáció változást szenved a membrán permeabilissé válik egy igen rövid időperiódusra. Ez a „kapuzó” mechanizmus (VIZI 1975) biztosíthatja a kvantális felszabadulást legyen az ACh akár vezikuláris, akár citoplazmatikus eredetű.

Membrán ATPáz elmélet és a quantális felszabadulás: DEL CASTILLO és KATZ (1954 a, b) már 1954-ben felvetette, hogy a quantal felszabadulás a preszinaptikus membrán „redőny”-szerű működésének az eredménye. Később ezt az elképzelést elvetették (DEL CASTILLO és KATZ 1956), mivel a preszinaptikus membránban időközben felfedezett vezikula (DE ROBERTIS és BENNETT 1954) kitűnő morfológiai magyarázatot adott a quantal felszabadulás elméletére. A transzmitter anyag a vezikulából minden, vagy semmi jelleggel exocitózissal szabadul fel. Ezek az elképzelések sem adtak magyarázatot azonban arra vonatkozóan, hogy a transzmitter anyag hogyan jut át a membránon.

Egy vezikula 10 000 (DEL CASTILLO és KATZ 1956) — 60 000 (ELMQUIST és QUASTEL 1965) molekula ACh-t tartalmaz. Ez a mennyiség felszabadulva, a szinaptikus résen átjutva a szubszinaptikus membrán receptorain hat és kb. 30 μV nagyságú potenciál változást hoz létre, ami azt jelenti, hogy kb. 1000 vezikulának kell egyidőben felszabadulnia ahhoz, hogy egy 0,7 mV nagyság-

rendű m.e.e.p. váltódjon ki. A transzmitter felszabadulás legmodernebb elmélete, amely exocitózissal magyarázza a kémiai átvívó anyag felszabadulását a végkészülékből, nem ad magyarázatot arra az egyszerű kérdésre, hogy hogyan jut át a molekula a bazális membránon, ill. a vezikula *hogyan és hol* üríti ki a tartalmát az extracelluláris térbe. A quantális felszabadulás tulajdonképpen a legerősebb bizonyítéka annak, hogy az ACh és a NA egyszerre nagy mennyiségben ürül és morfológiailag a vezikula léte szinte minden kétséget kizáró kitűnő bizonyíték. Az exocitózis elmélete olyan kísérleti tényeket nem tud megmagyarázni, hogy hogyan lehet az hogy a frissen szintetizált transzmitter szabadul fel preferenciálisan (COLLIER, 1969), akkor amikor a szintézis a citoplazmában történik és nem a vezikulában.

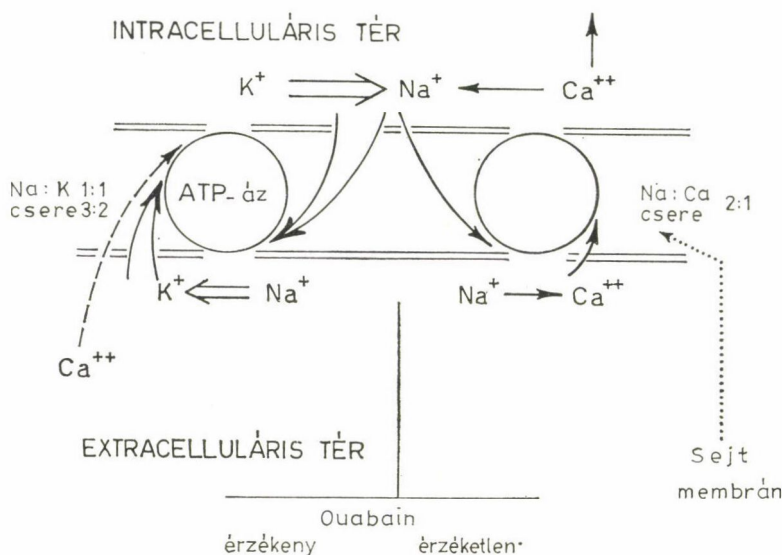
A (Na⁺-K⁺)-aktiválta ATPáz aktivitás változása viszont biztosítani tudja a transzmitter felszabadulás quantális jellegét is. Amikor az akciós potenciál eléri a végkészüléket, ott a depolarizáció „alátámasztja” a végkészüléket. A Na⁺ belépését követi a Ca²⁺ belépése és ez a membránon keresztül haladó kalcium egy rövid időre gátolja a membrán ATPáz aktivitását (l. 11 ábra) — az enzim transzformáció változást szenved-, a membrán permeábilissá válik és a citoplazmából felszabadul az ACh és a NA. Ez csak néhány ms. időtartamig tart. A kérdés azonban most már az, hogy mi az ami aktiválja, restaurálja a membrán ATPáz gátlást? Elképzelhető, hogy a membrán ATPáz enzimnek ezt követően egy fokozott aktivitása jön létre. Ezt az elképzelést látszik bizonyítani az a kísérleti tény is (TÖRÖK és VIZI nem közölt adat), hogy az elektrogén Na-pumpa működéséhez feltétlenül szükséges az extracelluláris Ca²⁺ jelenléte. Valószínűleg csak akkor aktiválható a Na-pumpa, ha az Ca gátlás alatt áll.

Kísérleteinkben összefüggést találtunk a membrán ATPáz aktivitása, ennek eredményeként a működő Na-pumpa intenzitása és a transzmitter felszabadulása között. Ez egyben új megvilágításba helyezi mind a transzmitter felszabadulást, mind annak posztzinaptikus depolarizáló hatását nevezetesen a membrán ATPáz izgalma a transzmitter felszabadulását gátolja preszinaptikusan, mivel a pompa aktivitás igen intenzív volta miatt idegimpulzusra Na-belépés nem következik be. Ugyanez a helyzet a transzmitter posztzinaptikus hatását illetően is. A membrán ATPáz izgalma és ennek következtében a fokozott Na-pumpa semlegesítheti, vagy meghaladhatja a transzmitter által okozott Na-belépést, Ez utóbbi esetben az ACh vagy a NA depolarizációt okozó hatása elmarad, valamint a szinapszisban megszűnik a neurokémiai transzmisszió.

Minden valószínűség szerint a nyugalmi potenciált részben a membrán ATPáz aktivitása határozza meg. A transzmitter hatás kifejlődése után a pompa fokozott működése miatt egy általános szenzibilitás csökkenés jön létre a posztzinaptikus membránon. Preszinaptikusan viszont nagy frekvenciás ingerlés után az intracelluláris Na⁺ megnövekedése a pompa aktivitás foko-

zódását indukálja, mely a transzmitter felszabadulás lecsökkenéséhez vezet (KNOLL és VIZI 1970, 1971). Egy egyébként egy önregulációs folyamatnak tekinthető. Valószínűleg valahol az axon hillock környékén az akciós potenciál generalizálás is gátlődik.

A Na-pumpa aktivitása csak akkor fokozható, ha extracelluláris kalcium is jelen van. Ez arra utal, hogy esetleg csak a kalciummal gátolt ATPáz (p-NPPáz) aktiválható az általunk alkalmazott biológiai rendszerekben (12. ábra).



12. ábra. A Na:K és a Na:Ca csere sematikus ábrázolása. Ca^{++} , amely a membrán ATPáz gátlója többféle mechanizmussal tud belépni a sejtbe, a két legfontosabb: 1. akciós potenciál alatt, 2. az intracelluláris nátriummal kicserélődve. A membrán ATPázról függő Na:K cserét a membránon keresztül haladó Ca^{++} az enzim gátlásával befolyásolja.

Azonban a fenti tényeket együttesen figyelembe véve is jogosan merül fel a kérdés, hogy a (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz enzim aktivitása és a membrán potenciálja között van-e direkt összefüggés. Hiszen az is elképzelhető, hogy a membrán nyugalmi potenciáljának változása csak egy indirekt következményes eredménye az ATPáz aktivitás változásának. Erre a kérdésre JAIN és mtsai (1969) kísérletei adnak választ. Mesterséges lipid membránba patkány agyból preparált (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz enzim frakciót ültettek. A mesterséges membrán Na^+ ionokat transzportált és áram keletkezett, amely ouabainnal gátlható volt. Ezek a kísérleti tények perdöntőek arra vonatkozóan, hogy a membrán ATPáz azonos tulajdonképpen a Na-pumpával és, hogy a membrán nyugalmi feszültségének fenntartásában kulcs szerepet játszik.

A (Na^+-K^+) -aktiválta ATPáz enzim K-függő részének (p-NPPáz) jelentősége az ACh felszabadulás szabályozásában: Korábbi munkánkban bizo-

nyítékokat talátunk a (Na⁺-K⁺)-aktiválta ATPáz modulatív szerepére az az ACh felszabadulásban: az enzim gátlása felszabadulást, izgatása az ACh felszabadulás gátlását eredményezi. A kérdés további tanulmányozása során az enzim K-függő részének kulcs szerepét láttuk igazolódni (VIZI és RÓNAI nem közölt adat). A membrán ATPáz K-függő részének, a p-nitrofenilfoszfátáz enzim szerepét az ACh felszabadulásban a következő kísérleti tények bizonyítják:

1. A Na-megvonás okozta ACh felszabadulást és Ca²⁺ belépést a p-NPP teljesen felfüggeszti (8. ábra és 6. táblázat). Az enzim első része gátolva van a Na-megvonás következtében, de a mesterséges szubsztrát (p-NPP) adása a második lépés működését lehetővé teszi (1. 10. ábra). Ez azt jelenti, hogy a második rész működése elegendő az ACh felszabadulás gátlásához. A p-NPP a K-megvonás (9. ábra) és az ouabain hatását (VIZI és RÓNAI közlés alatt) nem befolyásolja.

2. Ouabain, Ba²⁺, NEM, K-hiány gátolja a p-NPPáz enzim működését és kísérleti feltételeink mellett ACh felszabadulást okoznak. A Ca²⁺ is hatékony gátlója a p-NPPáz enzimnek.

3. A Na⁺₀ koncentráció fordított arányban áll az ACh felszabadulással (VIZI nem közölt adat). A p-NPPáz enzim aktivitása is fordított arányban áll a [Na⁺]₀ koncentrációjával. Egyébként mellékvese velő állományból a katekolaminok felszabadulása is fordított arányban van a [Na⁺]₀ koncentrációjával.

4. Oligomicin nem gátolja a p-NPPáz enzim aktivitását és nem fokozza az ACh felszabadulását sem (VIZI 1975 b).

5. ATP 10⁻⁵M koncentrációban gátolja Auerbach plexusból az ACh felszabadulását. SOMOGYI és mtsai (közlés alatt) feltételezik, hogy az ATP az enzim egyik alegységéhez kötődve biztosítja, hogy a másik alegységen (K-függő rész, a p-NPPáz) a p-NPP bontása fokozódjon. Ami azt jelenti, hogy az ATP tulajdonképpen fokozza a p-NPPáz működését. A kérdés látszólagos logikus magyarázata további analízist igényel, mivel magyarázatot kíván az a tény is, hogy miért gátolja az ACh felszabadulását (VIZI 1975) az ADP és az AMP akkor, amikor nem fokozza biokémiaailag a p-NPP bontását (SOMOGYI és mtsai közlés alatt). Ugyancsak nehéz megmagyarázni, hogy az ATP *in vitro* kísérleteink mellett, hogyan jut el a membránban helyetfoglaló enzimben. Még akkor is, amikor az Auerbach plexus preparátumunk a diffúziós viszonyokat illetően a legkönnyebben átjárható preparátumok egyike.

6. Noradrenalin és adrenalin fokozza a p-NPPáz enzim aktivitását (FORMBY és CALUSEN 1968) ugyanakkor gátolják az ACh felszabadulását (VIZI 1968, PATON és VIZI 1969).

7. K-megvonás után a visszaadott K⁺ teljesen meggátolta az ACh felszabadulását és a membrán ATPáz, így a p-NPPáz enzim is, amely egyébként K-függő, izgalmi állapota jön létre.

Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy akkor, amikor a p-NPPáz gátolva van, akkor az ACh felszabadulás fokozódik, amikor izgalomban van, akkor az

ACh felszabadulás gátlódik. Fiziológiás körülmények között a kalcium belépése során gátolná ezt az enzimet és tenné lehetővé az ACh és minden valószínűség szerint a NA felszabadulását is.

A posztszinaptikus membránban is fontos szerepet játszik a (Na^+ - K^+)-aktiválta ATPáz enzim. A kalcium-gátlás után az aktivitás restitúciója során az aktivitás fokozódik és a membrán (ideg vagy izom) érzékenysége csökken (deszenzibilizálódás). Ennek különösen nagy jelentősége lehet a neuro-neuronális szinapszisban, az axon hillockban, ahol az akciós potenciál generálódik. A membrán ATPáz fokozott aktivitása ennek gátlását okozhatja és ezzel a neurokémiai transzmissziót gátolja. Ez a feltételezés azonban még direkt bizonyítékot igényel.

IRODALOM

1. AKERA, T. és BRODY, T. M.: Inhibitory sites on sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase for chlorpromazine free radical and ouabain. *Mol. Pharm.* **6**, 557—566 (1970).
2. ALBERS, R. W. és KOVAL, G. J.: Sodium-Potassium-activated Adenosine Triphosphatase of Electrophorus Electric Organ. (1966).
3. ASKARI, A. és RAO, S. N.: Na^+ - K^+ -ATP-ase complex: Effects of anticomplex antibody on the partial reactions catalyzed by the complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 1323—1328 (1972).
4. ASKARI, A.: The effects of antibodies to Na^+ - K^+ -ATP-ase on the reactions catalysed by the enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **242**, 372—388 (1974).
5. BADER, H. és SEN, A. K.: K^+ -dependent acylphosphatase as part of the Na^+ , K^+ -ATP-ase of cell membranes. *Biochim. Acta* **118**, 116—123 (1966).
6. BAKER, P. F. és CONELLY, C. M. Some properties of the external activation site of the sodium pump in crab nerve. *J. Physiol.* **185**, 270—297 (1966).
7. BAKER, P. F.: The sodium pump. *Endeavour* **25**, 166—172 (1966).
8. BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P., HODGKIN, A. L. és STEINHARDT, R. A.: The effect of sodium concentration on calcium movements in giant axons of *Loligo forbesi*. *J. Physiol. Lond.* **192**, 43—44 (1967).
9. BAKER, P. F. és BLAUSTEIN, M. P.: Sodium-dependent uptake of calcium by crab nerve. *Biochim. Biophys.* **150**, 167—170 (1968).
10. BAKER, P. F. és CRAWFORD, A. C.: A rate on the mechanism by which inhibitors of the sodium pump accelerate spontaneous release of transmitter from motor nerve terminals. *J. Physiol.* **247**, 209—226 (1975).
11. BLAUSTEIN, M. P. és WEISMANN, W. P.: Effect of sodium ions on calcium movements in isolated synaptic terminals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **66**, 664—671 (1970).
12. BLAUSTEIN, M. P. és GOLDRING, I. M.: Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe, evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J. Physiol. (London)* **247**, 589—615 (1975).
13. BIRKS, R. J.: The role of sodium ions in the metabolism of acetylcholine. *Can. J. Biochem. Physiol.* **41**, 2573—2597 (1963).
14. BIRKS, R. J. és COHEN, M. W.: The action of sodium pump inhibitors on neuromuscular transmission. *Proc. R. Soc. B.* **170**, 381—399 (1968).
15. BOLTON, T. B.: Effects of electrogenic sodium pumping on the membrane potential of longitudinal smooth muscle from terminal ileum of guinea-pig. *J. Physiol.* **228**, 693—712 (1973).
16. BRITTEN, J. S. és BLANK, M.: Thallium activation of the (Na^+ + K^+)-activated ATP-ase of rabbit kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **159**, 160—166 (1968).
17. DEL CASTILLO, I. és KATZ, B.: The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J. Physiol.* **124**, 553—559 (1954a).
18. DEL CASTILLO, I. és KATZ, B.: Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J. Physiol.* **124**, 574—585 (1954b).
19. COLLIER, P.: The preferential release of newly synthesized transmitter by a sympathetic ganglion. *J. Physiol. (London)* **205**, 341—352 (1969).

20. CORROLL, P. T. és BUTERBAUGH, G. G.: High affinity choline transport in guinea pig and the effect of norepinephrine. *J. of Neurochem.* **24**, 917—921 (1975).
21. DOUGLAS, W. W. és RUBIN, R. P.: The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol.* **167**, 288—310 (1963).
22. DOUGLAS, W. W. és RUBIN, R. P.: Stimulant action of barium on the adrenal medulla. *Nature (London)* **203**, 305—307 (1964).
23. EBADI, M. S. és CARVER, M. J.: The inhibition of transport ATP-ase by chlorprothixene in brain. *Eu. J. Pharmac.* **9**, 190—194 (1970).
24. ELLIOT, K. A. és HENDERSON, N.: Factors affecting acetylcholine found in excised rat brain. *Am. J. Physiol.* **165**, 365—374 (1951).
25. ELMQVIST, D. és FELDMAN, D. S.: Spontaneous activity at a mammalian neuromuscular junction in tetrodotoxin. *Acta Physiol. scand.* **64**, 475—477 (1965).
26. FISCHER, H. D., SCHWARZENFELD, I. és OELSZNER, W.: Die Bedeutung von Membranfunktion für die mit Arecolin stimulierte Acetylcholinsynthese in Endhirnschnitten der Ratte. *Acta biol. med. germ.* **32**, 535—543 (1974).
27. FORMBY, B. és CLAUSEN, J.: Comparative studies of K⁺-p-nitrophenylphosphatase, K-acetylphosphatase and Na, K-ATP-ase in synaptosomes of rat brain. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **349**, 909—919 (1968).
28. GARCIA, A. G. és KIRPEKAR, S. M.: Release of noradrenaline from cat spleen by sodium deprivation. *Br. J. Pharmacol.* **47**, 729—747 (1973).
29. GARRAHAN, P. J. és GLYNN, I. M.: The behavior of the sodium pump in red cells in the absence of external potassium. *J. Physiol. (London)* **192**, 159—237 (1967a).
30. GARRAHAN, P. J. és GLYNN, I. M.: The stoichiometry of the sodium pump. *J. Physiol. (London)* **192**, 217—235 (1967b).
31. GÁRDOS, G.: Akkumulation der Káliumionen durch menschliche blutkörperchen. *Acta Physiologica* **6**, 191—199 (1954).
32. GÁRDOS, G. és STRAUB, F. B.: Über die rolle Adenosintriphosphorsäure (ATP) in der K-permeabilität der menschlichen roten blutkörperchen. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **12**, 1—8 (1957).
33. GILBERT, I. C., WYLLIE, M. G. és DAVISON, D. V.: Nerve terminal ATP-ase as possible trigger for neurotransmitter release. *Nature* **255**, 237—238 (1975).
34. GLYNN, I. M.: Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. *J. Physiol. (London)* **160**, 18—19D (1962).
35. GODFRAIND, T. KOCH, M. C. és VERBEKE, N.: The action of EGTA on the catecholamine stimulation of rat brain Na-K-ATP-ase. *Biochem. Pharm.* **23**, 3505—3511 (1974).
36. HARVEY, A. M. és MCINTOSH, F. C.: Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion. *J. Physiol. (London)* **97**, 408—416 (1940).
37. HEILLBRONN, E.: Further experiments on the uptake of acetylcholine and atropine and the release of acetylcholine from mouse brain cortex slices after treatment with phospholipase. *J. Neurochem.* **17**, 381—389 (1970).
38. HODGIN, A. L. és KEYNES, R. D.: Movements of labelled calcium in squid giant axons. *J. Physiol.* **138**, 253—281 (1957).
39. HODGIN, A. L.: The conduction of the nervous impulse. Liverpool University Press. (1964).
40. HUBBARD, J. I. és WILLIS, W. D.: Hyperpolarization of mammalian nerve terminals. *J. Physiol. (London)* **163**, 115—137 (1962).
41. INTURISSI, C. E.: Thallium dephosphorylation of a phosphorylated intermediate of the (sodium-thallium activated) ATP-ase. *Biochem. Biophys. Acta* **178**, 630—633 (1969).
42. IVERSEN, L. L.: The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves. Cambridge, Univ. Press. (1967).
43. JAIN, M. K., STRICKHOLM, A. és CORDES, E. H.: Reconstitution of an ATP-mediated active transport system across black lipid membranes. *Nature (London)* **222**, 871—872 (1969).
44. JUDAH, J. D., AHMED, K. és MCLEAN, A. E. M.: Ion transport and phosphoproteins of human red cells. *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 472—480 (1962).
45. KATZ, B. és MILEDI, R.: The measurement of synaptic delay and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. (1965).
46. KATZ, B. és MILEDI, R.: Tetrodotoxin and neuromuscular transmission. *Proc. R. Soc.* **167**, 8—22 (1967).
47. KATZ, B. és MILEDI, R.: Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J. Physiol. (London)* **203**, 689—706 (1969).
48. KNOLL, J. és VIZI, E. S.: Presynaptic inhibition of acetylcholine release by endogenous and exogenous noradrenaline at high rate of stimulation. *Br. J. Pharmac.* **40**, 554—555 (1970).

49. KNOLL, J. és VIZI, E. S.: Effect of frequency of stimulation on the inhibition by noradrenaline of the acetylcholine output from parasympathetic nerve terminals. *Br. J. Pharmac.* **42**, 263—272 (1971).
50. LARIS, D. C. és LETCHWORTH, D. E.: Cation influence on inorganic phosphate production in human erythrocytes. *J. cell. comp. Physiol.* **60**, 229—234 (1962).
51. LASTOWECKA, A. és TRIFARÓ, J.: The effect of sodium and calcium ions on the release of catecholamines from the adrenal medulla: sodium deprivation induces by exocytosis in the absence of extracellular calcium. *J. Physiol. (London)* **236**, 681—705 (1974).
52. LILEY, A. W.: The quantal components of the mammalian end-plate potential. (London) **133**, 571—581 (1956).
53. MANN, P. J. G., TANNENBAUM, M. és QUASTEL, J. H.: Acetylcholine metabolism in the central nervous system; the effects of potassium and other cations on acetylcholine liberation. *Biochem. J.* **33**, 822—835 (1939).
54. MILEDI, R. és SLATER, C. R.: The action of calcium on neuronal synapses in the squid. *J. Physiol. (London)* **184**, 473—498 (1966).
55. MILEDI, R.: Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. B.* **183**, 421—425 (1973).
56. OKAMOTO, K. és QUASTEL, J. H.: Tetrodotoxin sensitive uptake of ions and water by slices of rat brain in vitro. *Biochem. J.* **120**, 37—47 (1970).
57. PATON, W. D. M. és VIZI, E. S.: The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig longitudinal muscle strip. *Br. J. Pharmac.* **35**, 10—28 (1969).
58. PATON, W. D. M., VIZI, E. S. és ZAR, M. A.: The mechanism of acetylcholine release from parasympathetic nerves. *J. Physiol.* **215**, 819—848 (1971).
59. POULSEN, I. H.: Liberation of acetylcholine by ouabain in the cat submandibular gland. *Pflügers. Arch.* **350**, 281—286 (1974).
60. RAHAMIMOFF, R.: Role of calcium ions in neuromuscular transmission. In *Calcium and Cellular Function*, ed. A. W. Cuthbert, (London) Basingstoke: McMillan. pp. 132—147 (1970).
61. RANG, H. P. és RITCHIE, J. M.: On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations. *J. Physiol. (London)* **169**, 183—221 (1968).
62. RENDI, R.: The effect of K^+ on dephosphorylation of an acid stable phosphorylated intermediate of the Na^+ , K^+ requiring ATP-ase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 394—396 (1966).
63. DE ROBERTIS, E. és BENNETT, H. S.: Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 47—58 (1955).
64. SCHAEFER, A., UNYI, G. és PFEIFER, A. K.: The effects of a soluble factor and of catecholamines on the activity of adenosine triphosphate in subcellular fractions of rat brain. *Biochem. Pharmac.* **21**, 2289—2294 (1972).
65. SKOU, J. C.: The influence of some cations on ATP-ase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 394—401 (1957).
66. SKOU, J. C.: Further investigations on a $(Mg^{2+} - Na^+)$ -activated adenosinetriphosphatase possibly related to the active linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane. *Biochem. Biophys. Acta* **42**, 6—23 (1960).
67. SKOU, J. C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Phys. Rev.* **45**, 596—617 (1965).
68. SKOU, J. C.: The $(Na^+ - K^+)$ -activated enzyme system and its relationship to transport of sodium and potassium. *Quarterly Rev. of Biophysics J.* **3**, 401—434 (1975).
69. SMITH, A. D. és WINKLER, H.: Fundamental Mechanism in the Release of Catecholamines. *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie* Edited by O. Eichler, A. Farah, H. Herben, A. D. Welch. Volume XXXIII. New York 538—542 (1972).
70. SOMOGYI, J.: Über die Binding der Ca-Ionen an das Na^+ -und K^+ aktivierbare Adenosinphosphatase-System des Gehirns. *Experientia* **20**, 28—29 (1964a).
71. SOMOGYI, J.: Über die Wirkung der Ca-Ionen auf die durch Na^+ und K^+ aktivierbare Adenosintriphosphatase des Hirngewebes. *Zschr. f. Physiologische Chemie* **336**, 264—270 (1964b).
72. SOMOGYI, J. és GAÁL, G.: $Na^+ - K^+$ -aktivierbares Adenosintriphosphatase System: Die Wirkung von Triton-X-100 die SH-Gruppen *Experientia* **21**, 573—574 (1965).
73. SOMOGYI, J.: Az aktív iontranszport enzimátikus mechanizmusa (transzport adenosin foszfátáz) *MTA Biol. Oszt. Közl.* **11**, 240—279 (1968).
74. SOMOGYI, J.: Transzport-adenozintrifoszfátáz modellek. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **16**, 423—441 (1973).

75. SOMOGYI, J., SCHÖN, R., VODNYÁNSZKI, L. és HATFALUDI, T.: Na⁺-K⁺-aktiválható adenozintrifoszfát mint egy energia átalakulás modellje. (közlés alatt).
76. STRAUB, F. B.: A vörösvértestek anyagcseréje és K-ion permeabilitása. MTA Orv. Tud. Oszt. Közl. **3**, 31—45 (1952).
77. STRAUB, F. B.: Über die akkumulation der kaliumionen durch menschliche blutkörperchen. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **4**, 235—240 (1953).
78. SWANSON, P. D.: Effects of ouabain on acid-soluble phosphate and electrolytes of isolated cerebral tissue in presence or absence calcium. J. Neurochem. **15**, 57—67 (1968).
79. TAKAGAKI, G.: Control of aerobic glycolysis and pyruvate kinase activity in cerebral cortex slices. J. Neurochem. **15**, 903—916 (1968).
80. VIZI, E. S.: Stimulation by inhibition of (Na⁺-K⁺-Mg²⁺)-activated ATP-ase of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. J. Physiol. (London) **226**, 95—117 (1972).
81. VIZI, E. S., ILLÉS, P., RÓNAI, A. és KNOLL, J.: The effect of lithium on acetylcholine release and synthesis. Neuropharmacology **11**, 521—530 (1972).
82. VIZI, E. S.: Does stimulation of (Na⁺-K⁺-Mg²⁺)-activated ATP-ase inhibit acetylcholine release from nerve terminals? Br. J. Pharmac. **48**, 346—347 (1973).
83. VIZI, E. S.: Lithium and acetylcholine metabolism. in „Lithium Research and Therapy” ed. by N. Johnson, Academic Press (1974a).
84. VIZI, E. S.: Possible connection between the release of acetylcholine and the activity of Na⁺-K⁺-activated ATP-ase. in: Neurobiological basis of memory formation. ed. H. Matthies. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 96—116 (1974b).
85. VIZI, E. S.: Interaction between Adrenergic and Cholinergic Systems. Presynaptic Inhibitory Effect of Noradrenaline on Acetylcholine Release. in: J. of Neural Transmission. Suppl. XI. 61—78. Edited by B. Csillik and J. Ariens Kappers (1974c).
86. VIZI, E. S.: The role of Na⁺-K⁺-activated ATP-ase in transmitter release: acetylcholine release from basal ganglia and its inhibition by dopamine and noradrenaline. in: Subcortical mechanism and sensorimotor activities. ed. by T. L. Frigyesi, Hans Huber publ. Bern 63—89 (1975a).
87. VIZI, E. S.: Release mechanism of acetylcholine and the role of (Na⁺-K⁺)- activated ATP-ase. in Cholinergic Mechanism. Szerk. P. G. Waser, Raven Press New York 199—211 (1975b).
88. VIZI, E. S.: Termination of transmitter release by stimulation of sodiumpotassium activated ATP-ase. J. Physiol. **267**, 261—280 (1977).
89. VIZI, E. S.: Transzmitter felszabadulás fízológájáról és farmakológájáról. MTA Biol. Oszt. Közl. **18**, 243—260 (1975c).
90. WHITTAM, R.: The asymmetrical stimulation of membrane adenosinetriphosphatase in relation to active cation transport. Biochem. J. **84**, 110—118 (1962).
91. YOSHIMURA, K.: Activation Na⁺-K⁺-activated ATP-ase in rat brain by catecholamine. J. Biochem. **74**, 389—391 (1973).