

MORFOLÓGIAI KUTATÁSOK PERSPEKTÍVÁI A KÖZPONTI IDEGRENSZER MONOAMINERG STRUKTÚRÁINAK MEGISMERÉSÉBEN

PALKOVITS MIKLÓS

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, I. sz. Anatómiai Intézete, Budapest

A monoaminoknak (MA) — adrenalin (E), noradrenalin (NE), dopamin (DA) és serotonin (5-HT) — a központi idegrendszerben való előfordulását, mennyiségüket, illetve annak változását hisztokémiai és biokémiai módszerekkel lehet kimutatni és mérni. A két módszer alapvetően különböző, de egyaránt fontos kérdésekre tud választ adni. A hisztokémiai (fluorescens mikroszkópos módszer) előnye, hogy a MA-ok topográfiai és intracelluláris lokalizációját lehet vele kimutatni, viszont hátránya, hogy szubjektív és kvantitatív meghatározásra nem alkalmas. A biokémiai módszereknek viszont az a hátrányuk, hogy meglehetősen limitált mennyiségű agyszövetben alkalmazhatók, és azon belül semmiféle sejtszintű diszkrimináció nem lehetséges. Előnyük viszont, hogy exakt, specifikus és kvantitatív, így experimentális vizsgálatok kiértékelésére alkalmasak. Mindkét módszer művelői komoly erőfeszítéseket tettek a módszer hatásfokának javítására és alkalmazási területének kiszélesítésére; sajnos olykor elfelejtve a módszerek jellegéből *ab ovo* adott korlátokat.

A FALCK—HILLARP-féle fluorescens mikroszkópos módszer vetette meg a MA-ok hisztokémiai kutatásának alapjait a központi idegrendszerben [48, 49, 29]. Az elmúlt évtizedben — főleg a svéd kutatócsoportok jóvoltából — ez a módszer fénykorát élte. Feltérképezték a MA-ok előfordulását az idegrendszerben patkányban [39, 51, 50]. Lokalizálták a MA-tartalmú neuronokat [39], végződéseket [51] és erőfeszítések történtek a felszálló MA pályák kimutatására is [6, 7, 8, 131, 10, 125]. A későbbi vizsgálatok lényegében vagy csak ezen adatok ismétlései voltak más specioseken, vagy lényegtelen, részletekbe menő kiegészítések. A klasszikusnak számító feltérképezéseknél lényegesen részletesebb és anatómiai szempontból korrektebb atlasz most került megjelenésre [8, 111]. Mindezen munkák zömükben azonban csak a noradrenalinra és a dopaminra vonatkoznak, az esetek többségében egymástól való elkülönítése nélkül; míg az adrenalin és serotonin feltérképezésének, azok fluorescenciájának jellege miatt, a paraformaldehydes módszer nem, vagy csak bizonyos körülmények között alkalmas; kimutatásukra inkább az immunfluorescens módszer nyújt lehetőséget.

A klasszikus hisztofluoreszcens módszer kezdeti problémája a MA-ok identifikálásának biztosítása volt, vagyis igazolni, hogy a fluoreszcens aktivitás egy adott MA-nak felel meg. Ez legbiztosabban mikrospektrofluorométerrel, a gerjesztett és kibocsátott fényhullámok spektrumának meghatározása révén történik, mely a különböző aminok esetében különböző; így azok szétválasztására alkalmas [15, 16, 18, 22, 17]. Ugyancsak alkalmas a MA-ok szétválasztására, ha a MA-ok átalakításában szereplő enzimeket szelektíve gátoljuk [39, 50].

A hisztofluoreszcens módszerrel párhuzamosan erőfeszítések történtek a MA-ok elektronmikroszkópos identifikálására is. Evidens volt annak feltételezése, hogy a MA-ok valamely, a perikaryonban vagy a szinaptikus végződésben levő vezikulumban foglalnak helyet. Hamar bebizonyosodott, hogy adrenalin és noradrenalin a periférián olyan „dens core” vezikulumok alakjában fordul elő, melyek a központi idegrendszerben nem találhatóak. HÖKFELT [68] káliumpermanganátos módszere látszik legspecifikusabbnak, mely segítségével a kis vezikulumokat tartja a MA-ok hordozóinak. Nincs azonban direkt bizonyíték arra, hogy mely szemcsetípus mely aminnak felelne meg.

A hisztokémiai módszerrel dolgozó kutatók másik törekvése arra irányul, hogy a módszert valamilyen módon kvantitatív, vagy legalábbis szemi-kvantitatívá tegyék, ezáltal alkalmazható legyen kísérleti úton létrehozott változások kiértékelésére [90, 81]. A MA-ok szintézisében résztvevő enzimeket gátló kémiai anyagokkal (α -metil-paratirozin, tranilcipromin, p-klorofenilaloin, arterenon, dihidroxifenilacetamid, 6-halotriptofán, stb.) történő előkezeléssel elérhető, hogy egy beavatkozást követően, a monoaminok változása egyértelműbb legyen [40] és számos zavaró faktor ki is iktatható, de a módszer exaktságát ez lényegesen nem befolyásolta. A próbálkozások során kidolgozták az egyes aminok átalakulását, szintézisét, felhasználódását legjobban biztosító előkezeléseket és kísérleti szituációkat, de a fluoreszcens aktivitás mennyiségi meghatározása megmaradt a becslés szintjén. Bár számos kísérletnél úgy látszott, hogy a szemi-kvantitatív értékelés (0-tól +5-ig osztályozva a fluoreszcens intenzitást) használatos; bebizonyosodott, hogy csak igen nagyfokú változások, gyakorlatilag csak a szélső értékek határozhatók meg ezzel a módszerrel.

Kísérletünkben [84] α -metil-p-tirozin vagy reserpin kezelés után az állatokat különböző időpontban öltük le. (Az előkezelés módja és annak időtartama biztosította, hogy a különböző állatok agyának MA tartalma között igen nagy mennyiségi különbség legyen.) Ugyanazon patkányban a különböző agyterületek MA (esetünkben NE és DA) tartalmát határoztuk meg biokémiai és hisztokémiai úton. Az agyak felezése után a jobb oldali izoláltan kivett agyagok (nucleus paraventricularis, nucleus dorsomedialis, nucleus caudatus, nucleus ventralis thalami) és frontális cortex MA tartalmát biokémiai úton, igen érzékeny és specifikus enzim izotópos módszerrel határoztuk meg [37, 110], míg a bal oldalon ugyanazon magokban fluoreszcens módszerrel igyekeztünk

a MA-tartalmat megbecsülni. (Előzetes kísérletekben kimutattuk, hogy a MA-tartalomban oldalkülönbség nincs [83].) Sem a biokémiai, sem a hisztokémiai értékelést végző kutató nem tudta, hogy az állat milyen és mennyi ideig tartó kezelésben részesült. Az eredmények azt mutatták, hogy a különböző magokban levő MA mennyiségét nem lehet biztonsággal a fluorescens módszerrel megmondani, de ugyanazon magnál a 60%-on belüli változások sem mutathatók ki. (Egyes esetekben ez a bizonytalanság 82%-os változásig megmaradt.) Ez azt bizonyítja, hogy a hisztokémiai módszer kvantitatív analízisre, így experimentális kísérletekre nem alkalmazható és az eddigi, ilyen módon nyerni vélt adatokat csak megfelelő kritikával értékelhetjük.

Az a tény, hogy a MA normál eloszlása a központi idegrendszerben nagy részletességgel fel lett térképezve, valamint az, hogy a módszer experimentális vizsgálatokra szubjektív és kvalitatív jellegénél fogva nem alkalmas; a morfológiai kutatások perspektíváit a központi idegrendszer struktúráinak megismerésében meglehetősen beszűkítette. Ezen nem változtat lényegesen az sem, hogy mikrospektrofluorométerrel egy adott területen, akár egy sejten belül is meghatározható a fluorescens intenzitás, mivel a terület, vagy sejt kiválasztása változatlanul szubjektív, és a módszer teljes mintavétel esetén olyan munkáigényes, hogy rutinszerűen nehezen alkalmazható. További problémát jelent, hogy a fluorescens intenzitás stabilizálása (a különböző, de lényeges faktorok, mint az idő, a hő, a páratartalom, a kémiai anyagok, az anyag preparálásának módja), mely a legnagyobb körütekintés mellett sem biztosítható olyan mértékben, hogy az eltérések ne haladják meg a kísérlet folyamán várhatóan bekövetkező változásokat.

A biokémiai módszerek, melyek mind maguk az aminok, mind enzimeik kimutatására szolgálnak, nagymértékben finomodtak. Enzim-izotópos módszerek alkalmazásával valamennyi MA mérhető már 100 μg -nyi agyszövetben is [9, 37, 119, 110]. A módszer lehetővé tette igen kis agyterületek, szeparált magok vagy areák MA-tartalmának meghatározását. A módszerek rutinszerű felhasználására akkor kerül sor, amikor egy relatíve egyszerű technikát sikerült kidolgozni agymagok izolált kivételére olyan módon, hogy a kivett agyagban a kivételi és mérési procedura alatt sem az aminok, sem enzimeik nem károsodnak, ugyanakkor olyan gyors, hogy óránként akár 200–300 minta is vehető [108]. A két módszer szerencsés találkozása eredményezte, hogy a patkány központi idegrendszerének valamennyi fontos területén — mintegy 140 magban — valamennyi MA és enzimeik (tirozin hidroxiláz-121-, dopamin- β -hidroxiláz-121-, feniletanolamin N-metil transzferáz-122) koncentrációját izoláltan sikerült meghatározni. Ugyanígy módszer van a monoaminoxidáz mennyiségi kimutatására is [133]. A serotoninnak L-triptofánból történő bioszintézisét kontrolláló enzimnek, a triptofán hidroxiláznak enzim izotópos mikromódszere a közelmúltban került kidolgozásra és eloszlásának biokémiai feltérképezése a központi idegrendszerben folyamatban van. Ily módon a

MA-ok biokémiai feltérképezése is gyakorlatilag megvalósítottnak tekinthető. Ez a módszer viszont érzékenysége, specificitása és kvantitatív jellege miatt igen alkalmas experimentális vizsgálatok kiértékelésére, mint ahogyan ezt több konkrét esetben már sikerült is alkalmazni [112, 85].

A hisztokémiai és biokémiai feltérképezések bizonyították, hogy a monoaminok kisebb, vagy nagyobb koncentrációban a központi idegrendszer valamennyi területén megtalálhatók. A korábbi feltevessel szemben jelentős mennyiségű adrenalin is van a patkány központi idegrendszerében [72, 73, 122]. Ismerjük és mérni tudjuk a MA-ok anyagcseréjében résztvevő enzimeket. Kétségtelen, hogy az experimentális vizsgálatok kvantitatív értékelhetőségével a monoaminerg struktúrák vizsgálata a biokémiai módszerek szférájába került, a morfológiai vizsgálatok előtt változatlanul fontos lehetőségek állnak. Ezeket négy csoportra oszthatjuk:

- a) Fluorescens mikroszkópos vizsgálatok.
- b) Elektronmikroszkópos vizsgálatok.
- c) Immunfluorescens vizsgálatok.
- d) Autoradiográfias vizsgálatok.

Mind a négy vizsgálati ág meglehetősen műszer- és munkaigényes, ugyanakkor olyan kérdésekre ad választ, melyek biokémiai, elektrofiziológiai vagy farmakológiai megközelítésben nem oldhatók meg.

Fluorescens mikroszkópos vizsgálatok

A fluorescens mikroszkópos technika alapjaiban ma is a FALCK—HILLARP-féle paraformaldehydes technikán alapszik [48, 49, 29], de azóta lényeges változások történtek. A korábbi gyakorlatban vagy a monoaminoxidáz gátló anyagokkal (nialamid), vagy a NE és DA szintézisét gátló α -metiltirozinnal [127] értek el jobb fluorescens aktivitást, addig ma már számos más kémiai anyag ismeretében szelektív gátlás és kiürítés lehetséges a MA-szintézis és átalakulás szinte valamennyi lépcsőjében. Megvan tehát a lehetőség, hogy a kísérleti viszonyoknak megfelelő és a kérdés vizsgálatához optimális situációt teremtsünk.

Igen jó példa erre LIDBRINK és munkatársainak [91] közelmúltban végzett vizsgálata. Reserpinnel előkezelt állatokban DOPA és perifériás dekarboxiláz gátló (Ro4-4602, illetve MK-486) együttes adásával olyan dopamin-tartalmú neuronokat tudtak fluorescens mikroszkópos módszerrel a hypothalamusban kimutatni, melyek a „klasszikus” fluorescens vizsgálatokban nem voltak kimutathatók, csupán biokémiai vizsgálatok [110] utaltak jelenlétükre. Eredményeik a DAHLSTRÖM—FUXE [39]-féle, általánosan használt felosztás újraértékelését, vagyis az eddigi fluorescens mikroszkópos ismereteink és szemléletünk átalakítását teszik szükségessé — mindezt egy helyesen megválasztott és felállított kísérleti situáció megteremtése révén.

Igen fontos technikai lépést jelent a „freeze dry” technikának helyettesítése vibraton használatával [126, 74, 92]. Ez lehetővé teszi metszetek készítését mélyfagyasztás és alacsony nyomás alkalmazása nélkül; megnyitva az utat az immunfluorescens vizsgálatok számára is.

Informatív jellegű vizsgálatokra alkalmas, ha egyes agyterületekről kenetet veszünk. Ez esetben is a freeze dry-technika alkalmazása nélkül vizsgálhatjuk a szinapszisokban levő MA-okat fluorescens mikroszkóppal [107, 101].

Vizsgálni lehet nemcsak a MA-ok felhasználását az idegvégződésekből, vagy szintézisüket, illetve átalakulásukat, hanem felvételüket is. A perifériás és központi idegrendszeri MA neuronoknak igen nagyfokú és specifikus affinitásuk van exogén catecholaminok felvételére. Ezek alkalmazása intraventricularisan a legelőnyösebb.

a) Fluorescens mikroszkópos vizsgálatok *kísérleti beavatkozása* után. Eltűnik-e és honnét egy adott MA-nak megfelelő fluorescens aktivitás különböző agyi műtéti beavatkozások (átmetszések, deafferentálás, lézió, implantáció stb.) után. Az értékelés lehet informatív jellegű és bevezetője egy biokémiai mérésnek, de lehet részletező is, amikor arra kívánunk választ kapni, hogy milyen struktúrákban történt a változás. Quantitatív értékelésre nem alkalmas.

A gyakorlatban a MA kutatásnak ez az ága igen elterjedt. Mai tudásunk szerint a MA sejtek többsége az agytörzsben foglal helyet [39, 51, 50, 80, 111], és a MA pályák innét indulnak a nagyagy-diencephalon, cerebellum és a gerincvelő felé [39, 93, 103, 131, 104, 97, 125, 83].

A NE sejtek igen nagy mennyiségben a locus coeruleusban foglalnak helyet, ezért annak léziója után bekövetkezett változásokat biokémiai és hisztokémiai módszerrel számosan vizsgálták [93, 103, 131, 104, 83]. Saját anyagunkban mérni tudtuk számos szeparáltan kivett agyterületen a NE mennyiségének csökkenését féloldali locus coeruleus lézió után [83]. Főleg a nagyagykéreg, hippocampus, de a diencephalon számos más magjában is (nucleus paraventricularis, nucleus periventricularis, nucleus anterior ventralis thalami) igen jelentős NE-csökkenés volt kimutatható. A locus coeruleusból haladnak rostok a kisagyba is. A locus coeruleuson kívül számos más agyterületen találunk még NE sejteket; ezek végződéseire konkrét vizsgálat még nem történt és a feltételezett ventrális NE pálya léte és lefutása sem bizonyított [131, 125]. Ismeretes, hogy az eminentia medianában jelentős mennyiségű NE van. Bizonyított, hogy ezek extrahypothalamikus eredetűek [23]. Vizsgálatok mutatnak arra is, hogy ezeknek szerepe van a hypothalamo-hypophysis rendszer neuroendokrin transzmissziójában [85], ugyanakkor eredetük nem ismeretes.

A DA tartalmú sejtek két vidékre a substantia nigra és a diencephalon területére lokalizálhatók [39, 7, 8, 131, 94, 80, 111]. Az eddigi kísérletek arra mutatnak, hogy a két DA csoport egymástól független. A substantia nigra

vidékén (substantia nigra, area tegmentalis ventralis) levő sejtek a nucleus caudatus, tuberculum olfactorium és a septum vidékére projiciálnak (ezek léziós vizsgálatok eredményei [7, 6, 131]), míg a hypothalamusban levő DA sejtek axonjai az eminentia medianában végződnek. Ez utóbbiak szerepe a neuroendokrin működések szabályozásában kétségtelen [85], míg a stria-nigrális DA rendszer funkcionálisan a magatartási és extrapyramidális reflexműködésekkel kapcsolatos. Sikerült azonban bizonyítani, hogy DA kisebb-nagyobb mennyiségben az agy minden területén előfordul [110, 27]; ezek eredete és funkcionális jelentőségük további, részben morfológiai vizsgálatok tárgya.

Serotonin-tartalmú sejtek mai tudásunk szerint kizárólag az agytörzsben, a 8 raphe magban helyezkednek el [39, 50, 20, 94, 69], ezek közül is zömében a nucleus raphe dorsalisban és a nucleus centralis superiorban. Serotonin szintén kimutatható — igen nagy mennyiségi differenciával — csaknem az agy minden területén [123, 109, 120]. Mind biokémiai, mind hisztokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy raphe-lézió után, vagy raphe magtól rostrálisan végzett átmetszések után mind a kéreg, mind a diencephalon 5-HT tartalma exogen serotonin felvétele és triptofán hidroxiláz tartalma csökken [65, 82, 87, 86]. Teljes eltűnés egyetlen fajta beavatkozás után sem volt elérhető. Sajnos az 5-HT fluorescenciája nem a legalkalmasabb morfológiai vizsgálatokra.

Adrenalin jelenlétét az agyban csak a közvetlen közelmúltban sikerült igazolni [72, 73, 122]. Eddig két adrenalin-tartalmú sejtsoport jelenléte igazolt az agytörzsben, de a biokémiai mérések többre engednek következtetni [122]. Igazolt, hogy a telen- és diencephalon adrenalin-tartalmú idegvégződésekkel rendelkezik. Ezek eredetének bizonyítása a jövő feladata. A morfológiai vizsgálatokat nehezíti, hogy az egyszerű fluorescens módszer adrenalin kimutatására nem alkalmas, de immunfluorescens vizsgálatok különböző léziók és átmetszések után kiegészíthetik az ugyanilyen típusú biokémiai vizsgálatokat.

Hangsúlyozni kell, hogy a beavatkozást követő változások értékelése csak „igen-nem” jellegű lehet, vagy eltűnik a fluorescens aktivitás, vagy nem változik. A kismértékű változások becslése a mai biokémiai lehetőségek mellett elégtelen.

Értékes adatot nyújthat a fluorescens aktivitást mutató anyag felszaporodása az átmetszést követően, mivel jelezheti a MA-pálya helyét a vizsgált területen, miáltal a biokémiai módszerekkel soha el nem érhető topográfiai információt nyújt.

b) Fluorescens mikroszkópos vizsgálatok *ideg regenerációs* vizsgálatokban. Ismeretes [21, 24], hogy a monoaminerg neuronok regenerációra képesek. A központi idegrendszerbe ültetett simaizomba vagy irisbe, az erek falába MA axonok nőnek be, átmetszést követően új axonterminálisok képződnek. Ezzel kapcsolatos valamennyi vizsgálat a morfológiai kutatások profiljába tartozik. Ezek szintén „igen-nem” kísérletek, ezt a követelményt nem szabad túllépniük.

BJÖRKLUND és társai [24] figyelték meg, hogy átmetszéseket követően monoaminerg rostok nőnek be a hegszövetbe és egy idő után az átmetszéstől disztálisan is megtalálhatók. Kevés a megfigyelés arra, hogy a regeneráció valamennyi MA rost azonos képessége-e, továbbá a regeneráció időviszonyai és mérve is különböző. Ez a kétségtelenül fontos megfigyelés azt mutatja, hogy a központi idegrendszer MA neuronjai más neuronoktól lényegesen eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek (perifériás típusú neuronok). A MA neuronok regenerációs képességének fluorescens mikroszkópos vizsgálata mind elméleti, mint gyakorlati (topográfiai kutatások) jelentőségű.

c) Fluorescens mikroszkóp használata *fejlődéstani* vizsgálatokban. Erre már találunk sikeres kezdeményezéseket. Ide mind normál fejlődési vizsgálatok, mind experimentális fejlődéstani vizsgálatok tartozhatnak.

A fejlődéstani vizsgálatok többsége [19, 95, 58, 94, 106] patkány ontogenezisére vonatkozik és részleteket szolgáltatnak a MA-ok megjelenésére a fejlődés folyamán. További fejlődéstani vizsgálatok alapjai lehetnek HYYPFÁ [77] fluorescens mikroszkópos, továbbá BENNET és GIARMAN [14] biokémiai vizsgálatai is. Vizsgálatok történtek emberi foetus MA neuronjainak kimutatására is [102]. Számos speciesben végeztek hisztofluorescens vizsgálatokat, de ezen a területen végzett szisztematikus és összehasonlító filogenetikai vizsgálatokról nincs tudomásunk.

d) *Pályakutatások* fluorescens mikroszkópos technika alkalmazásával. Az utóbbi időben a nigrostriatal dopaminerg pálya [75, 99, 131, 30, 80], a dorsalis és a leszálló noradrenalin pálya lefutása többé-kevésbé tisztázott [7, 6, 8, 131, 125, 96, 80], de a feltételezett ventrális NE; továbbá az 5-HT pálya és az adrenalinpálya vagy pályák lefutása még teljesen tisztázatlan. A serotonintartalmú axonok a raphe magoktól a medialis előagyai köteg rostjai közé lépnek [63, 65, 131], de sem pontos lefutásuk az agytörzsben, sem további útjuk a hypothalamusban nem lett nyomon követve.

A pályakutatási vizsgálatok topográfiai jellegűek, az axonok lefutásának követésére szolgálnak: a pályák végződéseinek, az ellátási területnek mikromódszerekkel a morfológiai vizsgálatoknál extaktabban végezhetünk el.

A NE és DA tartalmú pályák vizsgálatára tranilecipromin előkezelés látszik a legeredményesebbnek. A fokozott MA termelés és felhasználás folytán az axonokban áramló MA mennyisége felgyülemlik és fluorescens mikroszkóppal jobban láthatóvá válik. NE és DA szintézist gátló α -metil-p-tirozin oly mértékben csökkenti ezen anyagok zöld fluorescenciáját, hogy a serotonin sárga fluorescenciája jobban láthatóvá válik. Adrenalin-tartalmú pályákról még nem rendelkezünk bizonyító értékű adatokkal.

A pályakutatások lehetőségei: a) léziók, deafferentációk után kombinált vizsgálatok (fluorescens, idegdegenerációs, EM); b) elektrofiziológiai vizsgálatok (unit-potenciál mérések); c) mikroelektroforetikus vizsgálatok. Mindezeknél a monoaminerg eredeti igazolása szükséges. d) Kémiai degenerációs módszerek.

ad a) Léziók, vagy átmetszések után az anterográd degeneráció jeleként a fluorescens aktivitás a korábbi axonok helyén eltűnik, ugyanakkor a beavatkozástól centrálisan felgyülemlik. A degenerálódó axonok, illetve azok töredékei különböző ezüstimpregnációs módszerekkel nyomon követhetők. A terminális degeneráció identifikálására ma már csak az elektronmikroszkópos vizsgálatok tekinthetők perdöntőnek. A fenti három technika szimultán alkalmazása technikailag kétségtelenül bonyolult, de igen elegáns bizonyítékot nyújt egy MA pálya lefutására és végződésére.

ad b) Az ismert MA neuronok elektrofiziológiai módszerrel történő ingerlése után a feltételezett helyekről elvezethető unit-potenciál analízise jól alkalmazható a monoszínaptikus MA neuronok esetében, csupán annak igazolása, hogy az ingerelt sejt MA neuron, okoz utólagos identifikálási problémát.

ad c) Mikroelektroforézissel bevitt anyagokkal egyes neuronok működését igazoltan befolyásolhatjuk. Ez lehet ingerlés vagy gátlás és az ezt követő változásokat morfológiai és elektrofiziológiai módszerekkel egyaránt vizsgálhatjuk az adott neuron terminálisainál.

ad d) Farmakológiai anyagokkal szelektíve roncsolhatunk egyes MA neuronokat. Ezek felhasználására a pályakutatások igen nagy lehetőségeket rejtenek magukban. A noradrenalin tartalmú neuronok roncsolására a 2,4,5-trihidroxifenilalanin (6-OH-DOPA) igen alkalmas, mert amíg a NE axonokban normálisan meglévő kevés NE nem látható, addig 6-OH-DOPA hatására a NE bennük felgyülemlik és fluorescens mikroszkóppal láthatóvá válik. (Előzőleg monoaminoxidáz bénító nialamid adása szükséges.) A 6-OH-DOPA NE-re szelektív, sem DA (csak igen nagy dózis alkalmazása esetén), sem 5-HT nem érzékeny erre az anyagra [79, 124, 125]. Dopamin tartalmú neuronok szelektíve roncsolhatók 6-hidroxidopamin (6-OH-DA) adásával [128, 129, 132, 78, 130, 64, 41], bár ezek kisebb mértékben a NE neuronokat is károsítják [46]. Alkalmazhatók intracerebrálisan [87, 108], vagy intraventricularisan [132, 26, 76]. 5,6-dihidroxitriptamin (5,6-HT) alkalmazásával szelektíve roncsolhatjuk a serotonin-tartalmú sejteket [12, 11, 13, 36, 23] anélkül, hogy a NE vagy DA tartalmú neuronok károsodnának. Ez is intracerebrálisan adva hatásos [41]. Ezen anyagok használata esetén a terminális degenerációt vizsgálhatjuk fluorescens mikroszkóppal, ezüstimpregnációs módszerekkel és elektronmikroszkóppal. A kémiai roncsolást a MA neuronokban fluorescens mikroszkóppal mindig ellenőrizni kell [76].

e) Fluorescens mikroszkópos vizsgálatok *emberi* anyagon. Meglehetősen kevés adat áll rendelkezésünkre és az sem bizonyított, hogy a patkányra kidolgozott topográfiai felosztás emberre érvényes-e.

Az emberi anyag vizsgálatánál a fő probléma a MA-ok elbomlása az idegsejtekben és a végződésekben a halál beállta után. Megállapították, hogy a MA-ok meglehetősen rezisztensek. Ha az agy kivétele néhány órával a halál beállta után történt, a MA-ok fluorescens mikroszkóppal még (ha nem is töké-

letes minőségben) értékelhetők. Legtovább a dopamin jelenléte mutatható ki: 7 órával a halál beállta után kivett anyagban is értékelhető minőségű volt [105]. Nincs pontos adatunk a NE és 5-HT neuronokra és végződéseikre, de néhány órás anyagban még sikerrel próbálkozhatunk.

Az emberi agy MA-jainak vizsgálatára három lehetőségünk van: 1. Idegsebészeti anyagon, melyből készíthetünk metszetet vagy kenetet. 2. Foetusban [102], ahol a feltérképezés lehetősége is fennáll. 3. Post mortem anyagon [34, 42].

Elektronmikroszkóp alkalmazása monoaminerg struktúrák kimutatásában

a) *Qualitatív vizsgálatok.* Nem tekinthető megoldottnak a monoaminok előfordulási formája a neuronban. HÖKFELT [67, 68] vizsgálatai egy bizonyos fajta, apró, 500 Å átmérőjű vezikulumba lokalizálja a NE és DA-t, de nincs adatunk az adrenalin és serotonin megjelenési formájára.

HÖKFELT [68] a kivett agydarabokat jéghideg Krebs—Ringer bikarbonát pufferbe rakta 30 perces inkubálásra. A puffer 10 µg/ml α-metil-noradrenalinot tartalmaz. Inkubálás után az anyagot 3%-os káliumpermanganátban fixálta. A monoaminerg szinaptikus végzésekben a MA-ok kis szemcsés vezikulumok formájában mutathatók ki.

Az amintároló helyek elektronmikroszkópos lokalizálására egy specifikus jelzőanyagot, 5-hidroxi-dopamint is felhasználnak [118, 98].

Mivel nincs olyan agyterület, mely csak egyes amint tartalmazna, az aminok szeparálása az idegvégzésekben csak speciális farmakonokkal előkezelt állatokban képzelhető el. Ez esetben a többi amin teljes kiürülését mind hisztó-, mind biokémiai módszerrel ellenőrizni kell.

A MA-ok EM vizsgálata általában a szinaptikus végzésekben történik [66, 68, 76, 5]. Az aminok szintézisének elektronmikroszkópos nyomkövetése kétségtelen nehéz, de jelzett prekursorok felhasználásával nem megoldhatatlan feladat.

b) *Quantitatív vizsgálatok.* Több kísérlet történt a MA tartalmú vezikulumok számának, vagy denzitásának a szinaptikus végzésekben való meghatározására [76, 5]. Amennyiben az egyes aminok morfológiailag biztonságosan azonosíthatók, a partikulumok denzitásának kvantitatív vizsgálata olyan módszer lehet, melynek jelentősége ma még beláthatatlan. Talán ez a monoaminerg kutatás egyik olyan lehetősége, ahol funkcionális változások megítélése kizárólag morfológiai módszerrel adható meg, mely minden egyéb módszerrel nyert eredmények összehasonlításánál perdöntő fontosságú lehet.

A szinaptikus végzések méretei az EM kép alapján meghatározhatók. Ismerni kell a metszési felszínt és a szinaptikus végzések átlagos átmérőit, melyekből a tömeg kiszámítható [89]. A különböző vezikulumokat le lehet

számolni a metszési felszínen. A mért adatok ismeretében a vezikulumok denzitása és abszolút száma is megkapható. Ezzel a módszerrel számoltuk ki a nucleus ventromedialisban a „dens core” vezikulumok denzitását és változását nialamid kezelés hatására [114].

A kvantitatív EM vizsgálatok ma alkalmazott területe a szinaptikus végződésekből levő szemcsék átmérőinek mérése és azok megoszlásának értékelése. A mérések történhetnek metszeteken, vagy ultracentrifugálás után nyert frakcióból vett mintából.

c) Pályakutatási vizsgálatok. Ismeretes, hogy a szinaptikus degeneráció elektronmikroszkópos kimutatása biztosabb információt nyújt mint az ezüst-impregnációs módszer. Az MA sejteket tartalmazó helyek elektromos léziói, speciálisan MA sejteket roncsoló anyagok (6-OH-DOPA, 6-OH-DA, 5,6-HT) mikroinjekciói [27, 25, 117, 76], vagy deafferentálások után egy adott területen talált terminalis degeneráció biztos jele annak, hogy a vizsgált MA sejtcsoport az adott területet innerválja.

A nucleus dorsalis raphe és a nucleus medianus raphe elektrokoagulációja után a serotoninban gazdag nucleus suprachiasmatisban degenerálódó szinapszisek voltak kimutathatók a műtét után 2–7 nappal [4]. Ezek megjelenése egyértelműen raphe eredetükre utal. Hasonló jellegű vizsgálatok további információkat nyújthatnának.

Az elektronmikroszkópos vizsgálat lehet kvantitatív is; kidolgozott módszer van arra, hogy egy adott terület afferensei részarányát kiszámíthassuk [89, 134]. Ez a lehetőség az MA-ok kutatásában ma még kihasználatlan.

Immunfluorescens vizsgálatok monoaminok lokalizálására

A morfológiai kutatások közül talán a legtöbb új információ az immunfluorescens vizsgálatok elterjedésétől várható. E kétségtelenül munkaigényes módszer specifikitása révén döntő fontosságú.

GIBB és munkatársai [56] mutatták ki először a dopamin- β -dekarboxiláz (DBH) enzim — mely a dopamint noradrenalinná alakítja át — antigén tulajdonságát, mellyel megvetették az immunhisztokémia alapjait a neurotranszmitterek kutatásában. A módszer alkalmazása igen gyorsan elterjedt [55, 60, 31, 52, 61]. Nemcsak a DBH, hanem két másik, catecholamin anyagcserében résztvevő enzim (dopadekarboxiláz-DDC, és a feniletanolamin-N-metiltransferáz-PNMT) is kimutatható immunfluorescens módszerrel [59, 53, 62, 69, 71, 71, 70, 73]. A PNMT immunfluorescens lokalizálása nyitotta meg az utat az adrenalinak a központi idegrendszerben való topográfiai vizsgálatához, mivel a noradrenalinak adrenalinná való átalakulásának folyamatában vesz részt [72, 73].

A noradrenalin zöld fluorescenciája nem különbözik az adrenalinétól

[35, 54], így a kettőnek fluorescens mikroszkópos szétválasztása nem lehetséges. (Ezért tételezték fel sokáig, hogy a központi idegrendszerben csak noradrenalin van.) Először biokémiailag igazolták, hogy a noradrenalin a központi idegrendszerben is átalakul adrenalinná [32, 115], melynek mennyiségére a PNMT méréséből következtethetünk. Ez utóbbira érzékeny enzim-izotópos módszert lehetett kidolgozni és általa az adrenalin eloszlását a központi idegrendszerben biokémiailag sikerült feltérképezni [112]. Az adrenalin topográfiai kimutatására a PNMT immunfluorescenciája adott lehetőséget [72, 73].

Az immunfluorescens módszer további lehetősége: a) további enzimek révén más MA-ok feltérképezése; b) az immunfluorescens módszer felhasználása pályakutatásra és experimentális vizsgálatokra. Ezek kautélái azonosak a fenti helyen tárgyaltakéval. c) Ma még csak elképzelés, de realizálása elvileg lehetséges és más, hasonló jellegű vizsgálatok analógiája alapján várható is, hogy immunhisztokémiai módszerek elektronmikroszkópos alkalmazása a monoaminerg kutatás területére is behatol. Ez azt eredményezheti, hogy a vizsgálatokat, akár molekulár-biológiai finomságig vihetjük le a MA-ok esetében is; és ez kétségtelen a morfológiai kutatás fontos eredményekkel kecsegtető perspektívái közé tartozik.

Autoradiográfias vizsgálatok a központi idegrendszer monoaminjainak kimutatására

A perifériás és központi idegrendszeri monoamin-tartalmú neuronoknak igen nagy és specifikus affinitásuk van exogen katecholaminok felvételére. Ezek viszont jelölhetőek és fény-, illetve elektronmikroszkóppal kimutathatók. Ez az autoradiográfia alapja a MA-ok kutatásában.

Ki lehet mutatni NE végződéseket ^3H -noradrenalinnak intraventrikuláris adása után 3 órával a központi idegrendszerben. (Monoaminoxidáz gátló előkezelés szükséges.) A radioaktivitás a NE tartalmú szinaptikus végződésekben gyülemlik fel [44, 45, 88], ahol mind fénymikroszkóppal, mind elektronmikroszkóppal kimutatható [116, 47, 28]. A módszer kvantitatív értékelésre is alkalmas lehet. A DL- ^3H -NE igen jó elektronmikroszkópos autoradiográfiai vizsgálatokra [1, 3, 43].

Jelzett ^3H -dopamin intraventrikulárisan adva a hypothalamus sejtjeiben elektronmikroszkóppal kimutathatók [38].

A módszer serotonin kimutatására is alkalmas, amikor ^3H -5-HT adunk intraventrikulárisan [2, 100].

Az autoradiográfias módszer alkalmazása a MA-ok vizsgálatában ma még kezdeti stádiumban van. Mai megítélésünk szerint jelentősége nem topográfiai vizsgálatokban, hanem a MA-ok finom anyageseréje egyes lépéseinek közelebbi megismerésében rejlik. Erre kiválóan alkalmas, ha a MA-ok jelzett prekuzo-

rait adjuk be az állatnak [113]. Kétségtelen előnye a specificitás, de kvantitatív alkalmazása — eddigi próbálkozások sikere ellenére is — nem látszik olyan, lényeges új információt nyújtó eljárásnak, mely a módszer rendkívül bonyolult voltával arányban állna.

Következtetések

A monoaminok jelenlétének és szerepének vizsgálata a központi idegrendszerben ma jelentős és divatos ága mind a hisztokémiai, mind a biokémiai kutatásoknak. Kétségtelen, hogy mint ingerátvivő anyagok, alapjai a neurofiziológiai és neuroendokrinológiai jelenségeknek. A MA-ok hisztokémiai (fluorescens mikroszkópos) kutatásának „hőskorán” kétségtelenül túljutottunk, és az experimentális vizsgálatok módszerei a biokémiai területre tolódtak át. Ha azonban reálisan felmérjük a hisztokémiai módszerek korlátait és lehetőségeit, úgy találjuk, hogy a központi idegrendszer monoamin struktúráinak megismerésében a morfológiai kutatások perspektívái változatlanul igen jók. Ezek a lehetőségek négy módszer — fluorescens mikroszkópos, elektronmikroszkópos, immunfluorescens és autoradiográfias módszerek — kategóriába csoportosíthatók. Kétségtelen, hogy mindezek rendkívül munka-, de főleg műszerigényesek, ezért a kutatások óhatatlanul csak nagyobb és jól felszerelt munkacsoportok lehetőségei.

Nem véletlen, hogy a téma érdekessége és jelentősége ellenére is meglepően kevés munkacsoport dolgozik ezen a területen. Ezek a munkacsoportok meglehetősen „féloldalasak”, vagy morfológiai, vagy biokémiai módszerrel és szemlélettel dolgoznak; holott a központi idegrendszer monoaminjai szerepének megismerésére két kutatási ág találkozása és együttes alkalmazása fogja a döntő lépést megtenni.

IRODALOM

1. AGHAJANIAN, G. K., BLOOM, F. E.: *Science* **153**, 308 (1966).
2. AGHAJANIAN, G. K., BLOOM, F. E.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **156**, 23 (1967).
3. AGHAJANIAN, G. K., BLOOM, F. E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **156**, 407 (1967).
4. AGHAJANIAN, G. K., BLOOM, F. E., SHEARD, M. H.: *Brain Res.* 266 (1969).
5. AJIKA, K., HÖKFELT, T.: *Brain Res.* **57**, 97—117 (1973).
6. ANDÉN, N.-E., CARLSSON, A., DAHLSTRÖM, A., FUXE, K., HILLARP, N.-Å., LARSSON, K.: *Life Sci.* **3**, 523 (1964).
7. ANDÉN, N.-E., DAHLSTRÖM, A., FUXE, K., LARSSON, K., OLSON, L., UNGERSTEDT, U.: *Acta physiol. scand.* **67**, 313 (1966).
8. ANDÉN, N.-E., FUXE, K., UNGERSTEDT, U.: *Experientia (Basel)*, **23**, 838 (1967).
9. AXELROD, J.: *J. Biol. Chem.* **237**, 1657 (1962).
10. BATTISTA, A., FUXE, K., GOLDSTEIN, M., OGAWA, M.: *Experientia (Basel)*, **28**, 688 (1972).
11. BAUMGARTEN, H. G., BJÖRKLUND, A., HOLSTEIN, A. F., NOBIN, A.: *Z. Zellforsch.* **129**, 256 (1972).
12. BAUMGARTEN, H. G., BJÖRKLUND, A., LACHENMAYER, L., NOBIN, A., STENEVI, U.: *Acta physiol. scand. Suppl.* 373 (1971).

13. BAUMGARTEN, H. G., LACHENMAYER, L., SCHLOSSBERGER, H. G.: *Z. Zellforsch.* **125**, 553 (1972).
14. BENNET, D. S., GIARMAN, N. J.: *J. Neurochem.* **12**, 911 (1965).
15. BJÖRKLUND, A., EHINGER, B., FALCK, B.: *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 263 (1968).
16. BJÖRKLUND, A., EHINGER, B., FALCK, B.: *Acta Physiol. Scand.* **72**, 253 (1968).
17. BJÖRKLUND, A., EHINGER, B., FALCK, B.: *J. Histochem. Cytochem.* **20**, 56 (1972).
18. BJÖRKLUND, A., ENEMAR, A., FALCK, B.: *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 263 (1968).
19. BJÖRKLUND, A., ENEMAR, A., FALCK, B.: *Z. Zellforsch.* **89**, 590 (1968).
20. BJÖRKLUND, A., FALCK, B., STENEVI, M.: *Brain Res.* **32**, 269 (1971).
21. BJÖRKLUND, A., KATZMAN, K., STENEVI, U., WEST, K.: *Brain Res.* **31**, 21 (1973).
22. BJÖRKLUND, A., NOBIN, A.: *Brain Res.* **15**, 193 (1973).
23. BJÖRKLUND, A., NOBIN, A., STENEVI, U.: *Brain Res.* **53**, 117 (1973).
24. BJÖRKLUND, A., STENEVI, U.: *Brain Res.* **31**, 1 (1971).
25. BLOOM, F. E.: In MALMFORS, T., THOENEN, H. (Eds.), *6-Hydroxydopamine and Catecholamine Neurons*. North-Holland, Amsterdam, pp. 135—150 (1971).
26. BLOOM, F. E., ALGERI, S., GROPPETTI, A., REVVELTA, A., COSTA, E.: *Science* **166**, 1284 (1969).
27. BROWNSTEIN, M. J., SAAVEDRA, J. M., PALKOVITS, M.: *Brain Res.*, **79**, 431 (1974).
28. CALAS, A.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **274**, 925 (1972).
29. CARLSSON, A., FALCK, B., HILLARP, N.-Å.: *Acta Physiol. Scand.* **56** (suppl. 196), 1 (1962).
30. CARPENTER, M. B., PETER, P.: *J. comp. Neur.* **144**, 93 (1972).
31. CHEAN, T. B., GEFFEN, L. B.: *Proc. Aust. Phys. Pharm. Soc.* **1**, 1 (1970).
32. CIARANELLO, R. D., BARCHAS, R. E., BYERS, G. S., STEMMLE, D. W., BARCHAS, J. D.: *Nature (Lond.)* **221**, 368 (1969).
33. CONNOR, J. D.: *J. Physiol. (Lond.)*, **208**, 691 (1970).
34. CONSTANTINIDIS, J., TISSO, R., DE LA TORRE, J. C., GEISSBUHLER, F.: *Path. et Biol.* **17**, 361 (1969).
35. CORRODI, H., JONSSON, G.: *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 65 (1971).
36. COSTA, E., DALY, J., LEFEVRE, H., MEEK, J., REVVELTA, A., SPARRO, F., STRADA, S.: *Brain Res.* **44**, 304 (1972).
37. COYLE, J. T., HENRY, D.: *J. Neurochem.* **21**, 61 (1973).
38. CUELLO, A. C., IVERSEN, L. L.: *Brain Res.* **63**, 474 (1973).
39. DAHLSTRÖM, A., FUXE, K.: *Acta Physiol. Scand.* **62**, (suppl. 232), 1 (1964).
40. DAHLSTRÖM, A., FUXE, K.: *Acta Physiol. Scand.* **64**, (suppl. 247), 1 (1965).
41. DALY, J., FUXE, K., JANSSON, G.: *Brain Res.* **49**, 476 (1973).
42. DE LA TORRE, J. C.: *Acta neuropath. (Berl.)*, **21**, 165 (1972).
43. DESCARRIES, L., DROZ, B.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **266**, 2480 (1968).
44. DESCARRIES, L., LAPIERRE, Y.: *Anat. Rec.* **172**, 301 (1972).
45. DESCARRIES, L., LAPIERRE, Y.: *Brain Res.* **51**, 141 (1973).
46. DESCARRIES, L., SAUCIER, G.: *Brain Res.* **37**, 310 (1972).
47. DOERR-SCHOTT, I., FOLLENIUS, E.: *Z. Zellforsch.* **111**, 427 (1970).
48. FALCK, B.: *Acta Physiol. Scand.* **56** (suppl. 197), 1 (1962).
49. FALCK, B., HILLARP, N.-Å., THIEME, G., TORP, A.: *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 348 (1962).
50. FUXE, K.: *Acta Physiol. Scand., Suppl.* **247**, 36 (1965).
51. FUXE, K.: *Z. Zellforsch.* **65**, 573 (1965).
52. FUXE, K., GOLDSTEIN, M., HÖKFELT, T., JOH, T. H.: *Res. Commun. chem. Path. Pharmacol.* **1**, 627 (1970).
53. FUXE, K., GOLDSTEIN, M., HÖKFELT, T., JOH, T. H.: *Progr. Brain Res.* **34**, 127 (1971).
54. FUXE, K., JONSSON, G.: *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 293 (1972).
55. GEFFEN, L. B., LIVETT, D. G., RUSH, R. A.: *J. Physiol. (Lond.)*, **204**, 593 (1969).
56. GIBB, J. W., SPECTORS, S., UDENFRIEND, S.: *Molec. Pharmacol.* **3**, 473 (1967).
57. GLOWINSKI, J., IVERSEN, L. L.: *J. Neurochem.* **13**, 655 (1966).
58. GOLDEN, G. S.: *Brain Res.* **44**, 278 (1972).
59. GOLDSTEIN, M., FUXE, K., HÖKFELT, T., JOH, T. H.: *Experientia (Basel)* **27**, 951 (1971).
60. HARTMAN, B. K., UDENFRIEND, S.: *Molec. Pharmacol.* **6**, 85 (1970).
61. HARTMAN, B. K., UDENFRIEND, S.: *Pharmacol. Rev.* **24**, 311 (1972).
62. HARTMAN, B. K., ZIDE, D., UDENFRIEND, S.: *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **69**, 2722 (1972).
63. HARVEY, J. A., HELLER, A., MOORE, R. Y.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **140**, 103 (1963).
64. HEDREEN, J. C., CHALMERS, J. P.: *Brain Res.* **47**, 1 (1972).
65. HELLER, A., MOORE, R. Y.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **150**, 1 (1965).

66. HÖKFELT, T.: *Brain Res.* **5**, 121 (1967).
67. HÖKFELT, T.: *Zellforsch.* **79**, 110 (1967).
68. HÖKFELT, T.: *Z. Zellforsch.* **91**, 1 (1968).
69. HÖKFELT, T., FUXE, K., GOLDSTEIN, M.: *Brain Res.* **53**, 175 (1973).
70. HÖKFELT, T., FUXE, K., GOLDSTEIN, M.: *Brain Res.* **62**, 461 (1973).
71. HÖKFELT, T., FUXE, K., GOLDSTEIN, M., JOH, T. H.: *Histochemie* **33**, 231 (1973).
72. HÖKFELT, T., FUXE, K., GOLDSTEIN, M., JOHANSSON, O.: *Acta Physiol. Scand.* **89**, 286 (1973).
73. HÖKFELT, T., FUXE, K., GOLDSTEIN, M., JOHANSSON, O.: *Brain Res.* **66**, 235—253 (1974).
74. HÖKFELT, T., LJUNGAHL, A.: *Histochemie* **29**, 325 (1972).
75. HÖKFELT, T., UNGERSTEDT, U.: *Acta Physiol. Scand.* **76**, 315 (1969).
76. HÖKFELT, T., UNGERSTEDT, U.: *Brain Res.* **60**, 269 (1973).
77. HYYPPÄ, M.: *Z. Zellforsch.* **98**, 550 (1969).
78. IVERSEN, L. L., URETSKY, N. J.: *Brain Res.* **24**, 364 (1970).
79. JACOBOWITZ, D., KOSTRZEWA, R.: *Life Sci.* **10**, 1329 (1971).
80. JACOBOWITZ, D. M., PALKOVITS, M.: *J. comp. Neur.* **157**, 13 (1974).
81. JONSSON, G.: *Progr. Histochem. Cytochem.* **2**, 299 (1971).
82. JOUVET, M.: *Physiol. Rev.* **47**, 117 (1967).
83. KOBAYASHI, M. R., PALKOVITS, M., KOPIN, I. J., JACOBOWITZ, D. M.: *Brain Res.*, **77**, 269 (1974).
84. KOPIN, I. J., PALKOVITS, M., KOBAYASHI, M. R., JACOBOWITZ, D. M.: *Brain Res.*, **80**, 237 (1974).
85. KIZER, J. S., PALKOVITS, M., ZIVIN, J., BROWNSTEIN, M. J., SAAVEDRA, J. M., KOPIN, I. J.: *Endocrinology*, **95**, 799 (1974).
86. KU HAR, M. J., ALHAJANIAN, G. K., ROTH, R. H.: *Brain Res.* **44**, 165 (1972).
87. KU HAR, M. J., ROTH, R. H., AGHAJANIAN, G. K.: *Brain Res.* **35**, 167 (1971).
88. LAPIERRE, Y., BEAUDET, A., DEMIANCZUK, N., DESCARRIER, L.: *Brain Res.* **63**, 175 (1973).
89. LÁRÁNTH, C., ZÁBORSZKY, L., MARTON, J., PALKOVITS, M.: *Exp. Brain Res.*, in press.
90. LIDBRINK, P., JONSSON, G.: *J. Histochem. Cytochem.* **19**, 747 (1971).
91. LIDBRINK, P., JONSSON, G., FUXE, K.: *Brain Res.* **67**, 439 (1974).
92. LINDVALL, O., BJÖRKLUND, A., HÖKFELT, T., LJUNGAHL, A.: *Histochemie* **35**, 31 (1973).
93. LOIZOU, L. A.: *Brain Res.* **15**, 563 (1969).
94. LOIZOU, L. A.: *Brain Res.* **40**, 395 (1972).
95. MAEDA, T., DRESSE, A.: *Acta neurol. belg.* **69**, 5 (1969).
96. MAEDA, T., PIN, C., SALVERT, D., LIGIER, M., JOUVET, M.: *Brain Res.* **57**, 119 (1973).
97. MAEDA, T., SHIMIZU, N.: *Brain Res.* **36**, 19 (1972).
98. MAZZUCA, M., POULAIN, P.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **273**, 1044 (1971).
99. MOORE, R. Y., BHATNAGAR, R. K., HELLER, A.: *Brain Res.* **30**, 119 (1971).
100. NAKAI, Y., SHINKAWA, Y.: *Z. Zellforsch.* **119**, 326 (1971).
101. NYSTRÖM, B., OLSON, L., UNGERSTEDT, U.: *Science* **176**, 924 (1972).
102. OLSON, L., BORÉUS, L.-O., SEIGER, A.: *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **138**, 259 (1973).
103. OLSON, L., FUXE, K.: *Brain Res.* **28**, 165 (1971).
104. OLSON, L., FUXE, K.: *Brain Res.* **43**, 289 (1972).
105. OLSON, L., NYSTRÖM, B., SEIGER, A.: *Brain Res.* **63**, 231 (1973).
106. OLSON, L., SEIGER, A., FUXE, K.: *Brain Res.* **44**, 283 (1972).
107. OLSON, L., UNGERSTEDT, U.: *Brain Res.* **17**, 343 (1970).
108. PALKOVITS, M.: *Brain Res.* **59**, 449 (1973).
109. PALKOVITS, M., BROWSTEIN, M. J., SAAVEDRA, J. M.: *Brain Res.*, **80**, 237 (1974).
110. PALKOVITS, M., BROWNSTEIN, M. J., SAAVEDRA, J. M., AXELROD, J.: *Brain* **77**, 137 (1974).
111. PALKOVITS, M., JACOBOWITZ, D. M.: *J. comp. Neur.*, **157**, 29 (1974).
112. PALKOVITS, M., KOBAYASHI, R. M., JACOBOWITZ, D. M., KIZER, J. S., KOPIN, I. J.: *Neuroendocrinology*, in press.
113. PARIZEK, J., HASSLER, R., BAK, I. J.: *Z. Zellforsch.* **115**, 137 (1971).
114. PREIFER, A. K., SZABÓ, D., PALKOVITS, M., ÖKRÖS, I.: *Exp. Brain Res.* **5**, 79 (1968).
115. POHORECKY, L. A., ZIGMOND, M., KARTEN, H., WURTMAN, R. J.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **165**, 190 (1969).
116. REIVICH, M., GLOWINSKI, J.: *Brain* **90**, 643 (1967).
117. RICHARDS, J. G.: In MALMFORS, T., THOENEN, H. (Eds.), *6-Hydroxydopamine and Catecholamine Neurons*, North-Holland, Amsterdam pp. 159—161 (1971).
118. RICHARDS, J. G., TRANZER, J. P.: *Brain Res.* **17**, 463 (1970).
119. SAAVEDRA, J. M., BROWNSTEIN, M. J., AXELROD, J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **186**, 508 (1973).

120. SAAVEDRA, J. M., BROWNSTEIN, M. J., PALKOVITS, M.: *Brain Res.*, **79**, 437 (1974).
121. SAAVEDRA, J. M., BROWNSTEIN, M. J., PALKOVITS, M., KIZER, J. S., AXELROD, J.: *J. Neurochem.* **23**, 869 (1974).
122. SAAVEDRA, J. M., PALKOVITS, M., BROWNSTEIN, M. J., AXELROD, J.: *Nature*, **248**, 695 (1974).
123. SAAVEDRA, J. M., PALKOVITS, M., BROWNSTEIN, M. J., AXELROD, J.: *Brain Res.*, **77**, 157 (1974).
124. SACHS, C., JONSSON, G.: *J. Neurochem.* **19**, 1561 (1972).
125. SACHS, C., JONSSON, G., FUXE, K.: *Brain Res.* **63**, 249 (1973).
126. SMITH, R. E.: *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 590 (1970).
127. SPECTOR, S., SJOERDSMA, A., UDENFRIEND, S.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **147**, 86 (1965).
128. TRANZER, J. P., THOENEN, H.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **257**, 343 (1967).
129. UNGERSTEDT, U.: *Europ. J. Pharmacol.* **5**, 107 (1968).
130. UNGERSTEDT, U.: In MALMFORS, T., THOENEN, H. (Eds.), *6-Hydroxydopamine and Catecholamine Neurons*, North-Holland, Amsterdam pp. 101—127 (1971).
131. UNGERSTEDT, J.: *Acta Physiol. Scand., Suppl.* **367**, 1 (1971).
132. URETSKY, N. J., IVERSEN, L. L.: *Nature (Lond.)*, **221**, 557 (1969).
133. WURTMAN, R. J., AXELROD, J.: *Biochem. Pharmacol.* **12**, 1439 (1963).
134. ZÁBORSZKY, L., LÉRÁNT, C., MAKARA, G. B., PALKOVITS, M.: *Exp. Brain Res.*, in press.