

Medicin. fak. - št. 5091 1

PATO-FIZIOLOŠKI INŠTITUT  
MEDICINSKE FAKULTETE  
UNIVERZE V LJUBLJANI

03880111

Rudi Pavlin

NAČIN DELOVANJA NEKATERIH PSIHOTROPNIH SNOVI

Disertacija



8 2322/1040

LJUBLJANA, JUNIJA 1964

11 196330 - ...

UNIVERSITETA LJUBLJANA  
FACULTETA ZA VEŠTINSKI INŽENIRING  
KATEDRA ZA VEŠTINSKI INŽENIRING

11196330

1963

UNIVERSITETA LJUBLJANA

1963



8 2355/1966

UNIVERSITETA LJUBLJANA

Za vso pomoč in številne nasvete se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju, predstojniku inštituta profesorju dr. A. O. Župančiču. Njemu pa tudi vsem članom strokovnega kolegija Patofiziološkega inštituta globoka zahvala za stimulative pripombe pri pisanju disertacije. Tehničnemu osebju se zahvaljujem za pomoč in sodelovanje pri eksperimentalnem delu.

R. Pavlin



## KAZALO

SIMBOLI . . . . .	5
DELOVNI NAČRT . . . . .	6
UVOD . . . . .	7
Metode in tehnike . . . . .	7
Psihotropne snovi . . . . .	11
Retikularna formacija . . . . .	15
METODIKA . . . . .	16
Delo s pogojnimi refleksi . . . . .	16
Merjenje aktivnosti holinesteraz v homogenatih možganov . . . . .	18
Izoliranje sivnih celic in merjenje aktivnosti holinesteraz . . . . .	20
Merjenje aktivnosti monoamino oksidaze v homogenatih možganov . . . . .	22
Uporabljane kemikalije . . . . .	22
REZULTATI IN RAZPRAVLJANJE . . . . .	23
Učinki LSD na pogojne reflekse . . . . .	24
Mehanizem delovanja LSD . . . . .	30
Vageja pogojnih refleksov in aktivnost holinesteraz . . . . .	36
Vpliv LSD na aktivnost holinesteraz . . . . .	38
Lokalizacija delovanja LSD v centralnem sivstvu . . . . .	42
Vpliv DPDA na pogojne reflekse in na aktivnost butirilholinesteraze . . . . .	46
Pomen butirilholinesteraze v centralnem sivstvu . . . . .	50
Vpliv atropina na pogojne reflekse in možganske holinesteraze . . . . .	51
Vpliv BW284C51 na pogojne reflekse in možganske holinesteraze . . . . .	55



Presoja inhibicije 'in vivo' . . . . .	58
Drugi inhibitorji holinesteraz kot psihotropne snovi . . . . .	62
Vpliv BOL na pogojne reflekse in možganske holinesteraze . . . . .	64
Retikularna formacija in psihotropne snovi .	67
Merjenje aktivnosti holinesteraz v posameznih živčnih celicah retikularne formacije in vpliv LSD in atropina na aktivnost holinesteraz . . . . .	70
Aktivnost holinesteraz v možganskem deblu in optični peti pri Sloveku . . . . .	82
Pomen adrenergičnega sistema pri delovanju LSD na pogojne reflekse . . . . .	84
POVZETEK REZULTATOV . . . . .	90
NAJVAŽNEJŠI ZAKLJUČKI . . . . .	94
LITERATURA . . . . .	98

## SIMBOLI

ACh	acetilholin
AChE	acetilholinesteraza
BDL	bronov derivat dietilamida lisergijske kisljine
BuCh	butirilholin
BChE	butirilholinesteraza
BW284051	1:5-bis(alildietilamoniumfenil)pentan- -3-dibromid
ChE	holinesteraza
DPDA	bis(diisopropilamino)fosfat
EEG	elektroencefalogram
ERG	elektroretinogram
5-HT	5-hidroksitriptamin
IH	iproniazid
I <sub>50</sub>	molarna koncentracija inhibitorja, ki povzroči 50 % inhibicije
LSD	dietilamid lisergijske kisljine
MAO	monoamin oksidaza
MCh	acetil-beta-metilholin
SNP	standardna napaka povprečja
Ty	tiramin

## PREVODI NEKATERIH TUJIN IZRAZOV

obnašanje	behavior
pogojni umik	conditioned avoidance response
vzdrumljenje	arousal reaction



## DELOVNI NAČRT

Diethylamid lisergijske kisline povzroči pri ljudeh v mikrogramskih dozah psihozi podobno stanje, ki traja nekaj ur, pri poskusnih živalih pa rasno motnje v obnašanju. Namen našega študija je, da s ene strani preučujemo vpliv diethylamida lisergijske kisline na obnašanje poskusnih živali, s druge pa, da merimo vpliv te snovi na aktivnost možganskih holinesteraz in monoamine oksidaze. Glavni namen tega dela je preiskati, ali obstaja zveza med obnašanjem živali in aktivnostjo teh encimov ali ne.

Raziskovalno delo bi zato teklo v dveh smereh: A. kvantitativno meriti s metodo pogojnih refleksov vpliv psihotropnih snovi na podgane in B. s Warburgovo in drugimi manometričnimi metodami meriti aktivnost holinesteraz in monoamine oksidaze v možganih podgan, ki so pod vplivom diethylamida lisergijske kisline pokazale spremenjeno obnašanje. Sprva bi merili aktivnost v celih možganih, nato pa v vedno manjših regijah.



## UVOD

Raziskavanja na področju psihofarmakologije so odkrila ozke povezave med delovanjem nekaterih biološko aktivnih snovi in obnašanjem človeka ali poskusnih živali. Skupno s opazovanjem novih psihofarmakoloških pojavov pa so se razvijale nove domneve o naravi učinkovanja psihotropnih snovi na obnašanje.

Klasična metoda za preskušanje farmakoloških učinkov na centralno živčevje je opazovanje. Pomanjkljivost metode je v tem, da ne daje točne kvantitativnih podatkov in da ni selektivna. Zato so razvili različne metode, ki pa so pogostoma zelo komplicirane in vodijo celo do protislovnih rezultatov. Za namene našega dela, t.j. način delovanja nekaterih psihotropnih snovi, je bilo treba v prvi vrsti najti preprost test, ki bi omogočil merjenje psihofizioloških zmogljivosti pri poskusni živali.

### Metode in tehnike

Izbirali smo med različnimi metodami, ki jih lahko razvrstimo v pet skupin:

- a) merjenje spontanega gibanja,
- b) preučevanje nagonских reakcij in obnašanja,
- c) labirintne metode,
- č) preskušanje zmogljivosti razločevanja in
- d) pogojni refleksi.

Najstarejša metoda za preučevanje farmakoloških, fizioloških in psiholoških funkcij je merjenje spontanega gibanja. Prvotno metodo je konec prejšnjega stoletja objavil Stewart (1898), izboljšal pa jo je Skinner

(1953). Žival denemo v boben, ki se vrti, če žival teče. Metoda je v rabi predvsem za preučevanje lakote in seje, vpliva teme in svetlobe ter endokrinih faktorjev.

Preučevanje nagonskih reakcij in obnašanja se bavi z vplivom posameznih nagonov pri premagovanju nenadnih zaprek, kompliciranih situacij in nastanku poskusnih nevros. Opisani so aparati z glavno značilnostjo, da mora poskusna žival pri izvedbi določene nagonske reakcije premagati neke ovire, ki je lahko merimo (jarek, voda, električni tok itd.). Že klasični so aparati po Tsaiu (1952) in Wardenu (1931). V to skupino sodijo tudi merjenja socialnega obnašanja, kot sta obnašanje pri gradnji gnezda in obnašanje pri kopulaciji. Za to metodo se nismo odločili, ker psihološki učinki snovi, s katerimi smo eksperimentirali, zadevajo prvenstveno druge grupe psihičnih dejavnosti.

Labirintne metode so najbolj pogoste uporabljene psihofiziološki testi. Bistvo je v tem, da najde žival v labirintu najkrajšo pot do cilja, kjer ponavadi dobi nagrado - hrano. Prvi je opisal labirintne metode Small (1901). Danes imamo na desetine raznih izvedb, praktične pa se labirintne metode uporabljajo največ pri ocenjevanju obnašanja in presoji učne nadarjenosti pri raznih razmerah.

Prekus možnosti razločevanja temelji na teoriji Pavlova o zaveru razlikovanja. Žival se mora med dvema barvama, vzorcema, glasovema itd. odločiti za pravi znak, za kar dobi nagrado, sicer pa kazno. Najbolj izdelane metode je opisal Lashley (1936) in je uporabljamo za prekus razločevanja pa tudi za povzročanje poskusnih nevros.



Odločili smo se za metodo posejnih refleksov, ker je najbolj izdelana in raziskana, ker omogoča ob preprosti aparaturi objektivno merjenje in ker je podgana odlična žival za to metodo. Če metode posejnih refleksov I. P. Pavlov je ob koncu prejšnjega stoletja opisal pogojne reflekse in sestavil klasično poskusno ureditev, ki dobrih trideset let ni doživela bistvene modifikacije, dokler ni leta 1933 Skinner razvil tehnike, pri kateri podgana na pogojni dražljaj odgovori tako, da pritisne na vzvod. Od tedaj so se začele razvijati razne modifikacije, za naše delo pa je posebna tehnika Warnerja (1932), ki je prvič uporabil beg živali s električne nabite mreže kot pogojno reakcijo. Uporabljal je kletke, razdeljene s vratci v dva prekata in s dnom iz kovinske mreže. V mrežo je lahko spustil električni tok, pogojna reakcija pa je bila beg živali na pogojni dražljaj iz enega v drugi del kletke. Collhorn, Kessler in Minatoya (1942) so Warnerjevo napravo uporabljali za povzročanje poskusnih nevroz. Drugi eksperimentatorji so spremenili Warnerjevo napravo ustrezno z nameni meritev, vse tehnike pa so bile namenjene teoretskemu proučevanju posejnih refleksov, pa tudi za preskušanje raznih farmakoloških učinkov.

S kakimi tehnikami so proučevali psihomotorične učinke LSD in drugih psihotropnih snovi do sedaj? Večina tehnik ima klasično pogojno reakcijo le kot osnovni skelet in se od nje močno razlikuje tako glede na dražljaje kot po sproženih odgovorih. Nove modifikacije posejnih refleksov so najprej uvedli pri studiju nove skupine zdravil, tako imenovanih trankvilizantov. Pri tem so dajali prednost tehnikom, ki uporabljajo pogoj-



ni umik. Poleg rabe pri raziskavanju trankvilizantov pa se se te tehnike izkazale tudi pri raziskavah problemov, ki so v zvezi s druge grupe psihotropnih snovi, to je psihosomatskih.

Tehnike: 1. Winter in Flataker sta leta 1949 objavila in kasneje (1956) za LSD uporabila tehnika plezanja po vrvi (rope climbing technique). Lesne podgane se daje vzgojiti, da splezajo po proste visoki vrvi navzgor, na vrhu pa dobe za nagrado hrano. Meri se čas plezanja. Tehnika je le delno pogojni umik, vendar je mnogo uporabljajo za preučevanje vpliva nekaterih zdravil na obnašanje podgan.

2. Skok na palico (pole-jump) je ime za tehniko, ki je tipičen predstavnik metod za opazovanje pogojnega umika in se jo na temelju Winterjeve in Flatakerjeve tehnike izdelali leta 1955 Cook, Weidley, Morris in Mattis. Trenirana podgana skoči na leseno palico, da se izogne udarcem električnega toka v mreži na dnu kletke. Podaljšanje reakcijskega časa - interval med začetkom pogojnega dražljaja in skokom na palico - je občutljivo merilo za spremembe pogojnega obnašanja. Prednost tehnike je v tem, da sivali ne kažejo strahu, ker je palica varno pribesališče, slabost pa v tako imenovanem sekundarno pogojenem umiku; sivali namreč skatejo na palico se pred pogojnim dražljajem.

3. Pobeg v vedoravni smeri - Akatla, ki stresa (shuttle box). Warner je leta 1932 opisal tehniko, pri kateri denemo podgane v skatlo z dvema prekatoma in mrežastim dnom. Za opozorilnim signalom (pogojni dražljaj) sledijo udarci električnega toka v mreži (brezpogojni dražljaj); sivali se priuče, da se izognejo udarcem tako, da zbeže iz enega prekata v drugi skozi majhne lopute, ki deli skatlo. Tehniko sta podrobno izdelala

Büttig in Grandjean (1957) in omogoča tri tipe odgovorov: a) žival odgovori na pogojni dražljaj z umikom. Po intenzivnem treningu doseže večina živali 90 - 100 % umikov. b) žival ne odgovori na pogojni dražljaj, pač pa na brezpogojni. To je brezpogojni odgovor, imenovan tudi odgovor bega in pomeni specifični blok pogojnega umika. c) žival sploh ne skoči, raje dobiva udarce električnega toka. To se pojavi pri poskusni nevrozi ali pri okvari lokomocije.

To tehnike smo uporabljali v pričujočem delu in je v marsičem izpopolnili. Tehnika omogoča med drugim, da variramo razmere, v katerih poteka pogojni umik; na primer interval med pogojnima in brezpogojnima dražljajema, kar je važno za posreditev pogojnega refleksa. Po Ganttu (1952) moremo s metode pogojnega umika v določenih poskusih odkriti neke okvare v funkciji daleč pred biokemičnimi in nevrološkimi testi. Ta avtor je s te tehnike prvi testiral farmakološke snovi s psihičnimi učinki, tako imenovane psihotropne snovi.

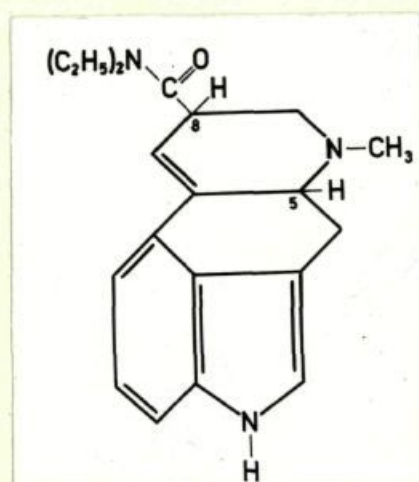
### Psihotropne snovi

Nomenklatura teh snovi se ni ustaljena. Po Hoffmannu (1959) zajema pojem psihotropne snovi velik spekter snovi, ki več ali manj zadevajo psiho, npr.: analgetike, evforike, sedative, trankvilizante, stimulanse, hipnotike in psihosomatske snovi. Psihosomatske snovi se od drugih psihotropnih snovi razlikujejo v tem, da povzročajo akutne in občasne spremembe v zaznavi realnosti, občutku prostora in časa in celo zavesti, čeprav te praviloma ostane ohranjena.

Med psihosomatske snovi steje tudi LSD, napol



sintetska snov, katere psihične učinke je spomladi 1943 nehote preskusil na sebi in jih kasneje načrtno preučil sam odkritelj te snovi A. Hoffman iz Sandozovih laboratorijev. Od tedaj je LSD predmet nestetih farmakoloških in kliničnih publikacij, posebno se zato, ker ima pred drugimi psihosimetskimi snovmi več prednosti: a) da se sintetizirati in je njena strukturna formula znana (slika 1):



Slika 1. Strukturna formula LSD.

b) se v mikrogramskih dozah povzroča pri človeku ob ohranjeni zavesti psihozi podobno stanje, ki traja več ur in

c) inhibira ChE v možganih.

Intravensko injicirana LSD izgine naglo iz obtoka (človek, miška) in ga najdemo v različnih organih, največ v jetrih, kjer se izloča s žolcem v črevo. Presenetljivo je, da le majhen del injicirane doze pride v



možgane in celo po intraventrikularni injekciji iz-  
gine LSD in možganov enako hitro kot po intravenski.  
Zato domnevajo, da LSD samo sproši neke centralne re-  
akcije (Hoffman, 1959). Akutna toksičnost močno vari-  
ira pri različnih živalih. Zelo so občutljivi kuni,   
medtem ko so miške skoraj neobčutljive. Periferni  
učinki LSD so simpatikotonični: midriaza, hipergli-  
kemija, piloerекcija, tahikardija in tahipneja, ven-  
dar so povzročeni centralne, kar potrjujejo inhibitor-  
ni učinki adrenolitikov, ganglioplegikov in hipnotikov.  
V mnogih testih poveča LSD delovanje adrenalina, nor-  
adrenalina in amfetamina. Pri mački facilitira LSD spi-  
nalne reflekse, pri kunu pa že v mikrogramski dozi  
močno dvigne telesno temperaturo.

V tem delu nas zanima mehanizem psihozomimetskega  
delovanja LSD. Stare razlage so govorile o vplivu LSD  
na delovanje serotonina, ki velja za enega od mediator-  
jev pri normalnih psihičnih procesih. Res je LSD izra-  
zit antagonist perifernih učinkov serotonina, vendar je  
malo verjetno, da bi tak antagonizem med LSD in seroto-  
ninom veljal tudi v centralnem živčevju: ugotovili so  
namreč, da BOL nima psihozomimetskih učinkov, kljub  
temu, da je enako močan periferni antagonist serotoni-  
nu kot je LSD. Leta 1955 pa so Thompson, Tickner in  
Webster ugotovili, da LSD že v zelo nizkih koncentra-  
cijah inhibira BChE v možganih človeka in različnih živa-  
li. To nas je navedlo na misel, da raziskamo, če obstaj-  
ja zveza med inhibitornim učinkom LSD na možganske ChE  
in MAO ter njegovimi psihičnimi učinki. Dosedanja farmako-  
loska raziskavanja kažejo, da spremembe v živčni aktiv-  
nosti, ki so nastale po delovanju splošnih anestetikov,  
analgetikov, nevroleptikov in drugih snovi, primarno  
zavise od sprememb v sinaptičnem prenosu živčnih impul-



zov (Zakusov, 1961).

Zavedamo se, da moramo biti oprezní, če hočemo izluščiti fiziološki pomen ustreznih encimov pri delovanju testiranih snovi na pogojne reflekse. Vendar kaže, da vsaj del centralnih učinkov psihozomimetskih snovi lahko pripisujemo njihovim antiholinesteraznim in antimonosamino oksidaznim lastnostim in to iz tehle razlogov: 1. te snovi močno inhibirajo ChE in MAO v homogenatih podganjih možganov in vitro,

2. učinek na pogojne reflekse se pojavi po določeni latentni dobi, kar govori za indirektn mehanizem delovanja, to je, da se endogene sproščeni mediatorji nakopičijo do kritičnega nivoja in

3. učinkov na pogojne reflekse ne moremo pripisovati delovanju inhibitorjev na možganske tkiva.

Zakusov (1961) zatorej meni, da so učinki mnogih farmakov na pogojne in brezpegojne reflekse posledica njihovega delovanja na sinaptični prenos vzburjenja. Klasičen poskus v svezi z našim programom sta napravila Fundenbark in Case (1947), ki sta impresionirana po konvulzivnem delovanju lokalno apliciranega ACh, raziskavala učinkovanje holinergikov na pogojne reflekse pri maški. Pogojne reflekse sta zavrla s eserinom, učinkovanje eserina pa sta preprečila atropin in magnezijev sulfat. Teu prvim raziskavam o posebnosti holinergikov pri pogojnih refleksi je sledila cela vrsta, tako tudi poskusi Michelsona s sodelavci (Michelson, 1961), ki so po petnajsetih letih raziskovanja zaključili, da se v možganskih področjih, kjer je sedež visje živčne aktivnosti prisotni holinergični nevroni. Možno je, da bi učinki raznih snovi na pogojne reflekse bili posledica delovanja teh snovi na holinergični sistem tako v možganski skorji kot v retikularni formaciji. Denisenko (1961) je našel po holinomimetičnih



kakor tudi adrenomimetikih desinhronizacije v možganski skorji in retikularni formaciji, po ustreznih likih pa sinhronizacije.

### Retikularna formacija

V zadnjih letih se čedalje bolj zavedamo pomena retikularne formacije možganskega debla pri vzpostavljanju pogojnih refleksov (Morell, 1961). Kaže, da je retikularna formacija potrebna, da se pri tvorbi pogojnega refleksa sklene krog. To potrjujejo: 1. podatki, da pri dekorticiranih živalih lahko se vidimo rudimentane pogojne reakcije, 2. če delno uničenje retikularne formacije možganskega debla prekine pogojni refleks in 3. lahko draženje retikularne formacije bodisi facilitira, bodisi inhibira pogojne reflekse (Gastaat, 1958).

V retikularni formaciji možganskega debla sta zastopana tako holinergične kot adrenergične živčevje. Killam (1962) se v obširnem pregledu o holinergičnih mehanizmih v retikularni formaciji nagiba k mnenju, da so ti manj pomembni kot adrenergični. Glavna opora za to so podatki Bradleya in Koya (1958), da ACh oziroma holinomimetiki sicer vplivajo na EEG pri draženju retikularne formacije, ne spremene pa obnašanja. Drugi elektrofiziologi pa zaradi učinkovanja farmakoloških snovi na električno aktivnost menijo, da ima ravno holinergični sistem vreten pomen v retikularni formaciji; ves mehanizem centralnega delovanja antiholinergičnih snovi naj bi potekal ravno preko vpliva na retikularno formacijo (Ilyatchenok, 1961).

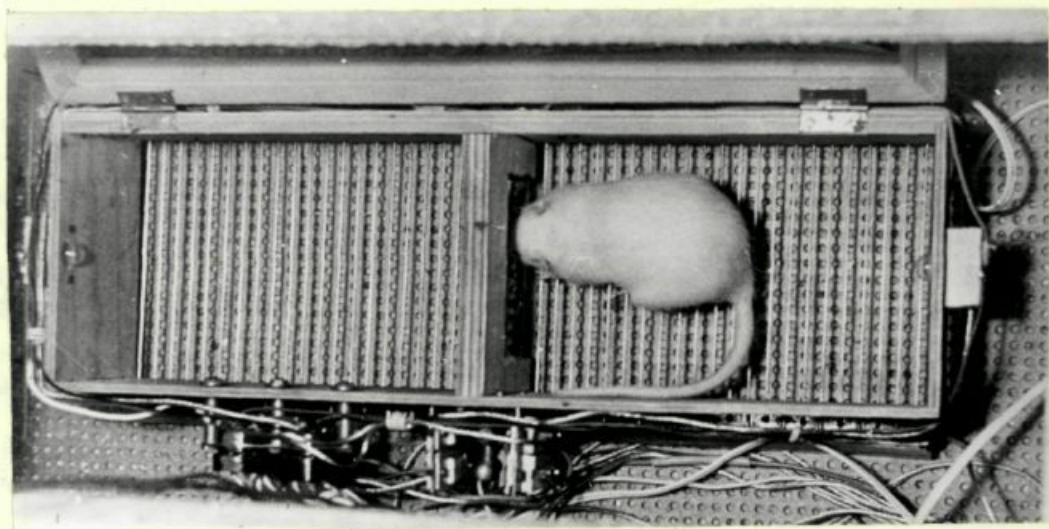
Pri obdelavi naše naloge nas je se prav posebno zanimalo, ali izsamo tudi v retikularni formaciji ho-

linergični sistem. Mnoge učinke holinergičnih psihosomatskih snovi na pogojne reflekse bi mogli razložiti z delovanjem na retikularno formacijo. Z delovne naloge smo skušali razjasniti tudi pomen nekaterih encimov pri delovanju psihosomatskih snovi, tako v celotnih možganih kot se posebej v retikularni formaciji.

### METODIKA

#### Delo s pogojnimi refleksi

V akustično čimbolj izoliran zaboj postavimo kletko (50 x 20 x 15 cm) s steklenim pokrovom in dnom iz kovinske mreže s kontakti za električno draženje. V sredini kletke je loputa, pod katero lahko pobegne podgana iz onega prekata kletke v drugega (Slika 2).



Slika 2. Kletka za pogojne reflekse.



Pogojni dražljaj je svetloba električne lučke, ki se prižiga 1,5 sekunde pred brezpogojnim dražljajem. Brezpogojni dražljaj je niz sunkov električnega toka v mreži, napetost 120 - 140 V, frekvenca 2,4 Hz, trajanje niza 4,5 sekunde.

To tehniko smo izboljšali v več točkah:

- reakcijski čas registriramo avtomatsko z električne stoparice (sprožitev hkrati s pogojnim dražljajem; zaustavitev vezana na preklon lopute pri prehodu sivali),

- stoparice vrne do ničle ista časovna baza, ki sproži pogojni dražljaj,

- poskusna sival sama pri prehodu pod loputo preklopi električne ureditev v tisti prekat, kamor steče; ta preklon gre preko zakasnitvenega mehanizma.

Tabela 1. Umik za vsako pogojnih reflektov in časi pri poskusu.

Dnevi	1.	2.	3.	4.	5.	6. in 7.	8. in naprej	Poskus
Čas pri- vejanja na aparature	120 min	120 min	5 min	5 min	3 min	Positek	2 min	2 min
Število poskusov	-	-	5	10	20	-	30	10 na vsakih 15 min
Posledek med draženji	-	-	120 sek	60 sek	30 sek	-	6 sek	6 sek
Zakasnitev brezpogoj- nega draž- ljaja	-	-	1,5 sek	1,5 sek	1,5 sek	-	1,5 sek	1,5 sek

Pogojne reflekse smo privzgjajali po nekoliko spremenjenem urniku Büttiga in Grandjeana (1957) (Tabela 1). Uporabljali smo bele podgane obeh spolov, s teže 100 - 120 g ob začetku poskusa. Pri tem postopku nismo nikdar opazili nevroze in po treh tednih vaje so imele sivali nad 80 % uvečbenih pogojnih refleksov, kar smo jemali kot bazo za nadaljnje delo. Za podkrepitev pogojnih refleksov smo skrajšali interval med pogojnimi in brezpogojnimi dražljaji v 3 - 5 draženjih pred poskusom na eno sekundo.

Izvedba poskusa. Vsako snov smo injicirali pod kožo v fiziološki raztopini ter takoj po injekciji in v presledkih po 15 minut desetkrat dražili. Šteli smo pogojne reflekse in merili reakcijski čas. Kot reakcijski čas smo jemali dobo od začetka pogojnega dražljaja do trenutka, ko sival na begu v drugi prekat preklopi loputo in tako ustavi stoparico. Poskus smo nadaljevali, dokler nismo s opet dosegli enakih časov kot pred injiciranjem preskušane snovi. Poskuse smo delali pri sobni temperaturi.

#### Merjenje aktivnosti holinesteraz v homogenatih možganov

Uporabljali smo Warburgovo manometrično tehniko. Za encimski preparat smo jemali homogenate možganov podgane; nekaj poskusov smo napravili tudi na možganih človeka. Človeške možgane smo dobili pri obdukciji ljudi, ki niso umrli za cerebralnimi ali cerebrovaskularnimi obolenji ali infekcijskimi boleznimi. Obducirani so bili kakorih 10 ur po smrti; možgane smo hranili pri  $-20^{\circ}$  C. Podganje možgane smo dobili po artrovanju sivali v etrovi omami ter izpiranju možganov



s perfuzije 80 ml fiziološke raztopine skozi abdominalno aorto. Homogenate smo napravili v homogenizatorju s steklenim batom in jih uporabljali sveže. Zmečkance smo dobili tako, da smo s koščeno lopatico mečkali možgane na stekleni ploščici toliko časa, da je masa postala lepljiva in homogena pri pregledu z golim očesom. Nato smo v Warburgove posodice z znano težo dajali po 50 - 100 mg zmečkancev. V uvodnih poskusih smo primerjali aktivnost ChE v encimskih preparatih homogenatov in zmečkancev (Diagram 1) (Pavlin in Thompson, 1961).

TRUE AND PSEUDO-CHOLINESTERASE ACTIVITIES IN HOMOGENATES AND IN "BREI" PREPARATIONS OF BRAIN AND SPINAL CORD. (Expressed as $\mu\text{l.CO}_2/\text{g. wet wt./hr.}$ ; Mean values $\pm$ S.E.M.)				
Tissue	Substrate	Brei (B)	Homogenate (H)	B/H
Rat brain (4)	MCh	9,460 $\pm$ 633	6,609 $\pm$ 119	1.4
Rat brain (6)	BuCh	1,529 $\pm$ 73	1,066 $\pm$ 49	1.4
Rat spinal cord (4)	MCh	3,531 $\pm$ 249	2,821 $\pm$ 194	1.2
Rat spinal cord (4)	BuCh	1,031 $\pm$ 95	629 $\pm$ 66	1.6
(No. of experiments given in brackets)				

Diagram 1. Aktivnost ChE v homogenatih in zmečkanih podganjih možganev.

Čeprav so zmečkanci pokazali večjo aktivnost ChE, smo se odločili za homogenate, ker jih je preprosteje pripraviti in ker med vzorci ni bistvenih razlik v aktivnosti. V poskusih in vivo smo injicirali sivalin inhibitor podkožno in jih strtovali čez pol ure.

Inkubacijska tekočina (Augustinsson, 1955) je bila sestavljena iz 10 ml NaCl 1,054 %, 0,2 ml  $MgCl_2 \times 6 H_2O$  1,76 % in 3 ml  $NaHCO_3$  0,54 %. V njej smo tik pred poskusom rastopili substrate in inhibitorje. Koncentracije so končne in navedene pri rezultatih.

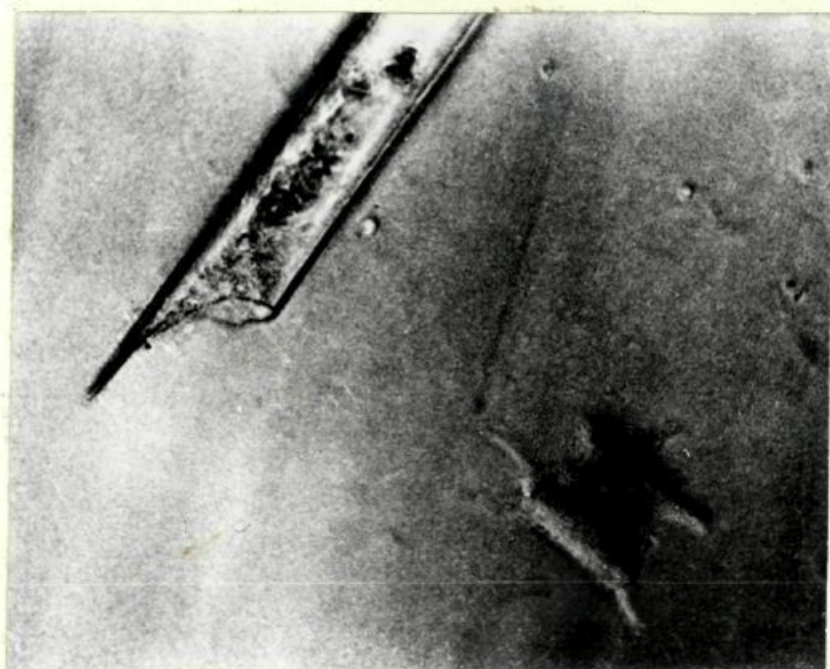
Izvedba poskusa. Polnitev posodice: po 0,3 ml encimskega preparata, substrata in morebitnega inhibitorja, nato inkubacijske tekočine do 3 ml. Temperatura  $38^\circ C$ , plinska faza 95 %  $H_2$  in 5 %  $CO_2$ . Vsa merjenja so v dveh paralelkah, upoštevali smo začetne brzine reakcije ter ekstrapolirali na eno uro, neencimske hidrolize smo odšteli.

#### Isoliranje sivčnih celic in merjenje aktivnosti holinesteras

Podgane smo dekaptirali v lahni etrovi omami. Takej nato smo odstranili možgane in napravili 1 - 2 mm debelo rezino iz zaščenega področja. Rezine smo prenesli v posodice s 250 mM rastopino saharoze. Celice smo nalahno obarvali s metilenskim modrilom ter izolirali posamezne sivčne celice iz ostalega tkiva, kot sta to opisala Hyden in Figon (1960). V inkubacijski tekočini so se celice rasbarvale, nato smo jih verkali v ponirka ampule (Slika 3).

Izvedba poskusa je taka, kot so opisali Zajček in Zeuthen (1957) ter Brzin in Zeuthen (1961). Temperatura  $25^\circ$  ali  $38^\circ C$ . Substrat je bil tik pred poskusom rastopljen v inkubacijski tekočini (pH 7,4), ki je opisana pri merjenju aktivnosti ChE v homogenatih. Ponirke iz pyrekovega stekla smo v začetnih poskusih inkubirali pred poskusom vsaj 12 ur v inkubacijski te-





Slika 5. Izolirana živčna celica in vrh ponirka.  
Povečava 220-krat.

kočini, ki je bila nasičena z mešanico plinov 95 %  $N_2$  in 5 %  $CO_2$ , v kasnejših poskusih pa smo jih uporabljali brez preinkubacije; v rezultatih ni bilo razlike. Dolžina ponirkov: 20 - 30  $\mu m$ , teža 0,5 - 1,5 mg. Da bi preprečili neprijetno lepljenje celic na steklo ponirka, smo vratove ponirkov prevlekli s tenko plastjo agarja, tako da smo suhe ponirke za hip vtaknili v vročo raztopino agarja in jih nato posušili. Ta dopolnitev metode nam je omogočila verikavanje dveh do štirih celic v istega ponirka in je močno pospešila delo; z druge strani pa smo z izpihavanjem in ponovnim verikavanjem celic lahko menjali inkubacijske tekočine, kar je bilo zlasti važno pri določanju inhibicije v isti celici.

Začetna perioda je bila 40 minut; spremembe na manometru smo odčitavali 1 - 2 uri vsakih 5 - 15 minut. Občutljivost metode je okoli  $5 \pm 0,25 \times 10^{-5}$  ml  $\text{CO}_2$ /hr.

Približni volumen celice smo določali s metodo po Micklewrighta in dr. (1953).

#### Merjenje aktivnosti MAO v homogenatih možganov

Za encimski preparat smo jemali homogenate možganov, pripravljene kot je opisano pri merjenju aktivnosti ChE v homogenatih, s razliko, da možganov nismo ispirali. Homogenate smo centrifugirali 10 minut pri 2000 obratih ter uporabljali supernatant. V poskusih in vivo smo injicirali inhibitor podkožno eno uro pred artrovanjem živali. Inkubacijska tekočina je bila 1/15 M fosfatni moderater pH 7,4; substrat Ty  $10^{-2}$  M; inhibitor IIR (koncentracije so končne in navedene pri rezultatih).

Izvedba poskusa. Polnitev posodic: encimski preparat 1,0 ml; kalijev cianid  $10^{-1}$  M in semikarbazid  $10^{-2}$  M po 0,2 ml; Ty 0,3 ml ter v srednji posodici filtrirni papir z 0,3 ml  $10^{-1}$  M kalijevega hidroksida in inkubacijske tekočine do 2,0 ml. Plinska faza: kisik, drugi podatki so kot pri merjenju aktivnosti ChE.

#### Uporabljene kemikalije

Acetilbetametilholinov jodid  
Acetilholinov jodid  
Atropinov sulfat



1:5-bis(alildimetilamoniumfenil)pentan-3-dibromid  
bis(diisopropilamino)fosfat  
Bitartrat dietilamida 2-brom-lisergične kisline  
Bitartrat dietilamida lisergične kisline  
Butirilholinov jodid  
5-hidroksitriptaminov kreatinin sulfat  
Iproniazid  
Tiraminov hidroklorid

### REZULTATI IN RAZPRAVLJANJE

Prvi poskusi so nam pokazali, da je metoda pogojnih refleksov primerna za preskušanje učinkov LSD. Vsaka snov, katere učinek preskušamo na pogojnih refleksih, lahko povzroči tri vrste odgovorov (Cook in Kelleher, 1961): 1. Po aplikaciji odgovarja žival tako na pogojni kot na brezpogojni dražljaj. Tak odgovor pričakujemo od kontrolnih podgan in pri neučinkovitih snoveh.

2. Žival ne odgovori na pogojni pač pa na brezpogojni dražljaj. To pomeni specifično inhibicije pogojnega refleksa in je izraz delovanja idealne psihozomimetične snovi. To je ugotovljeno na primer za klorpromazin, reserpin, 5-HT in morfin.

3. Žival ne odgovori niti na pogojni niti na brezpogojni dražljaj. To pomeni nespecifično inhibicije pogojnega refleksa in je posledica okvare lokomocije živali ali pa poskusne nevroze. Snovi, ki povzročajo take reakcije so: neprobamat, barbiturati in mefenazin.

V naših poskusih je LSD v malih dozah vplival na pogojne reflekse, v velikih dozah pa tudi na brezpo-

gojne reflekse; upoštevali smo rezultate, kjer so inhibirani samo pogojni refleksi.

### Učinki LSD na pogojne reflekse

Diagram 2 kaže tipičen učinek LSD na pogojne reflekse: z zniževanjem procenta pogojnih refleksov se obenem podaljšuje reakcijski čas. Uporabljena doza LSD (0,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) je najmanjša doza, s katero smo do-

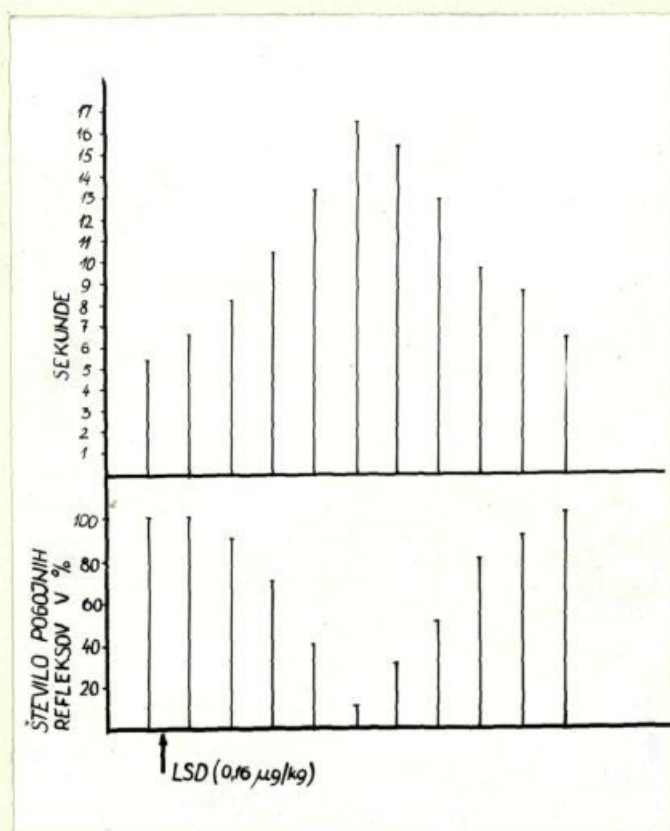


Diagram 2. Vsak stebriček v spodnjem delu diagrama kaže procent pogojnih refleksov na 10 draženj, v zgornjem pa ustrezne reakcijske čase. Med posameznimi stebrički je prestop 15 minut. Pri  $\uparrow$  je bil injiciran LSD.



segli tipične učinke LSD. Da bi preverili možnost, če lokalni dražljaj na mestu injiciranja ali sprememba volumna ne delujeta kot pogojni dražljaj, smo v kontrolnih poskusih injicirali enako dozo fiziološke raztopine. Diagram 3 kaže enega od primerov, da injiciranje fiziološke raztopine ni vplivalo na pogojne reflekse. Na istem diagramu je tudi videti, da smo vsak poskus s ponovnim injiciranjem izvedli šele po 7 dne-

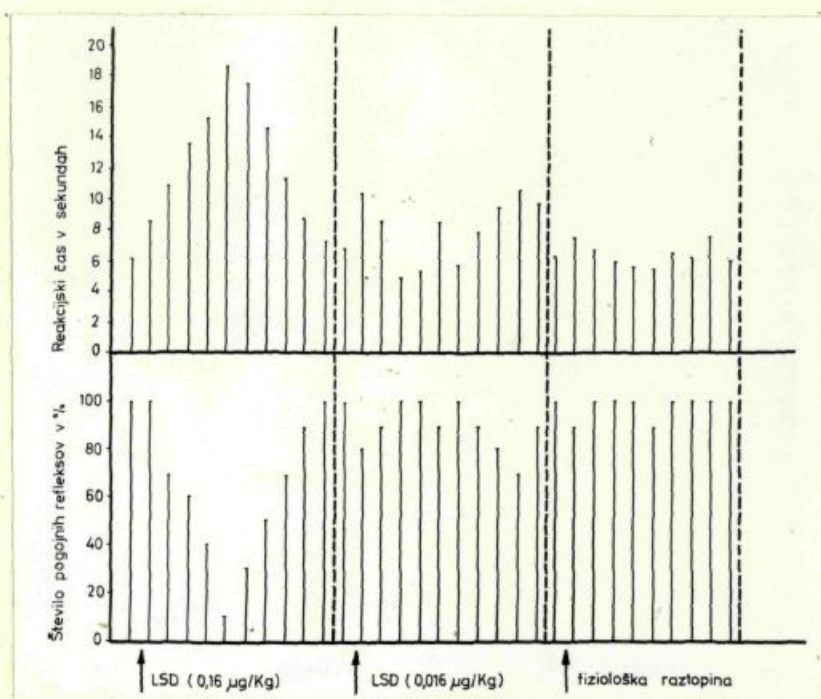


Diagram 3. Vsak stebriček v spodnjem delu diagrama kaže procent pogojskih refleksov na deset draženj, v zgornjem pa ustrezne reakcijske čase. Med posameznimi stebrički je presledek 15 minut, ----- je presledek 7 dni med poskusi, ↑ pomeni injiciranje ustrezne snovi.

vih. Odločili smo se za to iz dveh razlogov:

- zaradi tolerance za LSD in
- zaradi počasne inaktivacije inhibitorjev ChE in MAO v organizmu.

Toleranca za LSD. V začetnih poskusih smo injicirali LSD vsak dan in opazovali tahifilaksijo, ki se je pojavila še drugi dan in naraščala do četrtega dne, ko je bil učinek LSD še enak učinku fiziološke raztopine (Tabela 2).

Tabela 2. Reakcijski časi podgane, ki je vsak dan prejela LSD 1,6 mg/kg.

Dnevi	Čas po injiciranju v minutah	Povprečni reakcijski čas (n = 10)
1.	0	10
	15	13,5
	30	14,5
	45	20
2.	0	9
	15	10
	30	12
	45	14
3.	0	9,2
	15	10
	30	11,6
	45	12,8
4.	0	8,4
	15	9
	30	9,6
	45	9,4
Kontrola	0	8,8
	15	9
	30	9
	45	9



Tolerance za LSD se opazili so prvi eksperimentatorji z bioleskimi testi pri podgani. Tako poročajo Freedman, Aghajanian in Ornitz (1958) pri plezalnem testu po Winterju in Flatakerju o toleranci, ki se razvije med prvim in četrtem poskusnim dnom. Zanimivo je, da velja tolerance tudi za vegetativne snake, ki se pojavijo po LSD pri podgani (pilocercija, pireksija, midriaza). Če se namesto vsak dan injicirali LSD vsak drugi dan, se je pojavila tolerance le pri polovici sivali, če pa se injicirali vsak tretji dan, pa tolerance ni bilo več. Tolerance za LSD pri kuncu opisujeta Gogerty in Dille (1956), ki sta z vsakodnevnim injiciranjem LSD dosegla tolerance za hiperpiretične učinke LSD; tolerance se je začela drugi dan, dosegla visok četrty dan in trajala se devet dni po zadnji injekciji LSD. Nikdar pa niso uspeli najti tolerance za bradikardijo in sestoje dihanja, ki nastopita po velikih dozah LSD (Rothlin, 1957); ta dva učinka verjetno izvirata iz centrov kaudalnega dela možganskega debla. Menijo, da se razvije tolerance predvsem za mehanizme, ki leže bolj oralno v možganskem deblu; sem spadajo vegetativni pojavi, učinki na obnasanje in EEG vzdrahljenja (Sharpless in Jasper, 1956).

Inaktivacija inhibitorjev. Znano je, da se aktivnost inhibirane ChS le počasi vrača (Thompson, 1952; Heath, 1961; Clouet in Waelsch, 1961). Davison (1955) je raziskaval ponovno aktivnost ChS v možganih podgane po injiciranju raznih inhibitorjev in našel za večino inhibitorjev čase od 4 - 7 dni. Isti avtor je ugotovil, da je tudi MAO v homogenatih tkiv se vedno inhibirana 5 dni po injiciranju inhibitorja (Davison, 1958).

V naših poskusih so bile posamezne podgane različno občutljive za LSD, samice bolj kot samci. Doza 0,16 µg/kg z diagramov 2 in 3 je primer za izjemno veliko občutljivost za LSD, večine poskusov pa smo delali z LSD v dozah 1,6 in 3,2 mg/kg, torej za 4 potence razlike. Diagram 4 kaže poskus, ko smo isti živali injicirali LSD v starih različnih dozah ter ustrezne vplive na procent pogojnih refleksov in reakcijski čas; diagram 5 pa je primer, kako dve živali različno reagirata na isto dozo LSD.

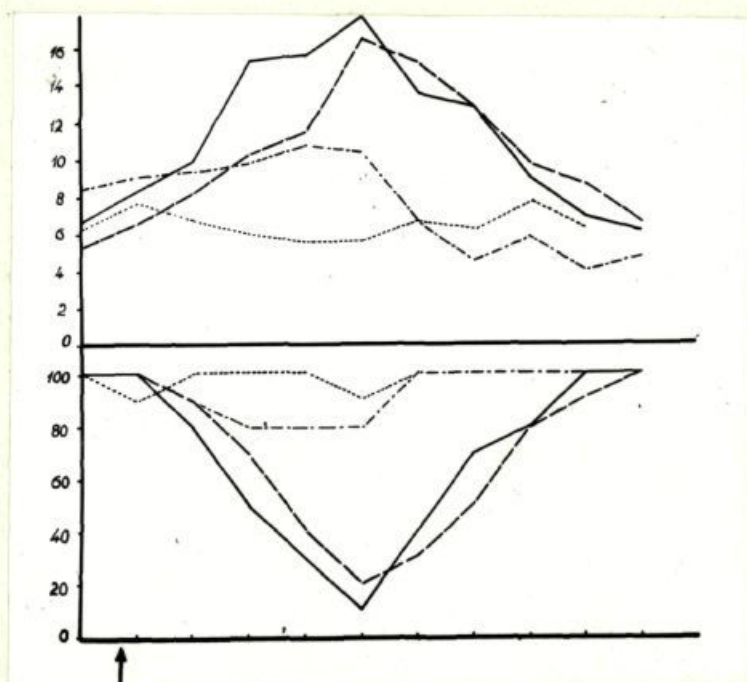


Diagram 4. Vpliv starih doz LSD na pogojne reflekse pri isti živali (— = 3,2 mg/kg; - - - - - = 1,6 mg/kg; - . - . - = 0,16 mg/kg; ..... = 0,016 mg/kg). Legenda kot pri diagramu 2.



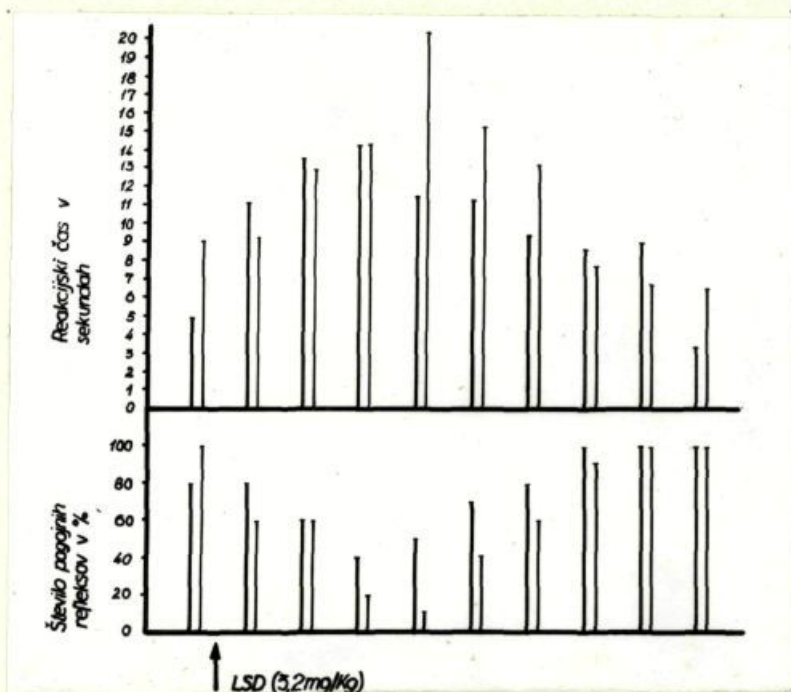


Diagram 5. Vpliv iste doze LSD na dve živali. Legenda kot pri diagramu 2.

Doze LSD, ki smo jih uporabljali in ki so bile učinkovite za pogojne reflekse, so skoraj enake dozam, ki so jih uporabljali drugi avtorji pri testiranju LSD z različnimi metodami pogojnih refleksov. Tako je v poskusu Pfeifferja in Jenneya (1957) LSD v dozi 1 - 2 mg/kg zavrl pogojni umik (skok na palico). Cook in Weidley (1957) sta opazovala blokado pogojnega umika z LSD v dozi 1,5 mg/kg, pri višjih dozah (5 mg/kg) je bil prizadet tudi brezpogojni refleks, čeprav je bila žival še sposobna, da skoči na palico. Winter in Flataker (1956) sta študirala antagonizem med LSD in 5-hidroksitriptofanom na podgani s tehniko plezanja po vrvi; intraperitonealno injiciran LSD (0,5 - 1,0 mg/kg) je podaljšal čas plezanja. S podobno tehniko

so tudi Mahler, Humoller in Dunn (1958) opazili, da po injekciji LSD 0,3 - 0,5 mg/kg i.p. podgana počasneje pleza po vrvi; LSD je učinkoval manj kot 30 minut. Plezalni test so uporabili tudi Freedman, Aghajanian in Ornitz (1958) pri preučevanju tolerance na LSD (0,13 mg/kg i.p.).

Da lahko LSD tudi skrajša reakcijski čas, so opisali Taeschler, Weidmann in Cerletti (1960). Pri testu skakanja na palico so z LSD v dozah 0,05 do 0,2 mg/kg s.c. dosegli skrajšanje reakcijskega časa, večje doze (1 - 2 mg/kg) pa so podaljšale reakcijski čas. Skrajšanje reakcijskega časa tolmačijo kot rezultat senzibilizacije centralnih živčnih struktur na aferentne impulze. V naših poskusih nismo nikdar opazili skrajšanja reakcijskega časa pod vplivom LSD. V nekaterih eksperimentih smo izmerili reakcijski čas, ki je bil krajši od normalnega, vendar v dobi, ko je delovanje LSD na pogojne reflekse že prenehalo (Diagram 6). Podobno skrajšanje smo včasih videli tudi pri drugih inhibitorjih npr. DPDA (Diagram 14). Vendar so bili ti pojavi zelo redki, zato jih v tem delu nismo posebej obdelali.

#### Mehanizem delovanja LSD

Postavlja se vprašanje, kako LSD ali njegova aktivna oblika v organizmu povzroči spremembe v pogojnih refleksi. Rothlin s sodelavci (1956) je analiziral simptome po LSD v živalskem poskusu in našel obsežno draženje simpatičnih struktur v centralnem živčevju. Ugotovitev Weidmanna in Cerlettija (1957), da so prizadete tudi motorične funkcije, kar se vidi iz facilitacije spinalnih refleksov tako pri človeku kot pri živali, je najbrž prej v skladu z opazovanjem Rothlina



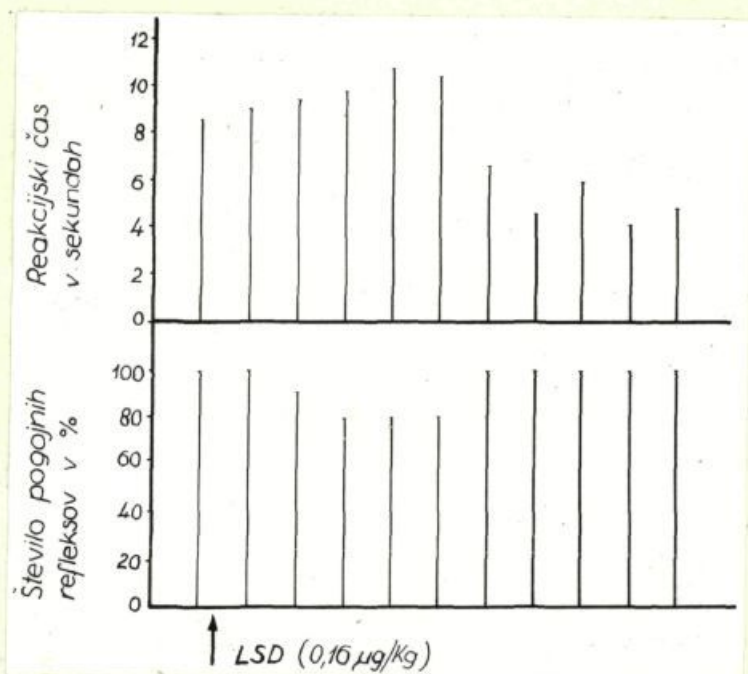


Diagram 6. Skrajšanje reakcijskega časa potem, ko mine delovanje LSD na število pogojnih refleksov. Legenda kot pri diagramu 2.

s sodelavci kot v nasprotju z njim.

Če skušamo v istem zaporedju kot teče pogojna reakcija analizirati učinek LSD na pogojne reflekse, pride najprej v poštev pogojni dražljaj. Znano je, da mnoge snovi učinkujejo na obnašanje predvsem s redukcijo senzoričnih aferentnih vtisov, to se pravi z neko izolacijo organizma od senzoričnih dražljajev iz okolice (Steinberg, Legge in Summerfield, 1961). Če velja to za klorpromazin, ne velja za LSD: našli so namreč (Key, 1961), da se je že po izredno majhnih dozah LSD (15 - 20 µg/kg) pri mački znižal prag akustične stimulacije za EEG vzdramljenja; dražljaji,

ki prej niso povzročili vzdrاملjenja, pa so sprožili izrazit odgovor po LSD.

V naših poskusih smo kot pogojni dražljaj uporabljali svetlobo. Možno je, da LSD spremeni recepcijo dražljaja v retini ali pa prevajanje impulza do kortikalnega analizatorja oziroma retikularne formacije ali pa procese v korteksu samem. Ker je ena od glavnih psihozomimetskih značilnosti LSD pri človeku ta, da povzroča optične halucinacije, je bilo na tem polju storjeno že precej poskusov. Tako so Krill, Wieland in Ostfeld (1960) merili učinek LSD na retino pri človeku. Ugotovili so, da 75 µg LSD signifikantno spremeni ERG, niso pa našli sprememb v barvnem gledanju. Njihovi podatki nakazujejo, da so halucinacije po LSD v zvezi z učinkom LSD na funkcijo retine. Kliniki so že davno predanjimi trdili, da lahko optične halucinacije nastajajo kjerkoli v vidni poti, to je od retine do korteksa oziroma retikularne formacije (Weinberger in Grantt, 1940) in da še tako natančen opis halucinacije ne pove nič o mestu okvare v optični poti. Razni avtorji so študirali učinke LSD na različnih odsekih optične poti. Purpura (1956) je na neanesteziranih mačkah našel, da majhne doze LSD facilitirajo kortikalne odgovore na svetlobno draženje, velike doze LSD pa kortikalne odgovore inhibirajo. Našel je nadalje, da LSD facilitira tudi optične kortikalne odgovore na draženje lateralnega genikularnega telesca.

Evarts in sodelavci (1955) so študirali učinke LSD na sinaptični prenos vzburjenja pri mački. Našli so izrazito znižanje amplitude postsinaptičnega odgovora v lateralnem genikularnem telescu po draženju optičnega živca; živali so se obnašale kot slepe. Na



drugi strani pa so bile druge sinapse, npr. v retini, rezistentne na učinke LSD. Zanimivo je, da so kurarizirane živali bile manj občutljive na vpliv LSD v genikularnem prenosu vzburjenja kot živali, ki so dobile barbiturate. Isti delavci pa so našli tudi, da velike doze LSD (2,5 mg/kg) znižujejo akcijski potencial optičnega živca na svetlobno draženje retine.

Učinke LSD na ERG sta merila Apter in Pfeiffer (1957) in pri mačkah po 0,1 mg/kg našla, da se se spontani potenciali retine pojavili po 10 minutah. Z druge strani pa Jacobson in Gestrin (1959) z enako dozo LSD nista mogla ugotoviti sprememb v ERG. Blough (1957) je pri golobih opazil velik dvig vidnega praga po LSD, Carlson (1958) pa manjšega tudi pri človeku.

Po temeljitem študiju učinkov LSD na retino pri človeku je Ostfeld (1961) zaključil:

1. da LSD v halucinogenih dozah dviguje prag vzdražnosti palčk v retini in istočasno imajo poskusne osebe halucinacije;

2. nehalucinogene doze LSD ne povzročijo sprememb v funkciji retine;

3. avtor meni, da spremembe v retini po LSD niso vzročno povezane s halucinacijami. Pri 17 slepih, ki so imeli do petega leta normalni vid in so v sanjah "gledali", je LSD povzročil optične halucinacije, ki pa so podobne onim, ki sta jih sprožila Fenfield in Rasmussen (1950) pri draženju vidne skorje normalnih oseb. Z druge strani pa so se obilneje kot pri zdravih osebah pojavile akustične, taktilne in gustatorne halucinacije. Iz gornjih poskusov trdi Ostfeld, da retina ni sine qua non za halucinogenost LSD in da so spremembe v retini lahko, ne pa nujno zvezane z optičnimi halucinacijami.



Rovetta (1956) pa je s svojimi poskusi zanikal vlogo optične skorje kot sine qua non: niti topična niti intravenska aplikacija LSD ni spremenila pri mačkah kortikalnega odgovora na optično stimulacijo. So pa avtorji, ki pripisujejo možganski skorji precejšen pomen pri lokalizaciji delovanja LSD. Elektrofiziološke raziskave so pokazale, da LSD lahko direktno vpliva na derebralno skorjo. Pri človeku in mački so opazili inhibitorni učinek na potenciale v korteksu (Ursin, 1962). Purpura razlaga to z inhibitornim delovanjem na kortikalno dendritično aktivnost. Apter in Pfeiffer (1957) poročata, da se spontana aktivnost vidnega sistema po LSD začenja že v retini in se facilitira v vsaki sinapsi z maksimalno aktivnostjo v korteksu.

Od leta 1950 pa je znana, čeprav anatomske nepopolnoma definirana, še druga optična pot, to so kolaterale od klasične optične poti v retikularno formacijo. Tedaj je Lashley pisal: "Prevod impulzov gre od retine do lateralnega genikularnega telesca, nato do striatnih področij in od tod dol do nekih subkortikalnih struktur." Poti od klasične vidne navzdol so slabo raziskane. Brodal (1958) poroča o tekto-retikularnih optičnih vlaknih, ki vstopajo v retikularno formacijo v nivoju gigantocelularnega ter oralnega in kaudalnega pontinega jedra. Zveze med retikularno formacijo in lateralnim genikularnim telescem ter optično skorjo pa sta dokazala Suzuki in Taira (1961); na električni sunek v retikularni formaciji kot pogojni dražljaj sta registrirala električne spremembe v lateralnem genikularnem telescu in optični skorji.

Purpura (1957) je ugotovil inhibicijo aksodendri-



tične sinaptične aktivnosti z LSD in facilitacijo aksosomatske aktivnosti in postavil že prvo hipotezo o lokalizaciji delovanja LSD glede na živčno celico. Ugotovil je, da se dendriti vzdražijo le preko sinaps in ne z direktnim električnim draženjem ali antidromno od celičnega telesa. To govori za delovanje LSD v nivoju sinapse in Purpura meni, da LSD aktivira v retikularni formaciji možganskega debla inhibitorne sinapse dendritov. Te so aksodendritičnega tipa, vse druge v specifičnem optičnem sistemu pa aksosomatskega.

Bradley in Elkes (1958) sta z elektrofiziološko tehniko ugotovila, da LSD povzroči vzdramljenje in postavila domnevo, da deluje v višini retikularne formacije možganskega debla. Učinki LSD se močno odvisni od obnašanja živali med merjenjem, receptorji za LSD pa naj bi ležali v medialnih kolateralah velikih aferentnih senzibilnih poti. Zanimivo je, da povzročijo vzdramljenje tudi inhibitorji ChE npr. fizostigmin, DFP, TEPP, mintacol idr. (Holtz, Valzer in Westermann, 1958). Ta opazovanja podpirajo domnevo o holinergičnem prevodu vzburjenja v ascendirajočem delu retikularne formacije (Himmwich in Rinaldi, 1957).

Iz gornjih podatkov ne moremo zaključiti, da bi že motnje v percepciji svetlobe po LSD kot pogojni dražljaj primerno okvarile pogojne reflekse, edini skupni imenovalec je, da LSD vpliva in spreminja aferentne impulze. Odkritje Purpure, da moramo učinke LSD lokalizirati na centralne sinapse, odpira nove možnosti za preučevanje mehanizma, namreč vpliv na holinergični in adrenergični sistem. Anatomske lokalizacije delovanja LSD ne iščejo več toliko v skorji, pomaknila se je navzdol v retikularno formacijo možganskega debla. Najbrž ni slučaj, da velja isto za pogoj-



ne reflekse: Gastaut (1947), Magoun (1962) in drugi pomembni delavci s tega področja menijo, da se funkcionalna zveza med pogojnimi in brezpogojnimi dražljajem vzpostavi ravno nekje v retikularni formaciji.

Zato smo, po raziskavi učinka LSD na pogojne reflekse razširili poskuse na holinergični in adrenergični sistem s posebnim ozirom na retikularno formacijo.

### Vzgoja pogojnih refleksov in aktivnost holinesteraz

Z rastjo mlade podgane narašča tudi aktivnost ChE v možganih in doseže maksimum med 50 - 100 dnevi starosti, nato ostane na istem nivoju še okoli 100 dni (Bennett, Rosensweig in Krech, 1958 a). Naše živali, ki smo jih uporabljali, so bile stare od 50 do kakšnih 120 dni, bile so torej v dobi, ko je aktivnost ChE vsaj pri večini že ustaljena. Starost živali je taka kot pri poskusih Böttiga in Grandjeana (1959), ki sta ugotovila, da se najbolje priuče pogojnemu umiku živali, ki so stare tri mesece, mlajše pa ne. Obširne raziskave o tem, če trening vpliva na aktivnost ChE v možganih podgan, so napravili Bennett, Krech in Rosensweig (1958 a in b, 1959, 1960 a in b, 1962). Med drugimi so primerjali živali istega gnezda, ki so jih 80 dni trenirali s posebno tehniko, z živalmi, ki so bile 80 dni izolirane. Trenirane živali so imele za 2,5 % večjo aktivnost ChE tako v možganski skorji kot v drugih delih možganov. Ker se je njihova skorja za 5,8 % povečala od skorje netreniranih živali, je bila aktivnost ChE v skorji na utežno enoto znižana, povsod drugje v možganih pa povečana (Bennett, Krech in Rosensweig, 1962). Kasneje so ugotovili, da gre zmanjšanje



aktivnosti ChE predvsem na račun zmanjšanja aktivnosti AChE in da aktivnost BChE v skorji močno poraste (Bennett, Krech in Rosenzweig, 1963). Avtorji nimajo razlage za te spremembe. Razjasnitev je skušal podati Smith (1962), ki je poleg zvišane aktivnosti možganske ChE po treningu ugotovil tudi porast RNA in meni, da je porast encimske aktivnosti osnova za sponin. Aktivnost ChE v možganski skorji pri pogojnih in brezpogojnih refleksih pa sta merila Sklyarov in Kononenko (1961) in tudi onadva sta našla v obeh primerih signifikanten padec aktivnosti. Mi smo v tej zvezi napravili samo orientacijski poskus in smo primerjali aktivnost AChE, BChE in celotne ChE v možganih netrenirane podgane in podgane iz istega legla, ki je imela privzgojene pogojne reflekse. Pri obeh živalih smo našli skoraj enako aktivnost encimov (Tabela 3). Nismo poskušali, da bi z

Tabela 3. Aktivnost AChE, BChE in celotne ChE v homogenatih možganov trenirane in netrenirane podgane iz istega legla izražena v  $\mu\text{l CO}_2/\text{g}$  svežega tkiva/hr.

Substrat (mM)	Trenirana podgana	Netrenirana podgana
MCh 3,0	3927	4207
BaCh 10,0	1311	1402
ACh 3,0	11679	11654

množenjem podgan, ki se hitro in dobro učijo, vzgojili ravno tak rod, čeprav kaže, da to gre (Roderick, 1960).

### Vpliv LSD na aktivnost holinesteraz

Prvi so sistematično obdelali vpliv LSD na možganske ChE Thompson, Tickner in Webster (1955). Našli so, da LSD že v nizkih koncentracijah (ca.  $10^{-5}$  M) za 60 - 70 % inhibira aktivnost BChE človeških možganov in vitro, ne pa AChE in da je inhibicija BChE v človeških možganih mnogo večja kot pri poskusnih živalih; pri podgani pa je še prav posebno majhna. Leta 1959 pa so objavili Zsigmond in sodelavci, da LSD inhibira tudi AChE človeških možganov in vitro, vendar šele v večji koncentraciji ( $I_{50} = 10^{-4,2}$  M).

Naši poskusi so pokazali, da LSD inhibira poleg BChE tudi AChE podganjih možganov. Na diagramu 7 je

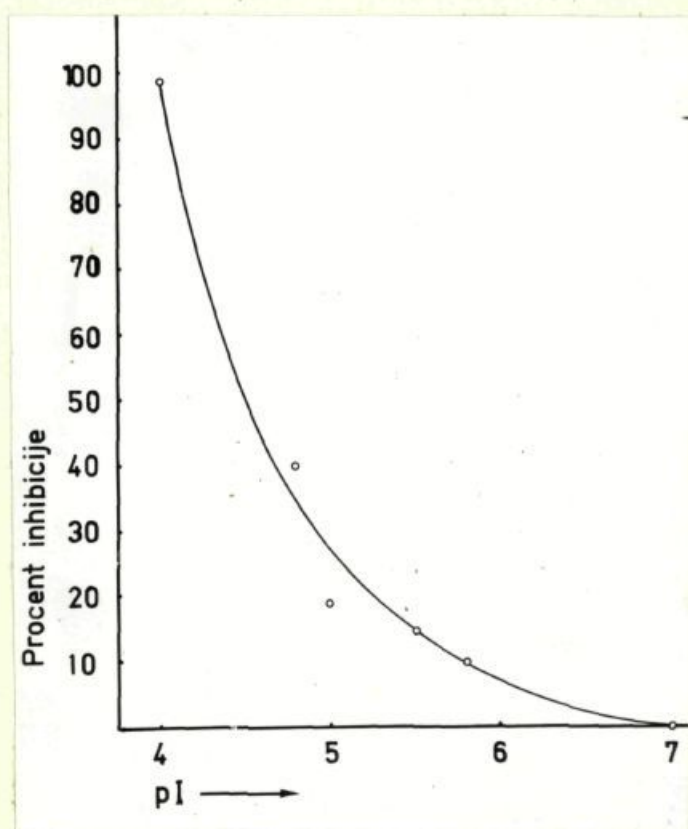


Diagram 7. Inhibicija BChE podganjih možganov z LSD in vitro.



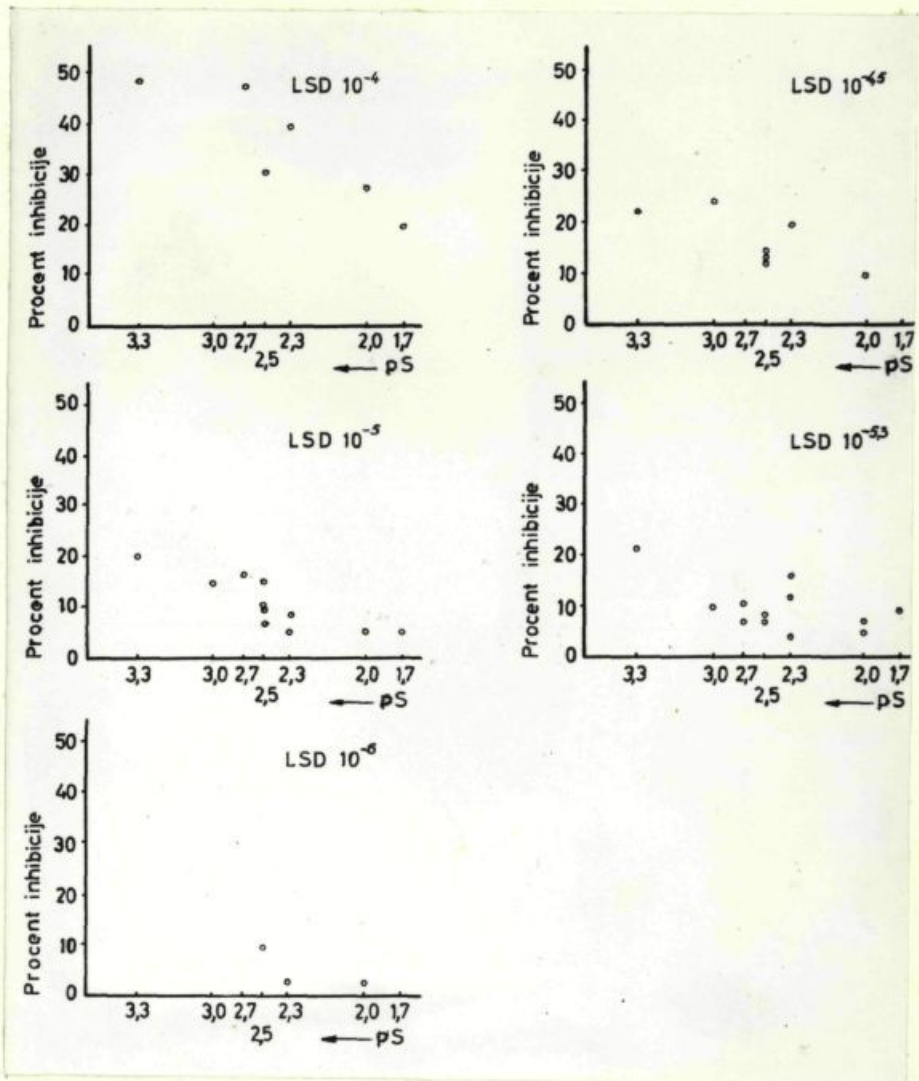


Diagram 8. Inhibicija AChE podganjih možganov z LSD in vitro. Substrat ACh, homogenatu je dodan DPDA  $10^{-4}$  M.

prikazana inhibicija BChE podganjih možganov z LSD in vitro. Procenti inhibicije so precej višji od onih, ki so jih objavili Thompson, Tickner in Webster (1955). Z LSD v koncentracijah  $2 \times 10^{-5}$  M do  $5 \times 10^{-6}$  M so dobili le 3 - 9 % inhibicije, iz česar so zaključili,

da LSD skoraj ne inhibira BChE podganjih možganov. Za razlike od gornjih avtorjev smo našli tudi inhibicijo AChE z LSD in vitro (Diagrama 8 in 9). Homogenatu dodani DPDA  $10^{-4}$  M skoraj popolnoma inhibira aktivnost BChE, tako da moremo hidrolizo ACh jemati kot izraz aktivnosti AChE (Bayliss in Tedrick, 1956).

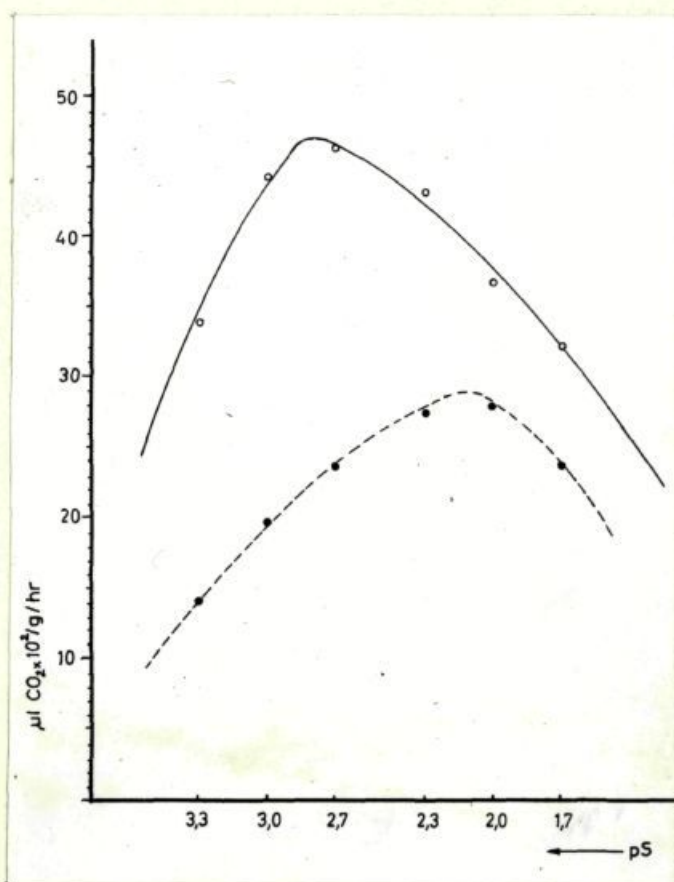


Diagram 9. Aktivnost AChE podganjih možganov in vitro. Substrat ACh, homogenatu je dodan DPDA  $10^{-4}$  M, ————— = homogenat brez LSD, - - - - - = homogenat z LSD  $10^{-4}$  M.



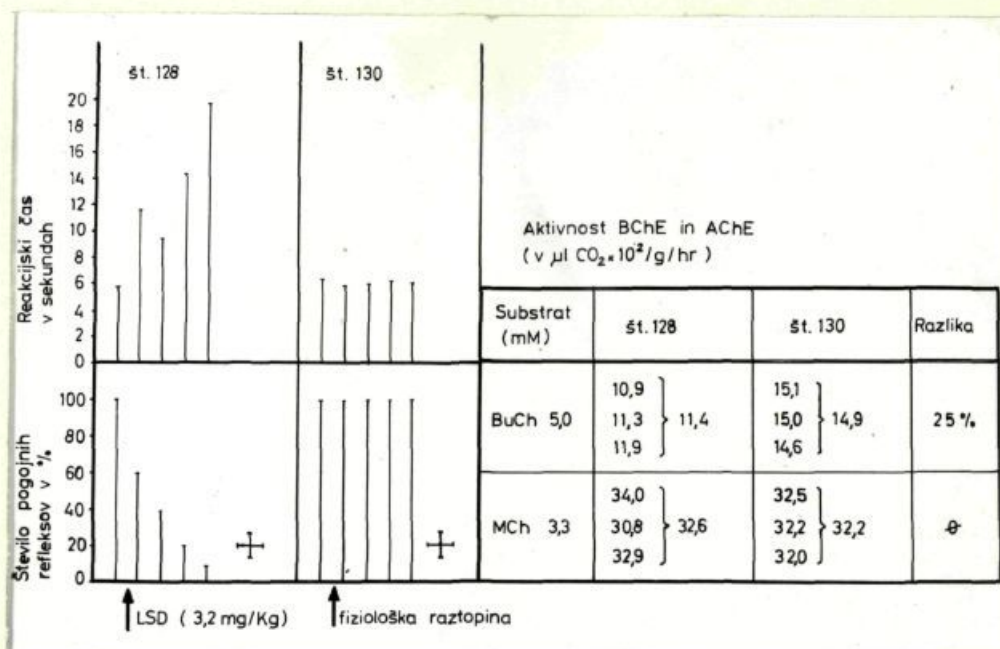


Diagram 10. Podgana št. 128 je dobila injekcije LSD, št. 130 pa fiziološke raztopine. Ob + sta bili žrtvovani. Prikazana je aktivnost BChE in AChE v njihovih možganih.

Če hočemo zvedeti, ali je z zavorom pogojnih refleksov z LSD v zvezi inhibicija ChE, moramo ugotoviti inhibicijo ChE in vivo. Diagram 10 je primer za aktivnost ChE v možganih podgane, ki smo jo žrtvovali v trenutku, ko so bili pogojni refleksi maksimalno zavrti z LSD in izmerili aktivnost ChE v takšnih možganih. Aktivnost ChE smo primerjali z aktivnostjo ChE možganov podgane iz istega legla, iste teže in spola, ki smo ji injicirali fiziološko raztopino in žrtvovali v istem intervalu po injekciji kot ono z LSD. Rezultati povedo, da je bila ob optimalnih koncentracijah substratov

inhibirana le BChE in to približno za 25 %. Da bi to utrdili, smo napravili več poskusov in injicirali LSD kot v gornjem poskusu (3,2 mg/kg) ter merili inhibicijo 'in vivo'. Rezultate kaže tabela 4. Iz njih posnemamo, da je v možganih najbolj inhibirana BChE. Kako variira inhibicija BChE 'in vivo' s koncentracijo substrata, pa kaže diagram 11.

Tabela 4. Inhibicija AChE, BChE in celotne ChE podganjih možganov z LSD (3,2 mg/kg) 'in vivo'.

Substrat (mM)	Procent inhibicije v primerjavi s kontrolo. V oklepaju je število poskusov.	
MCh	5,0	2 (6)
	3,0	0 (6)
	2,0	3 (6)
BaCh	10,0	28 (6)
	5,0	20 (2)
	5,3	16 (2)
ACh	10,0	15 (2)
	3,0	14 (2)
	1,0	5 (2)

Lokalizacija delovanja LSD  
v centralnem živčevju

Iz gornjih rezultatov vidimo, da je pri zavoru pogojnih refleksov z LSD inhibirana BChE in po lokalizaciji BChE v možganih bi lahko domnevali, kje deluje LSD. Ord in Thompson sta leta 1952 opisala, da je BChE lokalizirana predvsem v možganski beli, AChE



pa v sivi. Z avtoradiografske tehnike so Arnold, Hoffmann in Leupold-Löwenthal (1958) pri miški ugotovili, da se injicirani LSD s  $C^{14}$  razširi precej enakomerno po vseh možganih in da bi le težko govorili o mestih, kjer bi se LSD posebno koncentriral: celice v amonovem rogu, bazalni gangliji, periventrikularna siv in prav nazadnje celice korteksa. Na splošno je bila aktivnost

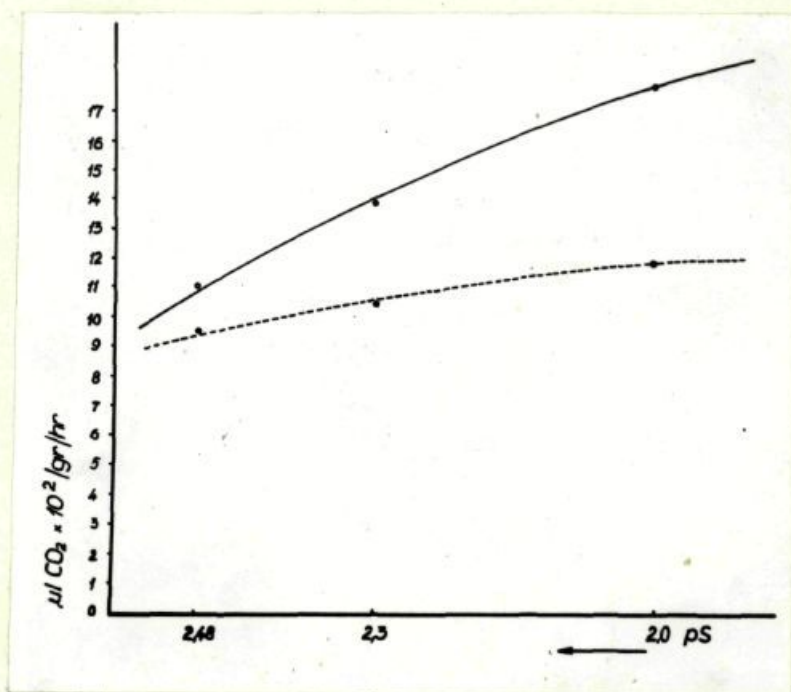


Diagram 11. Inhibicija EChE podganjih možganov 'in vivo' z LSD 3,2 mg/kg. ————— = homogenat brez inhibitorja, - - - - - = homogenat z LSD.

večja v živčnih celicah kot v beli. Na posamezni celici je bila videti mrežasta struktura, ki jo imajo avtorji za končiče dendritov tujih ganglijskih celic - torej

aksodendritični tip sinapse po Purpuri (1957). Goldberger (1961) je pri podgani le delno potrdil opazovanja avstrijskih avtorjev, ko je s histokemično metodo našel enakomerno in slabotno inhibicijo ChE z LSD v nekortikalnih predelih možganov, v korteksu pa je za razliko od Arnolda in sodelavcev našel zelo veliko inhibicijo z LSD; ta avtor je tudi razločeval med BChE in AChE. V skorji je bila močno inhibirana AChE, BChE pa ne. Inhibicijo AChE povezuje avtor s psihičnimi učinki LSD.

Prav verjetno je, da deluje LSD, podobno kot narkotiki in trankvilizanti, primarno samo v nekaterih lokaliziranih regijah in tako spreminja aktivnost ostalih možganov; to bi bilo v soglasju z izvidi, ki kažejo, da druge snovi, npr. narkotik aminobarbiton, primarno delujejo v nivoju retikularnega ascendentnega sistema in da trankvilizanti delujejo predvsem via aferentne koraterale (Richter, 1961). Kaže, da je primarno delovanje raznih psihozomimetskih snovi na sinapse v lokaliziranih regijah možganov. Richter (1960) pripisuje vpliv LSD v sinapsah vplivu LSD na metabolizem celice. Res so elektrofiziologi našli razlike v občutljivosti različnih sinaps za LSD. Že prej omenjeni poskusi Evarisa in sodelavcev so pomembni tudi glede na funkcijo sinaps. Tako je LSD 30 µg/kg i. karotid. povzročil pri mački za 80 % znižanje amplitude genikularnega postsinaptičnega odgovora na draženje optičnega živca. Živali pa so hitro reagirale na akustične dražljaje. Pri isti dozi LSD sinapse v retini in optični skorji niso bile prizadete. Inhibicija v lateralnem genikularnem telescu se je pojavila v 5 - 10 sekundah po i. karotid. injiciranju LSD in izginila po eni uri,



kar je zanimivo v zvezi z brzino eliminacije LSD iz centralnega živčevja. Da so dosegli isti učinek na prenos vzburjenja v lateralnem genikularnem telescu po intravenski injekciji LSD, so morali injicirati petkrat večjo dozo LSD. Marazzi in Hart (1955) sta preučevala vpliv LSD na kortikalni EEG po draženju ustreznega področja nasprotne hemisfere pri mački. Našla sta, da že 8 µg/kg LSD i. karotid. zniža amplitudo postsinaptičnega transkaloznega odgovora.

Danes veljajo sinapse v transkaloznem področju za najbolj občutljive na LSD, sinapse v lateralnem genikularnem telescu za manj občutljive, one v retini in v vidnem korteksu pa za izredno odporne proti inhibiciji z LSD. V poskusih na živali je bil LSD učinkovit v dozah, ki so blizu tistim, katere so uporabljali v eksperimentih pri človeku. LSD v halucinogeni dozi le malo spremeni EEG človeka in še to predvsem na račun povečanja frekvence ritma alfa (Wikler, 1957). Vendar reagirajo tako le zdrave osebe, EEG psihotikov niso spremenjeni.

Učinek LSD na transkalozne sinapse, ki sta ga opazovala Marazzi in Hart, je bil dosežen z zelo majhno dozo LSD. Je zato možno, da so motnje v kortikalnih sinapsah odgovorne za učinke LSD? Najbrž ne, ker pri popolnoma zavrtem prenosu vzburjenja ni bilo posebnih psihičnih učinkov in ker pri popolni sekciji grede pri človeku ne nastopijo psihične spremembe. Na drugi strani lahko optične halucinacije pri človeku nastanejo tako pri lokalnem obolenju očesa (Colman, 1894) kot pri spremembah v funkciji korteksa (Lippman, 1962).

## Vpliv DPDA na pogojne reflekse in na aktivnost BChE

Ker LSD močno inhibira tako BChE v možganih podgane kot pogojne reflekse, smo skušali raziskati pomen BChE pri pogojnih refleksih. Zato smo izbrali selektivni inhibitor za BChE - DPDA in selektivni inhibitor za AChE - BW284C51. Najprej nas je zanimalo, če zavor BChE same vpliva na število pogojnih refleksov in reakcijski čas. Treniranim podganam smo injicirali DPDA v dozah 3,4 ug - 3,42 mg/kg telesne teže (kar bi ustrezalo koncentracijam od  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M v primeru, da se injicirana snov enakomerno porazdeli v celem telesu). V nobenem primeru nismo opazili zavora pogojnih refleksov (Diagram 12).

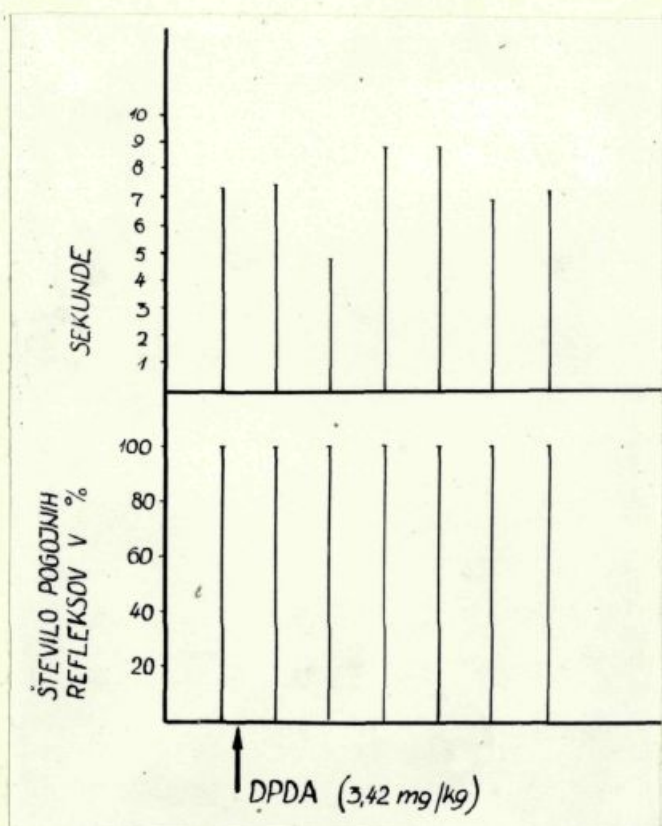


Diagram 12. Vpliv DPDA na pogojne reflekse. Legenda kot pri diagramu 2.



Da bi videli, kako je s približnim zavorom BChE v celotnih možganih takih živali, smo pri podgani, ki je prejela najmočnejšo dozo inhibitorja, izmerili aktivnost BChE in kljub razredčenju homogenata ugotovili še zmeraj okoli 45 % zavora pri koncentraciji substrata 10 mM (Diagram 13).

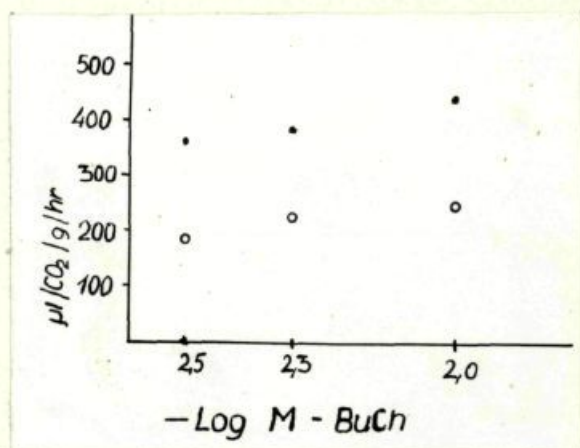


Diagram 13. Aktivnost BChE v možganih podgane. Abscisa: koncentracije BuCh v negativnih logaritmih. Ordinata: CO<sub>2</sub> v µl/g tkiva/hr.  
○ = injiciran DPDA (3,42 mg/kg); • = injicirana fiziološka rastopina.

V nekaterih poskusih smo opazovali pojav, ki smo ga že opisali pri učinkih LSD (Diagram 6), to je skrajšanje reakcijskih časov (Diagram 14).

Sedaj smo lahko prešli na glavni del naloge, to je preučevanje vpliva BChE na učinke LSD. Našli smo, da DPDA v vseh preskušanih dozah (od 3,4 µg - 3,42 mg/kg) blokira vsak učinek tudi najmočnejših doz LSD (npr. 3,2 mg/kg) na pogojne reflekse.

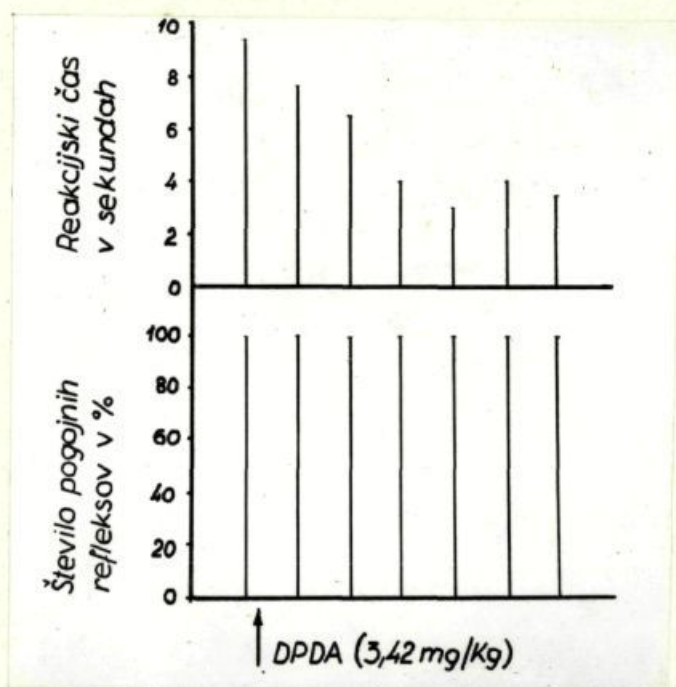


Diagram 14. Skrajšanje reakcijskega časa po DPDA.  
Legenda kot pri diagramu 2.

Na diagramu 15 vidimo primer učinkovitega zavora delovanja LSD z najmanjšo uporabljeno dozo DPDA.

Pogled v aktivnost možganske BChE pri teh poskusih smo dobili takole: podgano, ki je prejela visoko dozo DPDA (3,42 mg/kg) in čez 30 minut visoko dozo LSD (3,2 mg/kg), smo čez 30 minut žrtvovali. Izmerili smo aktivnost BChE možganov in našli le 40 % aktivnosti primerjano s kontrolo, ob 10 mM BuCh kot substratu; se pravi: čeprav je BChE že delno zavrta s DPDA in še dodatno z LSD, odvijanje pogojnih refleksov ni moteno.

Če smo injicirali istočasno obe snovi v različnih dozah, smo dobili te rezultate: DPDA (3,42 mg/kg) omili vpliv na pogojne reflekse istočasno injiciranega



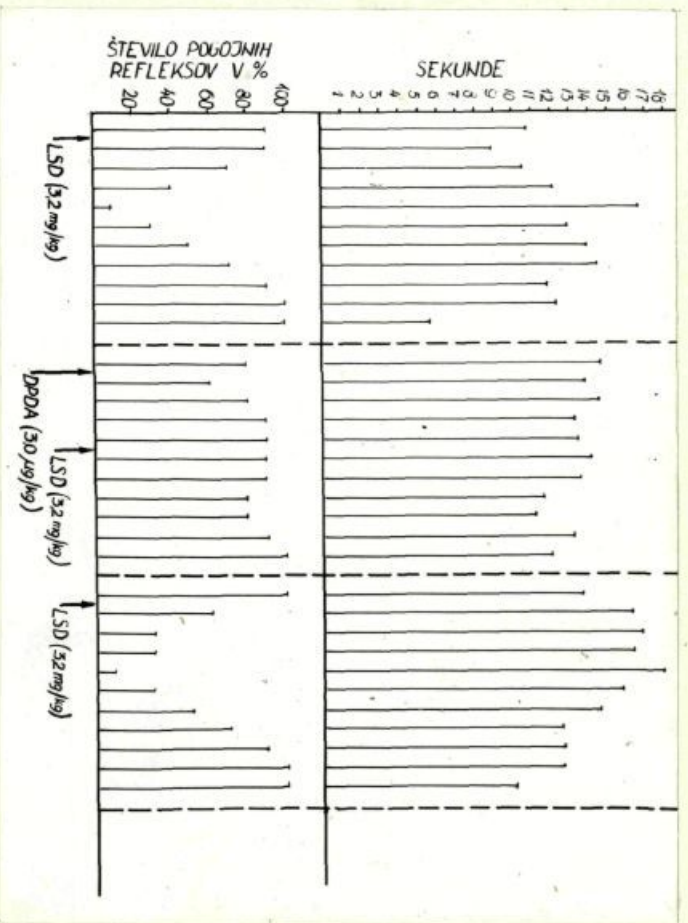


Diagram 15. Zavor delovanja LSD po predhodno injiciranem DPDA. Legenda kot pri diagramu 3.

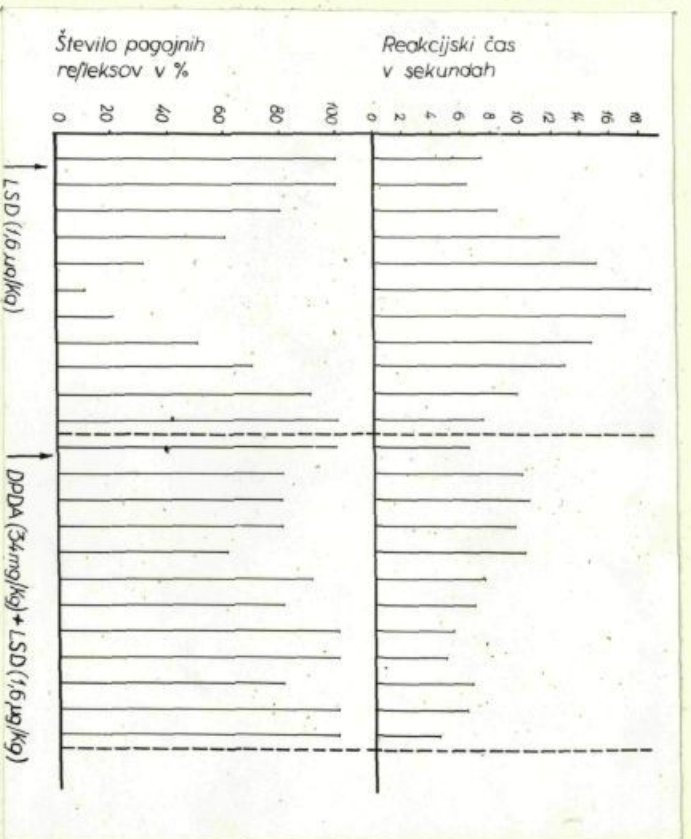


Diagram 16. Učinek istočasno injiciranega DPDA in LSD v primerjavi z učinkov LSD samega. Legenda kot pri diagramu 3.

LSD v dozah 1,6 mg in 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , prepreči pa učinkovanje LSD v dozi 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Diagram 16).

### Pomen BChE v centralnem živčevju

Fiziološki pomen BChE je do nedavnega bil še zelo nejasen, medtem ko AChE pripisujejo važen pomen pri prenosu vzburjenja v sinapsi. Razmerje med aktivnostjo AChE in BChE je v večini sesalskih tkiv v korist AChE, največje pa je v možganih in živčnem tkivu sploh. Na splošno so imeli BChE za pastorko v primeri z AChE in jo zaradi nepoznavanja funkcije malo upoštevali.

BChE najbrž ne sodeluje v pomembni meri pri hidrolizi ACh, kajti popolna inhibicija BChE povzroči le malo učinkov, ki bi jih mogli pripisovati nakopičenemu ACh (Hawkins in Gunter, 1946). Ker se v možganih BChE nahaja predvsem v neživčnih celicah, naj bi tudi ne imela važnega pomena v prenosu vzburjenja (Thompson, 1952).

V novejšem času pa je vedno več eksperimentalnih podatkov, ki kažejo, da ima BChE vendarle nek pomen v centralnem živčevju. Leta 1957 sta Desmedt in La Grutta ugotovila, da intrakarotidna injekcija inhibitorja BChE že v majhnih dozah desinhronizira spontano električno aktivnost možganske skorje, medtem ko relativno velike doze inhibitorja AChE nimajo tega učinka. Koelle (1955) je mnenja, da BChE sodeluje pri regulaciji permeabilnosti kapilar, Elkes (1957) pa meni, da ima BChE važen pomen pri regulaciji tonusa majhnih cerebralnih žil.

Pojavi se vprašanje hematoencefalne bariere. Navzočnost BChE v velikih koncentracijah v stenah kapilar



(Koelle, 1954; Goldberger, 1961) govori za to, da bi ona mogla biti encim, ki je odgovoren za spremembe v permeabilnosti. Zato bi pričakovali povečane učinke LSD, če pred tem injiciramo inhibitor BChE, podobno kot je to znano za barbiturate. Vendar naši poskusi kažejo, da ima LSD manjši učinek po predhodno injiciranem DPDA.

### Vpliv atropina na pogojne reflekse in možganske holinesteraze

Majcen in Župančič (1956) menita, da tudi BChE sodeluje pri prenosu vzburjenja v sinapsi; zadolžena naj bi bila za muskarinske učinke ACh. Ker je atropin znan kot inhibitor muskarinskih učinkov v organizmu in učinkuje tudi psihotropno, smo hoteli preizkusiti tudi njegov vpliv na pogojne reflekse in tako zvedeti kaj več o pomenu receptorjev za muskarinske učinke ACh pri delovanju LSD na pogojne reflekse. Najprej smo ugotovili, da je atropin inhibitor možganske BChE (Tabela 5);  $I_{50}$  je pri 1 mM. Atropin v koncentracijah

Tabela 5. Inhibicija možganskih holinesteraz s atropinom in vitro.

Substrat (mM)	Koncentracija atropina (mM) in procent inhibicije				
	1	0,5	0,2	0,1	0,01
ACh 3,3	∅	∅	∅	∅	∅
BuCh 10,0	50	39	31	18	∅

10  $\mu$ M - 1 mM ne zavre hidrolize ACh v homogenatih možganov. Atropin inhibira aktivnost možganske BChE pri podgani tudi 'in vivo': 5 mg/kg inhibira vsaj za 16 %.

V poskusih s pogojnimi refleksi smo treniranim podganam injicirali atropin v dozah 0,29 mg/kg, 2,9 mg/kg ter 29 mg/kg. Atropin v nobeni dozi ni vplival niti na število pogojnih refleksov niti na reakcijski čas, niti ni spremenil učinkovanja LSD. Tipičen primer za delovanje atropina kaže diagram 17, za delovanje atropina in LSD pa diagram 18.

Zanimivo je, da atropin ne spremeni pogojnih refleksov niti v orjaških dozah (29 mg/kg). Čeprav atro-

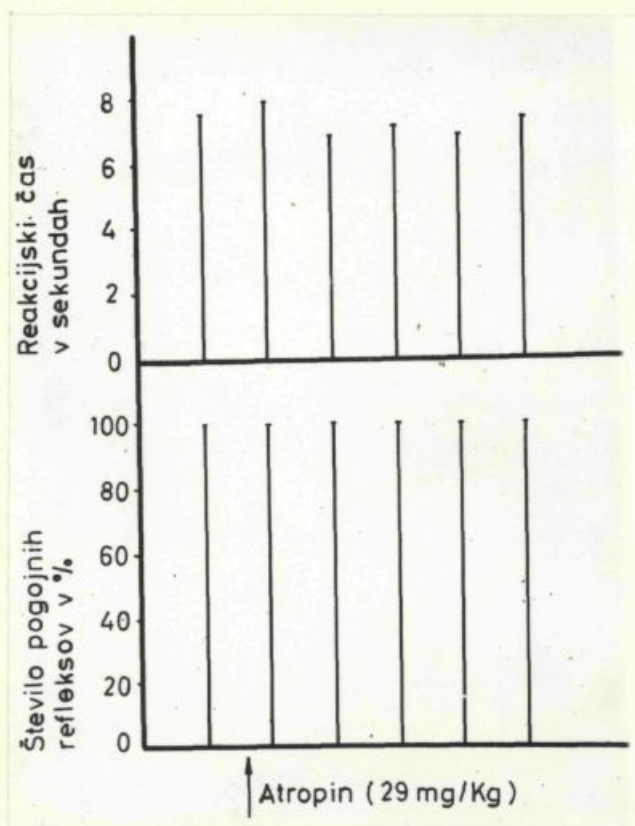


Diagram 17. Učinek atropina na pogojne reflekse. Legenda kot pri diagramu 2.



pin inhibira aktivnost BChE v možganih podgane, se pri tem ne menja vpliv LSD na pogojne reflekse, medtem ko drug inhibitor BChE - DPDA popolnoma zavre delovanje LSD že v dozi 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Razlaga je mogoče v tem, da bi atropin inhibiral muskarinsko delovanje ACh v centralnem živčevju, DPDA pa ne bi. Ker v naših poskusih atropin ni spremenil vpliva LSD na pogojne reflekse, je videti, da delovanje LSD na pogojne reflekse najbrž ne gre preko muskarinskih receptorjev.

Tudi drugi avtorji so merili učinkovanje atropina na pogojne reflekse. Tako sta Pfeiffer in Jenney (1957)

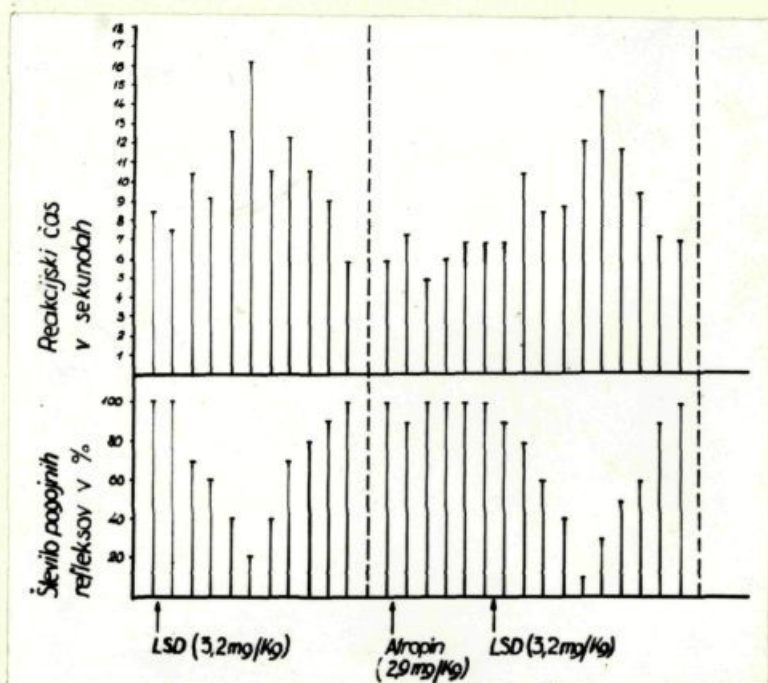


Diagram 18. Učinek LSD na pogojne reflekse po predhodno injiciranem atropinu. Legenda kot pri diagramu 3.

ugotovila, da atropin (5 mg/kg) ni vplival na pogojne reflekse pri podgani, pač pa je preprečil inhibicijo pogojnih refleksov z ezerinom in v osemkrat močnejši dozi tudi z arekolinom, ki je tercialni amin z muskarinskim delovanjem v centralnem živčevju. V tej zvezi je zanimivo, da je atropin popolnoma preprečil tudi centralne muskarinske učinke tremorina (Haslett, George in Jenden, 1963).

Michelson (1961) je opisal inhibicijo pogojnih refleksov z atropinom pri podgani, miški, psu in golobih, vendar razen pri poskusih s psi ne navaja doz. Isti avtor je tudi opazil, da atropin zavira priučenje pogojnih refleksov pri miškah, to je v skladu s sporočilom Harrisa (1961), da atropin povečuje spontano aktivnost mišk in zato otežkoča vzgojo pogojnih refleksov.

Zaviralni učinek atropina na vzgojo pogojnih refleksov je opisal tudi Ricci (1963) pri opici in sicer že z majhnimi dozami (0,5 mg/kg), dodal pa je tudi razlago tega pojava: atropin je zavrl vzdramljenje, ki ga sicer sproži pogojni dražljaj. Večje doze atropina (0,8 - 1 mg/kg) pa so okvarjale tudi priučene pogojne reflekse. Elektrofiziologi so šli še korak naprej: ko so z EEG preiskovali učinke atropina, so našli, da ni nikake skladnosti med obnašanjem poskusne živali in elektrofiziološkimi izvidi. Našli so namreč (Elkes, 1957), da daje atropin (2 - 3 mg/kg) pri mački v EEG znake globokega spanja, čeprav je bila žival popolnoma budna, celo ekscitirana. Da bi našel vsaj približno lokalizacijo za delovanje atropina v centralnem živčevju, je isti avtor (Elkes, 1957) meril učinke atropina na cerviceu isole in našel zopet zgoraj opisano neskladje in to govori za prijemališče atropina nad možganskim



deblom. LSD pa obratno na preparatu cerveau isole ni dajal več karakterističnih sprememb EEG, tako da sta Bradley in Key (1958) prišla do že citirane trditve, da mora LSD delovati na strukture, ki leže niže od medmožganja, verjetno na kolaterale, ki se odcepljajo od aferentne poti v retikularno formacijo v možganskem deblu.

### Vpliv BW284C51 na pogojne reflekse in možganske holinesteraze

Močan in selektiven inhibitor AChE v možganih podgane je BW284C51. Na tabeli 6 vidimo inhibicijo AChE v homogenatih možganov in vitro.

Tabela 6. Inhibicija AChE podganjih možganov z BW284C51 in vitro.

Substrat (mM)	Molarna koncentracija in procent inhibicije		
	$1 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-6}$
MCh 3,0	87	88	94

Poskusi z BW284C51 na pogojnih refleksi so pokazali, da doze 0,57 mg/kg in manjše ne spremenijo pogojnih refleksov, močnejše doze pa delujejo nespecifično na pogojne reflekse, žival neha odgovarjati na dražljaje. Zato smo v nadaljnjih poskusih uporabljali BW284C51 v dozi 0,57 mg/kg ali 0,28 mg/kg. Pol ure po injiciranju BW284C51 je LSD sicer imel manjše učinke na pogojne reflekse (na diagramu 19 vidimo primer, kjer je zavor

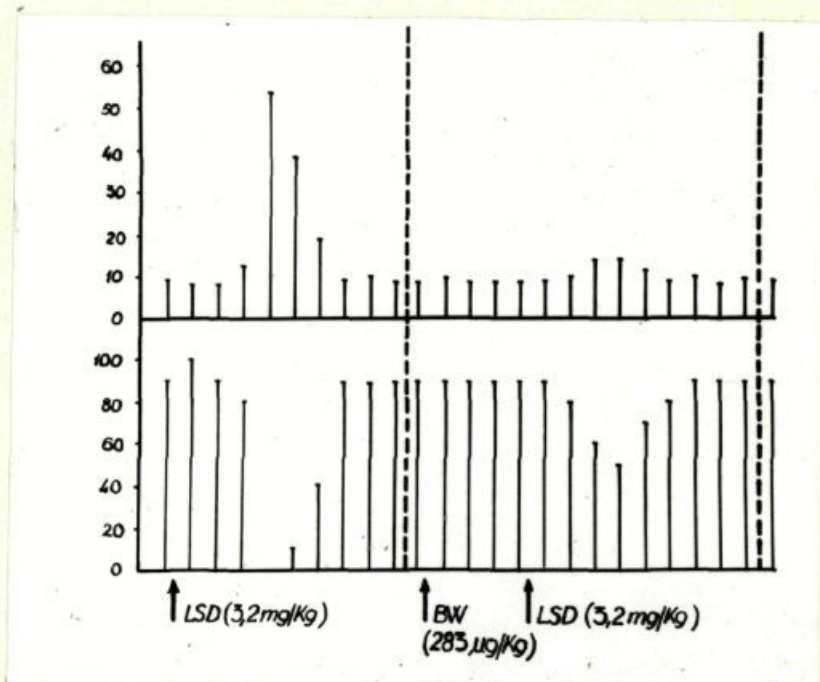


Diagram 19. Učinek LSD na pogojne reflekse po predhodno injiciranem BW284051. Legenda kot pri diagramu 3.

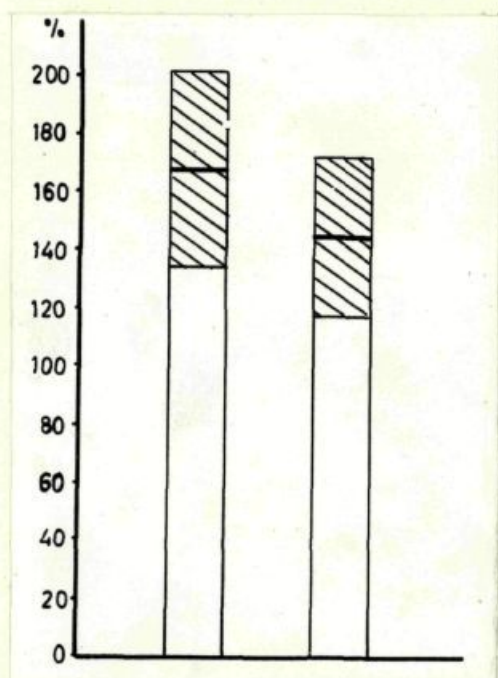


Diagram 20. Levi steber predstavlja podaljšanje reakcijskega časa na LSD (3,2 mg/kg), desni pa podaljšanje reakcijskega časa po isti dozi LSD, injicirani 30 minut po BW284051 (0,57 mg/kg). Podaljšanje reakcijskih časov nad normalnim je izraženo v procentih in je povprečje desetih poskusov. Prečne črte označujejo polje standardne deviacije.



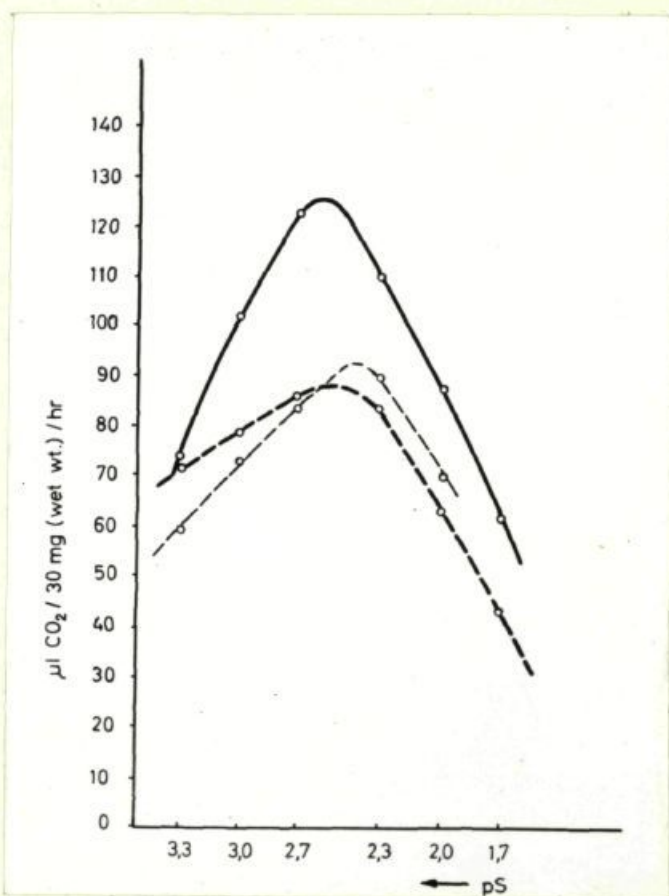


Diagram 21. Aktivnost AChE 'in vivo' v homogenatu možganov brez inhibitorja (—————), z BW284C51 0,57 mg/kg (-----) in z BW284C51 + LSD 3,2 mg/kg (-----). Substrat ACh 3,0 mM; homogenatu je bil dodan DPDA  $10^{-4}$  M.

delovanja LSD najbolj izrazit), kljub temu pa razlika ni statistično pomembna ( $p > 0,05$ ). Na diagramu 20 je prikazana povprečna vrednost desetih poskusov z veliko standardno deviacijo. Ista doza BW284C51, injicirana podkožno, inhibira čez pol ure možgansko AChE vsaj za 20 %. Na diagramu 21 je prikazana aktivnost AChE v možganih podgane, ki je dobila BW284C51 in čez 30 minut LSD, ter bila žrtvovana, ko so bili učinki

na pogojne reflekse najbolj izrazit. Aktivnost AChE take podgane primerjamo z aktivnostjo AChE v možganih podgane iz istega gnezda, ki je dobila samo BW284C51 0,57 mg/kg ter podgane iz istega gnezda, ki je dobila samo fiziološko raztopino. Vse podgane so bile žrtvovane v enakih časih po injekciji. Iz diagrama razberemo, da je BW284C51 inhibiral AChE 'in vivo' (pri pS 2,3 vsaj za 24 %, pri pS 2,7 pa vsaj za 32 %) in da dodatek LSD ni bistveno spremenil te inhibicije.

Medtem ko smo že z minimalnimi dozami specifičnega inhibitorja BChE preprečili vsak učinek LSD na pogojne reflekse, specifični inhibitor AChE ni pokazal takih lastnosti. Možna razlaga bi bila: slab prehod BW284C51 skozi hemato-encefalno bariero, kar bi pričakovali glede na kemično strukturo tega inhibitorja. Tako razlago podpira tudi poskus, ko injiciramo istočasno tako BW284C51 kot LSD in opazujemo učinke na pogojne reflekse. Na diagramu 22 vidimo, da injiciranje BW284C51 nima vpliva na delovanje LSD.

Desmet in La Grutta (1957) sta bila presenečena, ko sta v poskusih na mačkah ugotovila, da BW284C51 (0,30 mg/kg) naglo prehaja skozi hemato-encefalno bariero (10 - 60 sekund po injekciji učinkuje že onstran barriere); ker traja vsak naš poskus s pogojnimi refleksi vsaj 150 minut, bi maksimalni specifični učinek najbrž mogli zaslediti.

#### Presoja inhibicije 'in vivo'

Pri presoji inhibicije ChE v možganih 'in vivo' so izmerjeni procenti le približni podatki, dejanska inhibicija je lahko drugačna od izmerjene. Upoštevati



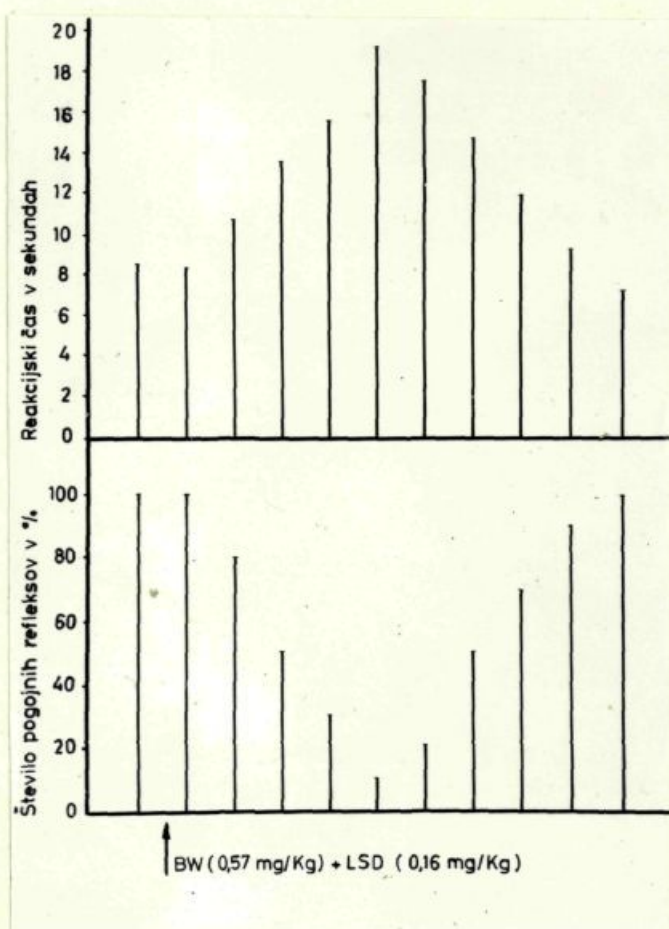


Diagram 22. Učinek istočasno injiciranih BW284C51 in LSD na pogojne reflekse. Legenda kot pri diagramu 2.

moramo anatomske in biokemične posebnosti možganov. Snov, ki pride s krvjo, mora najprej preiti hematoencefalno bariero. Po Schakerju (1962) naj bi bila to kapilarna mreža ali/in okolišna plast glioznih celic. Ko je snov v možganskem tkivu, se porazdeli med glio in nevroni ali v nevronih med jedrom, mitohondriji, endoplazmičnim retikulumom, aksonom in sinapsi, odvisno od kemične sestave ustreznega področja.

Tako sta Roth in Barlow (1961) z avtoradiografijo ugotovila, da fenobarbiton in urea mnogo hitreje prehajata v možgansko siv kot v bel. Avtorja menita, da je debela plast lipidnih membran, ki tvorijo mielinško ovojnico v posameznem živčnem vlaknu v beli, mnogo večja ovira za prehod neke snovi, kot pa edina lipidna membrana, ki objema nemielizirano vlakno v sivi. Ni treba, da je večja koncentracija neke snovi ravno tam, kjer je tudi večje število receptorjev (Waelisch, 1961). Posledica je, da encimi v možganih niso inhibirani enakomerno. Pridruži se že kemična posebnost možganskega tkiva - maščobe in v zvezi s tem različna topnost raznih inhibitorjev v njih. Znano je, da so organofosforni inhibitorji ChE bolj obstojni v lipidnem mediju kot drugi inhibitorji ChE. Verjetno je, da se pri homogeniziranju tkiva za pripravo encimskega preparata inhibitorji topni v maščobah sprostijo in zavirajo ChE in vitro. Ugotovili so, da je več kot 90 % AChE v možganih živali tretiranih s paraoksonom ali DFP bilo inhibirano na ta način, kar je seveda vodilo do napačnih zaključkov (Heath, 1961). Od snovi, ki smo jih uporabljali v naših poskusih, je edino DFDA organofosforni inhibitor, zato opisana komplikacija ni bila bistvena težava pri presoji rezultatov. Mnogo bolj nejasno je vprašanje prehoda inhibitorjev skozi hemato-encefalno bariero, ki smo ga že omenili pri opisu pomena BChE. Tudi tu je važna topnost inhibitorja v maščobah, ker pa bariera ni popolna, lahko zaporedne doze le povzročijo inhibicijo (Šradan, Dimafoks). Inhibitorji s kvartarnim dušikom po pravilu težko prehajajo bariero in zato komaj inhibirajo možgansko ChE (Burgin, Hobbiger, 1951; Fredriksson, 1957); oni s terciarnim dušikom pa jo lahko prehajajo in zato močno



inhibirajo ChE, po navadi enako v krvi kot v možganih. Med inhibitorji, ki smo jih uporabljali v našem delu, ima kvartarni dušik BW284C51, terciarnega pa atropin.

Naslednji faktor, ki ga moramo upoštevati pri vrednotenju rezultatov inhibicije ChE 'in vivo', je že nekajkrat omenjena razredčitev homogenatov. Straus in Goldstein (1943) v svojem natančnem delu o obnašanju encimov pravita: "Bilo bi napačno misiti, da so napake, ki nastanejo zaradi neupoštevanja učinka razredčitve (disociacija kompleksa encim-inhibitor, dodal R. P.), le majhne. Lahko so tako ogromne, da razvrednotijo zaključke, ki temelje na aplikaciji eksperimentalnih vrednosti za  $i$  (= razmerje inhibiranega encima proti celotnemu, dodal R. P.) pri različnih razredčitvah v primeri z nerazredčenimi ... Tako postane tudi jasno, zakaj so tako pogosto nesoglasja med eksperimentalno najdenimi vrednostmi za  $i$  in spremljajočimi fiziološkimi odgovori."

Ker je v naših poskusih pomembno poznati inhibicijo ChE in vivo, če hočemo ravno inhibiciji ChE pripisovati učinke LSD na pogojne reflekse, smo napravili nekaj orientacijskih poskusov, da smo merili stopnjo inhibicije pri razredčevanju homogenatov. Diagram 23 nam pove, da je inhibicija praktično enaka pri razredčevanju homogenatov z LSD, da pa pada pri razredčevanju homogenatov, ki vsebujejo BW284C51. To pomeni, da podatki o inhibiciji in vivo pri inhibitorju LSD ne zavise od razredčenja, pač pa oni pri BW284C51. Po Strausu in Goldsteinu bi inhibicija z LSD bila zato praktično ireverzibilna. V nadaljnjih poskusih smo videli, da se tudi inhibicija z DPDA in vivo ne spreminja z razredčenjem.

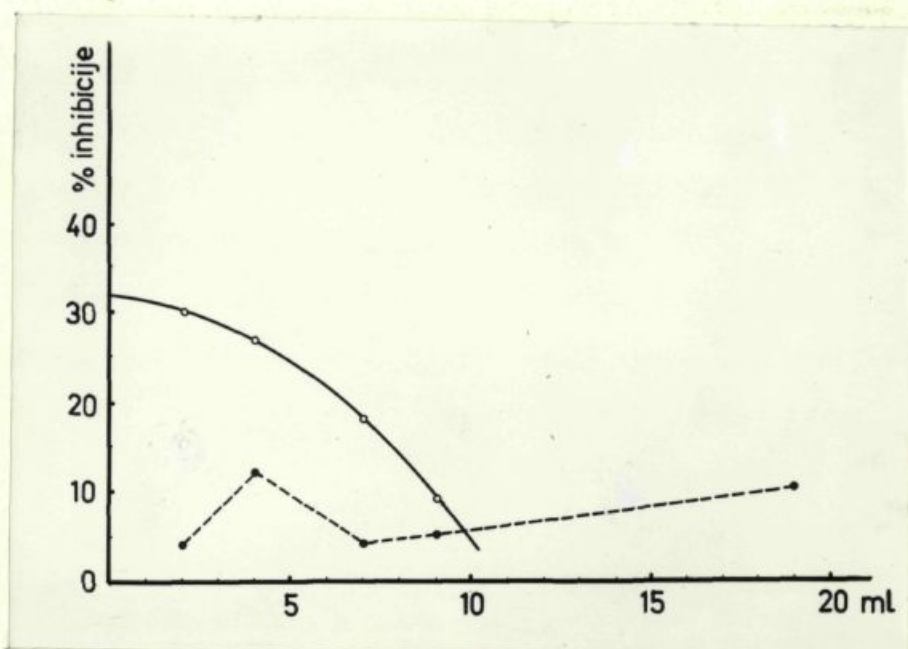


Diagram 23. Vpliv razredčenja homogenatov na brzino reakcije. Homogenati z inhibitorji dodanimi in vivo: ————— = BW284C51 0,57 mg/kg; - - - - - = LSD 3,2 mg/kg. Substrat: MCh 3,0 mM. Abscisa: ml inkubacijske tekočine na 1 g tkiva. Ordinata: procent inhibicije.

#### Drugi inhibitorji holinesteraz kot psihotropne snovi

LSD je sicer najbolj tipičen predstavnik grupe psihozomimetskih snovi (povzroča psihozi podobno stanje v dozi, ki je manjša kot pri drugih psihozomimetskih snoveh; tabela 7), vendar imajo tudi nekateri drugi inhibitorji ChE psihozomimetske učinke.

Tako povzroča DFP pri človeku psihične motnje kot: emocionalno labilnost, notranjo napetost, neubranljivo



zaspanost in more (Goodman in Gilman, 1955). Sherwood (1957) je poročal o katatonem stuporju podobnem stanju pri mački po 100 ug DFP intra ventrikularno. To stanje je trajalo okoli 60 minut, dosebel pa ga je tudi z velikimi dozami ACh. Avtor ni poskušal z atropinom ali kurarinom odstraniti simptomov po DFP, delal pa je poskuse s kurarinom samim in našel, da d-tubokurarin prehaja skozi hemato-encefalno bariero ter povzroča sinhronizacijo v EEG. d-Tubokurarin (50 µg) injiciran intraventrikularno pa povzroča krče in amnezijo ter povišuje splošno vzdražnost.

Tabela 7. Minimalne količine raznih snovi (v µg), ki povzročajo psihične spremembe pri človeku (po de Booru, 1956).

Glutaminska kislina	per os	10,000.000 do 40,000.000
Etilni alkohol	per os	7,000.000 do 20,000.000
Debenamin	i. v.	200.000 do 600.000
Kokain	s. k.	80.000 do 300.000
Meškalin	per os	10.000 do 20.000
Morfin	s. k.	5.000 do 10.000
Atropin	s. k.	3.000 do 10.000
Amfetamin	per os	1.500 do 3.000
LSD	per os	10 do 30

ACh (10 - 20 µg) intraventrikularno je povzročil pri mački znižanje reaktivnosti in depresije, atropin (150 - 300 ug) pa povečano živahnost in prijaznost ter predenje.

Mnogo preskusov, slučajnih ali namernih, je narejenih z atropinom tudi na človeku. Pojavljajo se naj-

različnejše oblike psihotičnega stanja, ki jih spremljata občutek strahu in močan motoričen nemir. Značilno za psihotične učinke atropina je, da se začno zelo naglo po aplikaciji atropina, da pa lahko trajajo tudi nekaj dni.

Heksametonij je povzročil pri mački mišično oslabilitev in inaktivnost, dekametonij pa spastičnost (Sherwood, 1956). Psihični učinki morfina so znani, pa tudi podatek, da je morfin inhibitor ChE v možganih (Augustinsson, 1948). Dobro so znani tudi psihični učinki kofeina, ki je selektivni inhibitor AChE (Augustinsson, 1948). Tudi nikotin in muskarin povzročata psihične spremembe. Učinki nikotina so opisani precej različno, tako evforični, ekscitativni kot psihotični - iluzije, psihoze (de Boer, 1956). Meskalin povzroča optične in akustične halucinacije ter depersonalizacijo (Šerko, 1913). Kurarin pušča pri človeku zavest ohranjeno, povzroča pa močan občutek strahu, ki ga Hügin (1947) razlaga z neprijetnim položajem zaradi imobilnosti in težav pri dihanju. Znani halucinogeni snovi sta tudi bufotenin in psilocibin; oba dva inhibirata AChE v možganski sivi ( $I_{50} = 2 \times 10^{-4}$  M oziroma  $3 \times 10^{-3}$  M; Zsigmond, Foldes in Foldes, 1961). Ker ima enak  $I_{50}$  kot psilocibin tudi serotonin, ki ni halucinogena snov, menijo avtorji, da ni nikakega sorazmerja med halucinogenimi učinki psilocibina ter strukturno podobnih spojin in inhibicijo ChE in vitro.

#### Vpliv BOL na pogojne reflekse in možganske holinesteraze

Vse zgoraj opisane snovi, ki imajo psihične učinke, so bodisi substrati bodisi inhibitorji ChE.



Poznamo pa bromov derivat LSD = BOL (2-bromo-LSD = BOL-148), ki sicer inhibira možganske ChE, nima pa pri človeku psihičnih učinkov niti v dozi 1 mg. Tudi drugače se BOL razlikuje od LSD: tako za razliko od LSD ne kontrahira mišičja v maternici, tudi v velikih dozah ne povzroči padca krvnega pritiska in dvakrat močneje deluje proti učinkom serotonina. Isbell s sodelavci (1959) je našel, da velike doze BOL lahko povzročijo toleranco za LSD, kar kaže, da obe snovi prijemljeta na istem mestu. Po prvih poskusih na možganih je kazalo, da BOL enako hitro prehaja skozi hemato-encefalno bariero kot LSD (Cerletti, 1956), kasneje pa so ugotovili, da BOL zaostaja (Richter, 1961).

Prva, ki sta merila učinke BOL na aktivnost ChE, sta bila Zehnder in Cerletti (1956). Ugotovila sta, da BOL in LSD približno enako inhibirata serumsko ChE človeka ( $I_{50}$  za BOL je  $10^{-4,8}$  M, za LSD pa  $10^{-5}$  M, pri substratu benecolholina  $10^{-2,1}$  M) in zato nekoliko drzno zaključila, da inhibitorni vpliv LSD na BChE ni povezan s psihičnimi učinki LSD. Podobno so leta 1960 trdili tudi Zsigmon, Foldes in Foldes, ko so našli, da ima LSD kot psihozomimetska snov  $I_{50}$  za ChE človeških možganov  $1,1 \times 10^{-4}$  M in da ima BOL, ki nima psihozomimetskih lastnosti, skoraj enak  $I_{50}$  ( $1,8 \times 10^{-4}$  M). Avtorji na eni strani uporabljajo homogenate celotnih možganov, ki ne pokažejo specifične aktivnosti inhibitorja v morebitnih arealih, ki so važni za psihične procese, na drugi strani pa so kot material za homogenat jemali samo možgansko siv.

Tudi mi smo merili inhibicije BChE, AChE in celotne ChE z BOL in vitro in 'in vivo' ter našli: in vitro praktično enak zavor kot ga daje LSD: aktivnost

teh encimov 'in vivo' merjena po BOL (0,2 mg/kg) pa ni bila spremenjena, vendar je bil to en sam poskus.

Diagram 24 kaže poskuse s pogojnimi refleksi in BOL. Vidimo, da BOL sicer vpliva na pogojne reflekse, vendar pa zavor ni tako velik, kot ga povzroči LSD v ekvimolarni dozi.

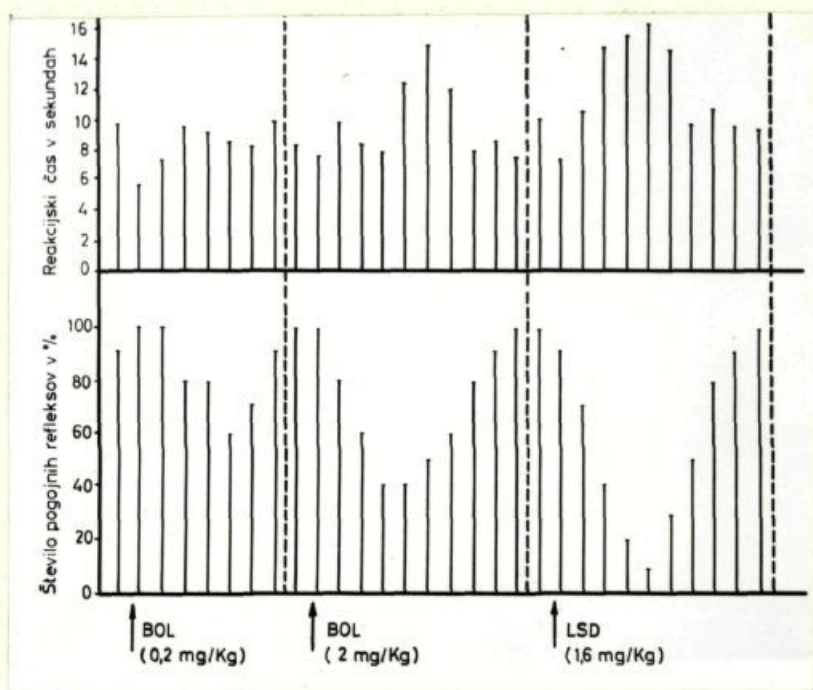


Diagram 24. Učinkovanje BOL in LSD na pogojne reflekse. Legenda kot pri diagramu 3.

Ker se pogojni refleksi spremenijo v istem času po injiciranju obeh snovi, menimo, da tudi BOL preha-ja hemato-encefalno bariero kot LSD. Za razliko od LSD DPDA ne prepreči učinkovanja BOL, atropin pa ga ne prepreči podobno kot pri LSD. Diagram 25.

Težko je najti primerno razlago za psihične učinke LSD, BOL in drugih psihozomimetskih snovi.



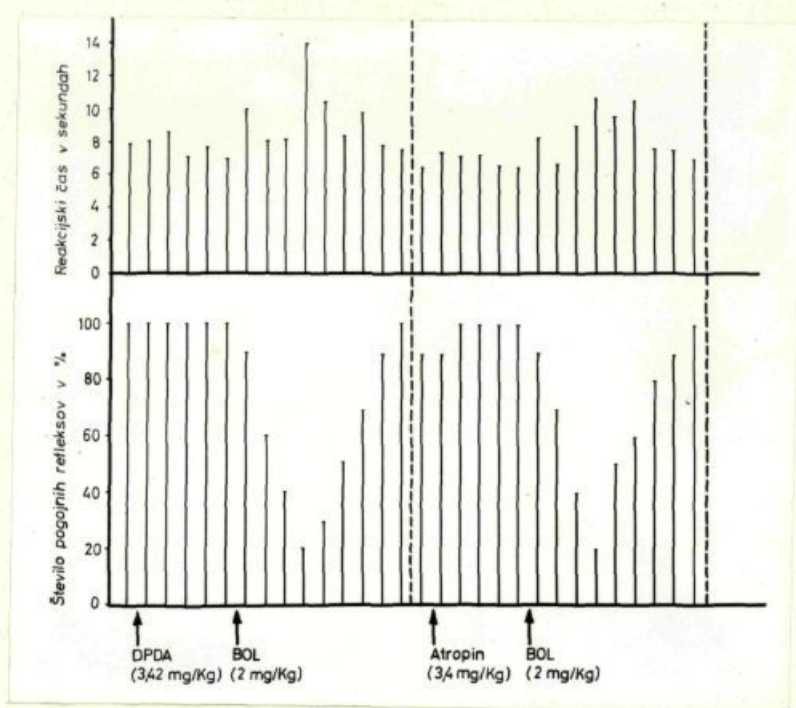


Diagram 25. Učinkovanje BOL po predhodno injiciranem DPDA ali atropinu. Legenda kot pri diagramu 3.

Možno je, da so v centralnem živčevju areali, kjer se odvijajo specifični psihični procesi in kjer naše snovi mogoče le spreminjajo aktivnost ChE, tega pa s tehniko homogenatov ne moremo zaslediti. Ta možnost in pa dejstvo, da razni avtorji vedno bolj poudarjajo pomen retikularne formacije pri pogojnih refleksih in drugih oblikah višje živčne dejavnosti, sta nas privedla k podrobnejšemu preučevanju retikularne formacije v zvezi z našo temo.

#### Retikularna formacija in psihotropne snovi

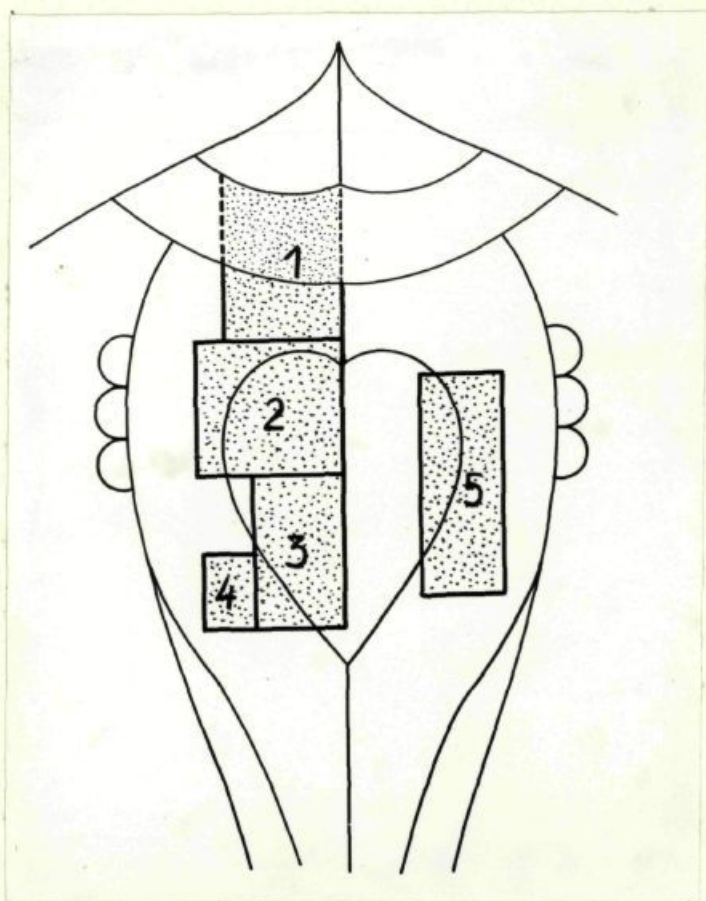
Pri višjih živalih je retikularna formacija ostank tistih struktur, ki so pri primitivnih oblikah

predstavljale najvišji nivo živčne aktivnosti. Njena filogenetska arhaičnost se kaže v preprosti morfolo-  
giji tistega dela možganskega debla, kjer mikroskop  
pokaže: "celice različnih tipov in velikosti med ka-  
tere se vrivajo povsma vlaken in se križajo v vseh  
smereh", kot je to opisal odkritelj retikularne for-  
macije Ramon y Cajal ob zatonu prejšnjega stoletja.  
Zatorej ni presenetljivo, če so aferentne funkcije  
retikularne formacije namenjene primitivnim in osnov-  
nim substratom za motorično aktivnost in če aferent-  
ne funkcije bistveno podkrepljujejo tako težko in v  
filogenetskem razvoju tolikokrat preizkušeno odloči-  
tev: beg ali boj. V najbolj zadebelenem delu retiku-  
larne formacije sta dihalni in bazomotorni center -  
ponovni primer za vitalni pomen te "mrežaste tvorbe".

Vsaka senzorična informacija pride v retikularno  
formacijo na dva načina: po kolateralah od klasičnih  
poti in po kortiko-retikularni poti. Za optične impul-  
ze je znano, da je druga pot mnogo bolj bistvena od  
prve (Ingvar in Hunter, 1955) in lahko sledi povečanje  
ali znižanje aktivnosti retikularne formacije s slede-  
čim povratnim delovanjem. Oswald (1962) meni celo, da  
je za nastanek optičnih halucinacij odgovorno ravno  
medsebojno delovanje specifičnih kortikalnih impulzov  
in nespecifičnih impulzov iz retikularne formacije.  
Kakorkoli že, na splošno je sprejeto, da senzorični  
dražljaji, ki pridejo po kolateralah, vzdražijo reti-  
kularno formacijo, ta pa poveča vzdražnost v celem  
korteksu in vzdržuje normalno budnost in pozornost.  
Nekateri avtorji menijo, da je retikularna formacija  
sedež diskriminacije in percepcije dražljajev, Oswald  
(1962) pa se z njimi ne strinja, ko pravi, da infor-  
macija, ki vstopa v retikularno formacijo, zgubi svojo



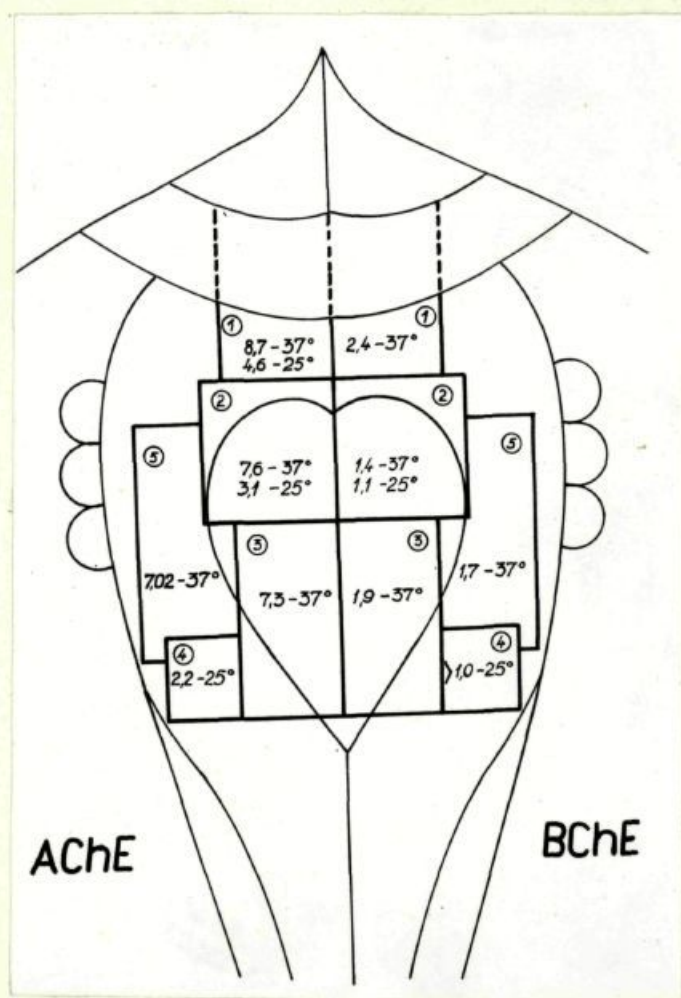
specifičnost. Impulzi iz raznih senzoričnih poti grede v skupna polja v retikularni formaciji. Če npr. v poskusih dva impulsa iz dveh različnih čutil dosežeta isto polje v retikularni formaciji, potencial v retikularni formaciji ni večji kot bi bil po posameznem signalu iz ene ali druge senzorične poti - njihova individualnost je zgubljena. Zato ascendirajoči, aktivirajoči impulsi iz retikularne formacije ne nosijo specifične informacije v korteks.



Slika 4. Shematični prikaz retikularnih jeder možganskega debla pri podgani. 1 - nucleus pontis oralis, 2 - nucleus pontis caudalis, 3 - nucleus gigantocellularis, 4 - nucleus lateralis in 5 - nucleus parvocellularis.

Merjenje aktivnosti holinesteraz v posameznih živčnih celicah retikularne formacije in vpliv LSD in atropina na aktivnost holinesteraz

V taki situaciji je možno, da bi psihosomatske snovi v retikularni formaciji res lahko imele idealno poprišče, saj bi lahko modificirale vsak senzorični



Slika 5. Aktivnost AChE (substrat ACh 3 mM) in BChE (substrat BuCh 10 mM) v posameznih živčnih celicah raznih retikularnih jeder. Številke pomenijo  $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-4}/\text{celico/hr}$  pri ustrezni temperaturi.



aferentni impulz. Poročali smo že o trditvi Bradleya in Elkesa (1958), da LSD deluje na kolaterale, ki vstopajo v retikularno formacijo. Glede na možnost, da bi torej LSD deloval samo v nekaterih celicah retikularne formacije in da obstaja še nejasnost glede aktivnosti holinergičnega sistema v retikularni formaciji, smo izmerili aktivnost ChE v posameznih celicah retikularnih jeder možganskega debla ter vpliv LSD na aktivnost ChE. Pri anatomski lokaciji jeder smo se opirali na topografsko delo Brodala (1958) ter Meessena in Olszewskega (1949). Živčne celice smo izolirali iz jeder, ki so shematično prikazane na sliki 4.

Aktivnost AChE in BChE posameznih živčnih celic je sumarično prikazana na sliki 5. Vidimo:

- da je v celicah retikularne formacije ChE,
- da je tudi v živčnih celicah retikularne formacije BChE in
- da obstajajo le majhne variacije v aktivnosti AChE med celicami raznih jeder razen lateralnega jedra.

Čeprav ni velikih razlik v aktivnosti ChE med živčnimi celicami večine jeder, pa so velike variacije med celicami istega jedra. Kako se spreminja aktivnost ChE med posameznimi celicami istega jedra, nam pokaže tabela 8. Največje variacije smo opazovali, kadar smo uporabljali kot substrat MCh. Na splošno smo z MCh dobivali le nekaj manjše vrednosti kot z ACh, dostikrat pa smo imeli celice, kjer nismo mogli izmeriti nikake hidrolize MCh. Primer za to je tabela 9. Podobne pojave so opisali Giacobini (1957) in Giacobini in Holmstedt (1958), pri celicah simpatičnih ganglijev in prednjih rogov. Na splošno so celice simpatičnih



Tabela 8. Aktivnost ChE v posameznih živčnih celicah kavdalnega pontinega jedra pri podgani. Substrat: ACh 3 mM.

Produkcija CO <sub>2</sub> (μlx10 <sup>-5</sup> /hr/celico)	Povprečna vrednost ± SNP
44,1	
117,7	
94,8	
89,2	
99,5	
94,9	
83,0	
86,2	
38,0	
51,0	
84,2	
62,4	
55,0	
63,4	
120,0	
84,2	
59,2	
72,5	
100,0	
58,0	
65,5	
27,1	
72,0	
71,5	
115,0	
10,0	
148,0	
26,1	
113,0	

76 ± 5,5

ganglijev imele podobno aktivnost ChE kot celice v naših poskusih, one iz prednjih rogov pa so bile bolj aktivne (Tabela 10).

Giacobini (1957) razlaga različno aktivnost ChE v celicah simpatičnih ganglijev s tem, da morda različna aktivnost ChE ustreza celicam z različnimi funkcijami, to je, da celična populacija simpatičnega ganglija ni farmakološko enotna. To mnenje podpirajo tudi rezultati Shawa in sodelavcev iz leta 1951, ki so ugotovili, da posamezne celice zgornjega cervikalnega ganglija različno dogovarjajo na tetraetilamonij, nikotin ali kurarin. Možno bi bilo tudi, da različne aktivnosti ChE v raznih celicah predstavljajo razne stopnje v sintezi encima.

V zvezi z razglabljanjem o različnih stopnjah živčne aktivnosti v posameznih živčnih celicah je zanimivo, da sta leta 1952 Brattgard in Hyden s rentgensko mikroradiografijo našla velike variacije v celični masi in količini



Tabela 9. Aktivnost ChE in AChE v posameznih živčnih celicah oralnega pontinega jedra pri podgani. Temperatura 25° C.

Substrat (mM)	Posamezna celica Produkcija CO <sub>2</sub> ( $\mu\text{l} \times 10^{-5}/\text{hr}$ )	Povprečna vrednost $\pm$ SNP
ACh 3,0	15,9	49 $\pm$ 7,7
	20,8	
	50,0	
	53,0	
	78,3	
	91,0	
	63,3	
	24,6	
	36,7	
	22,3	
	7,4	
	48,4	
	107,8	
	31,2	
77,8		
MCh 3,0	21,1	38 $\pm$ 9,6
	63,6	
	8,4	
	10,3	
	54,4	
	69,6	
	38,5	
	x	
	x	
	x	
x		
x		

x = aktivnost je manjša kot občutljivost metode.

beljakovin v celicah iste živčne strukture (Deitersovo jedro, celice prednjih rogov, spinalne ganglijske celice in Purkinjejeve celice). Zato smo skušali primerjati encimsko aktivnost s približnim volumenom celice in ni-

Tabela 10. Aktivnost ChE v posameznih živčnih celicah.  
Substrat: ACh.

	Produkcija CO <sub>2</sub> ( $\mu\text{l} \times 10^{-5}/\text{hr}^2$ ) Povprečna vred- nost $\pm$ SNP	Substrat (mM)	Število celic	
Nucl.ret.gigantocell.	73 $\pm$ 8,0	3,0	10	
Nucl.ret.parvocell.	70 $\pm$ 14,0	3,0	11	
Nucl.ret.pontis caud.	76 $\pm$ 6,0	3,0	29	Naši poskusi
Nucl.ret.pontis oral.	87 $\pm$ 9,0	3,0	26	
Nucl.ret.lateralis	22 $\pm$ 13,0	3,0	8	
Nucl.ambiguous oralis	77 $\pm$ 10,6	3,0	2	
Simpatični ganglij	185	6,5		Giacobini 1957
Simpatični ganglij	203	6,5		Giacobini 1959
Prednji rog	700	6,5		Giacobini in
Prednji rog	163	6,5		Holmstedt 1958

smo našli nikake skladnosti, tabela 11. Vidimo, da imajo celice parvocelularnega jedra skoraj enako aktivnost ChE kot celice pontinega jedra, čeprav imajo prve desetkrat manjšo prostornino.

S podobno metodo kot je naša, so večje ali manjše razlike v aktivnosti ChE med živčnimi celicami ali v drugih živčnih strukturah našli tudi drugi avtorji (Erzin in Zajiček, 1958; Erzin in Zeuthen, 1961), zato sklepamo, da je to normalen pojav, ki mora imeti nek fiziološki pomen. Variabilnost je v skladu s splošnim naziranjem, da je vsaka živčna celica zelo kompliciran sistem s številnimi sinaptičnimi zvezami; naša metoda pa omogoča le izolacijo telesa celice ne pa izrastkov. Curtis, Ryall in Watkins (1963) so v vrsti centralnih



Tabela 11. Aktivnost ChE in volumen posameznih celic.

	Produkcija CO <sub>2</sub> ( $\mu\text{l} \times 10^{-5}/\text{hr}$ )	Volumen celice ( $\mu^3 \times 10^3$ )	Aktivnost/ volumsko enoto ( $\mu\text{l CO}_2 \times 10^{-9}/\mu^3/\text{hr}$ )
	38,0	33,1	11,47
Nucleus reticularis	51,0	269,7	1,89
	84,2	99,6	8,46
pontis caudalis	62,4	65,8	9,48
	55,0	178,2	3,19
	63,4	186,5	3,41
	41,8	3,3	126,50
Nucleus reticularis	65,8	3,5	188,00
	130,6	9,8	134,00
parvocellularis	40,3	4,4	91,70
	98,1	34,4	28,60
	44,6	16,5	27,00

sinaps z elektroforetsko dodanim ACh ali kemično podobnimi snovmi, dobili včasih vzdraženje, včasih zavor. Elektroforetsko metodo so spopolnili Spehlmann, Kapp in Jung (1964) tako, da so zožili premer elektrode na 1  $\mu$  in to jim je omogočilo tele izredno pomembno odkritje: 1/5 živčnih celic v vidnem korteksu odgovarja na lokalno dodani ACh. Avtorji še ne vedo: ali so celice, ki jih aktivira ACh posebna vrsta celic; ali imajo holinergične sinapse in ali je reakcija na ACh odvisna od slučajnega položaja elektroforetske pipete na membrani, ki je občutljiva za ACh. Opazovanja Spehlmana, Kappa in Junga so nas prepričala v tehnično neoporečnost poskusov v tistih primerih, ko nismo mogli odkriti praktično nikake aktivnosti ChE v nekaterih celicah.

Danes še ne poznamo natančne funkcije posameznih retikularnih jeder; po Brodalu (1958) naj bi na splošno



celice lateralno ležečih jeder sprejemale kolaterale iz glavnih senzibilnih poti, od tod bi impulzi prehajali v centralna jedra, ki bi skrbela za posredovanje impulsov v smeri navzgor in navzdol. Kar se tiče povezave optične poti z retikularno formacijo, domneva Brodal, da je kaudalno pontino jedro ono, v katerem se končujejo kortiko-retikularna živčna vlakna in zato smo največ poskusov napravili ravno s celicami tega jedra. Podatki o velikem številu nevronov v retikularni formaciji govore o kompliciranem prenosu vzburjenja v tem področju. Krieg (1958) je v  $1 \text{ mm}^3$  možganskega tkiva iz kaudalnega pontinega jedra pri mački naštel 750 - 1250 nevronov, Scheibel in Scheibel (1958) pa v celi retikularni formaciji povprečno 3300 nevronov na  $\text{mm}^3$ . Številki sta si zelo blizu in povesta približno število nevronov, ki pa lahko variira od jedra do jedra. Poleg tega pa sodeluje pri sinaptičnem prenosu vzburjenja še neznano število izrastkov. Danes ne vemo, če so variacije v aktivnosti ChE odraz funkcije posameznih nevronov ali jeder retikularne formacije, za katero pa zopet ne vemo, če velike variacije v njeni spontani aktivnosti izvirajo v njej sami ali pa so odsev vstopajočih senzoričnih oziroma kortiko-retikularnih impulzov.

Drug pojav, ki nas je presenetil, je visok odstotek aktivnosti BChE v retikularnih celicah. Iz slike 5 vidimo, da se giblje procent aktivnosti BChE v različnih celicah med 18 in 27 % celotne aktivnosti ChE. Ta podatek lahko primerjamo z razmerjem BChE : ChE v homogenatih možganov pri podgani, kjer pa so pri večini avtorjev številke za BChE nižje. Tako je Davison (1953) našel pri podgani v celotnih možganih razmerje 1 : 8,4;



Pavlin in Thompson (1961) pa nekoliko višje 1 : 6 - 7. Clouet in Waelch (1961) sta v homogenatih celotnih možganov podgane našla, da zavzema BChE 21,5, AChE pa 43 % celotne aktivnosti ChE (vsota ne znese 100 %, ker sta uporabljala različne koncentracije substratov). Thompson (1952) je našel v sivi 6 %, v beli pa 50 % od celotne aktivnosti ChE za BChE. Ord in Thompson (1952) nista mogla najti v možganih področij brez BChE. Tako je aktivnost AChE v sivi zavzemala 75 % celotne hidrolize ACh, v beli pa 37 %. Pri človeku so v raznih kortikalnih poljih Foldes in sodelavci (1962) našli tale razmerja v aktivnosti: 10 - 22 % BChE nasproti 90 - 78 % AChE. Našim rezultatom so najbližja opazovanja Abrahamsa in Ederyja (1964), ki sta s histokemično tehniko našla BChE v celičnih telesih, AChE pa tudi v glii, s čimer sta precej zamajala klasično trditev Bülbbringove in sodelavcev (1951), da je BChE v glii, AChE pa v celicah. Avtorja sta našla živčne celice v talamičnih jedrih, ki so bile bogate z BChE, v drugih regijah pa je bila BChE lokalizirana v membranah živčnih celic, katerih citoplazma je bila brez ChE. V zvezi s funkcijo hemato-encefalne bariere je zanimiv podatek, da sta ob stenah tretjega ventrikla našla le BChE ne pa AChE. Avtorja sta zaključila, da opravlja ChE v možganih različne funkcije in ni zado- sti, če učinke inhibitorjev ChE razlagamo samo z učin- ki na holinergične nevrone - trditev, ki najbrž velja tudi za naše preiskavanje vplivov LSD na ChE v zvezi s psihičnimi učinki LSD.

V retikularni formaciji se aktivnost ChE ocenje- vali le s histokemično tehniko. Koelle (1955) je našel le smerno aktivnost AChE v retikularni formaciji pod-

gane. Teocharev (1960) je s histokemično tehniko ocenjeval aktivnost BChE in našel le majhno aktivnost v nekaterih jedrih možganskega debla ter v ventralnem delu retikularne formacije. Koelle (1954) in Goldberger (1961) sta našla BChE predvsem v glii in kapilarnih stenah.

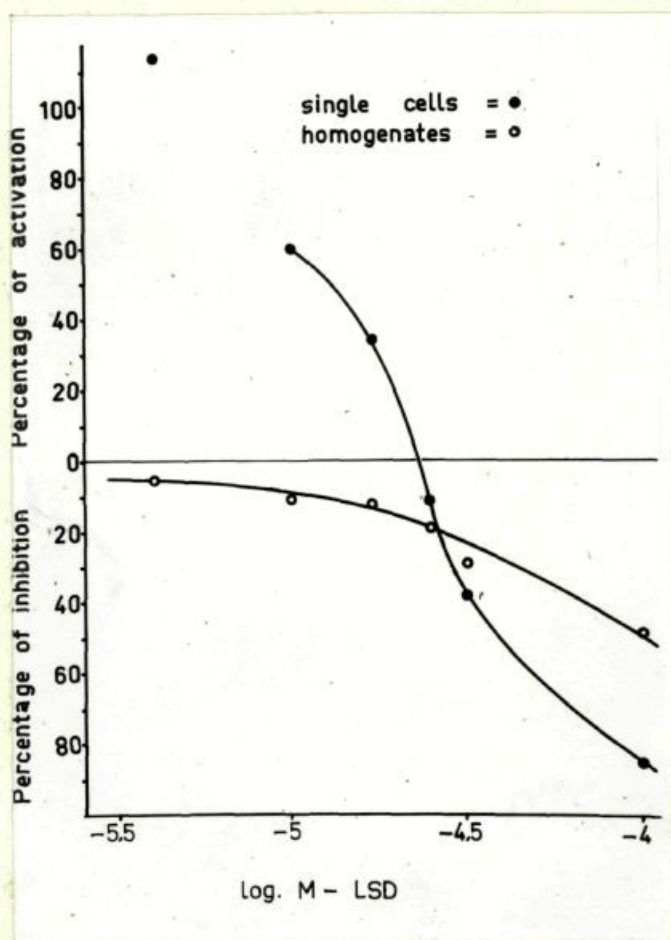


Diagram 26. Učinek LSD na aktivnost ChE v homogenatih celotnih možganov in posameznih živčnih celicah kvadalnega pontinega jedra izražen v procentih od kontrole. Vrednosti so povprečje 2 - 5 merjenj; pri  $10^{-5,4}$  M LSD smo merili samo enkrat.



Na nekaterih izoliranih živčnih celicah smo izmerili tudi vpliv LSD in atropina na aktivnost ChE. LSD je povzročil dva zanimiva učinka na aktivnost ChE posameznih živčnih celic v spodnjem pontinem jedru. V koncentraciji 0,1 mM je skoraj popolnoma zavrl aktivnost ChE, medtem ko je pri koncentracijah nižjih od  $2 \times 0,01$  mM aktiviral ChE. Diagram 26. Dvema podganama smo injicirali podkožno LSD 3,3 mg/kg, živali smo žrtvovali pol ure po injekciji; aktivnost ChE v izoliranih retikularnih celicah ni bila spremenjena.

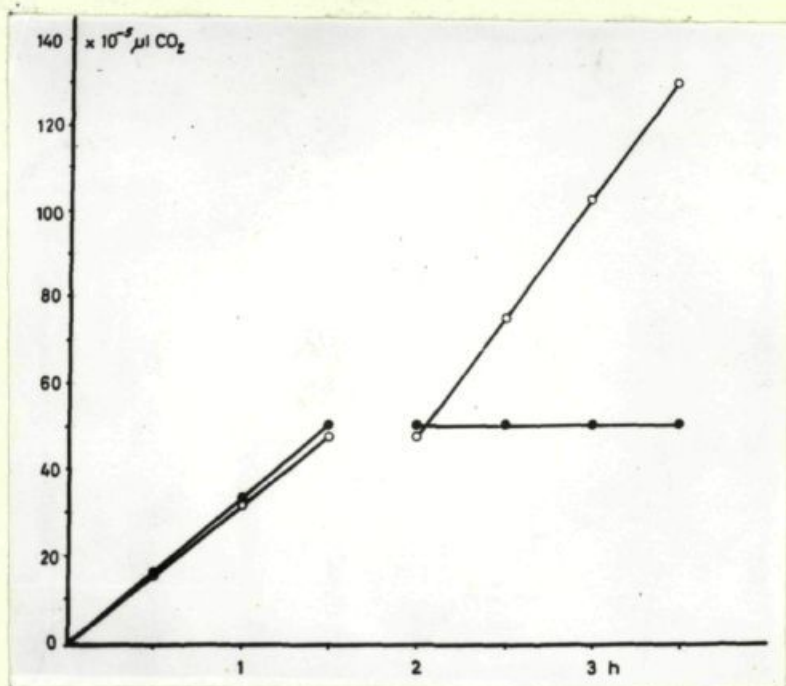


Diagram 27. Aktivnost ChE v dveh celicah iz kaudalnega pontinega jedra. Prekinitev črte pomeni dodatek inhibitorja; celica, označena s celimi krogi, je dobila LSD 0,1 mM; celica, označena s praznimi krogi pa LSD 0,01 mM.

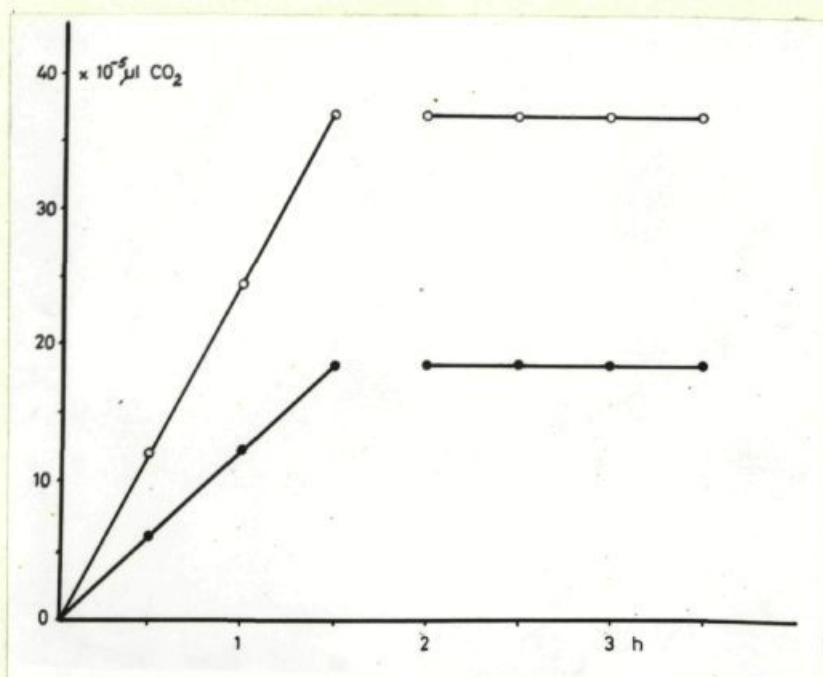


Diagram 28. Aktivnost BChE v dveh celicah spodnjega pontinega jedra. Prekinitev črte pomeni dodatek inhibitorja - obema celicama je bil dodan LSD 0,01 mM.

Zaradi velikih variacij v aktivnosti ChE med celicami istega jedra navajamo še podatke za posamezno merjenje (Tabela 12). Diagram 27 in 28 nam pokažeta rezultat poskusa, ko smo isti celici zamenjali inkubacijsko tekočino, prva je bila brez LSD, druga pa z LSD. Rezultati so nedvoumni: na diagramu 27 vidimo inhibicijo ChE z LSD 0,1 mM in lahne aktivacije z LSD 0,01 mM; LSD v istih koncentracijah pa popolnoma inhibira BChE (Diagram 28).

Orientacijski poskusi z atropinom so pokazali, da atropin 1 mM popolnoma zavre aktivnost celotne ChE (ACh 3 mM), AChE (MCh 3 mM) in BChE (BuCh 10 mM). Z atropinom 0,1 mM imamo samo štiri izmerjene celice:



Tabela 12. Učinek LSD na aktivnost ChE posameznih živčnih celic kavalnega pontinega jedra. Aktivnost je izražena v  $\mu\text{l} \times 10^{-4} \text{CO}_2/\text{posamezno celico/hr}$ .

Koncentracija LSD						
0	$10^{-4}$ M	$3 \times 10^{-5}$ M	$2,5 \times 10^{-5}$ M	$1,7 \times 10^{-5}$ M	$10^{-5}$ M	$4 \times 10^{-6}$ M
-	0,30	2,48	5,90	9,50	6,20	16,32
-	0,48	4,92	6,80	10,90	12,62	
-	1,62	5,30	7,60		12,90	
-	2,20	6,18			15,78	
Povprečne vrednosti $8 \pm 0,6$ $1 \pm 0,4$ $5 \pm 0,8$ $7 \pm 0,5$ $10 \pm 0,4$ $12 \pm 1,6$ $16,32$						
± SNP						

atropin je znižal aktivnost ChE v celicah kavdalnega pontinega jedra za ca. 30 %.

Aktivacijski vpliv LSD na aktivnost ChE, prikazan v diagramu 26, ima mogoče nek pomen v zvezi z možnostjo, da bi LSD kot psihosomimetska snov deloval že v nivoju retikularne formacije - možnost, ki smo jo omenili zgoraj. Samo iz navedenih podatkov tega seveda še ne moremo zaključiti, čeprav bi nas pri tem najbrž podprl French, ki trdi, da naj bi snovi, ki sprožijo psihosomimetske učinke, delovale tako, da vzburjajo retikularno formacijo (French, 1960). Ravno tako ne moremo zaključiti, da bi bila elektrofiziološka opazovanja z LSD v nivoju retikularne formacije v zvezi z aktivacije ali inhibicije ChE. Nadaljnje delo v tej smeri bo mogoče pokazalo, če lahko psihične učinke LSD pripisujemo spremenjeni aktivnosti ChE v retikularni formaciji.

#### Aktivnost holinesteraz v možganskem deblu in optični poti pri človeku

Izmerili smo tudi aktivnost AChE, BChE in celotne ChE v retikularni formaciji človeka. Vzorce tkiva smo jemali iz področij, ki približno ustrezajo retikularnim jedrom, katera smo preučevali pri podgani. Našli smo aktivnost, ki je prikazana na tabeli 13.

Aktivnost ChE sta merila v raznih regijah človeških možganov tudi Ord in Thompson (1952), nista pa merila v retikularni formaciji. Če primerjamo naše rezultate s njunimi, potem bi retikularna formacija glede na aktivnost ChE spadala med manj aktivna področja (za nucleus lenticularis > nucleus caudatus >



substantia nigra > cerebellum), pač pa v vrsto s talamusom in rdečim jedrom. Aktivnost AChE je v naših rezultatih le 30 % celotne aktivnosti ChE, Ord in Thompson pa sta v vseh področjih dobila več kot 50 %; analogno razmerje za BChE nasproti ChE v naših poskusih je 20 % : 100 %, ne moremo ga pa primerjati s podatki angleških avtorjev, ki sta imela različna substrata in njihove koncentracije.

V istih možganih, kjer smo merili aktivnosti AChE, BChE in celotne ChE v retikularni formaciji, smo izmerili tudi aktivnost teh encimov v drugih področjih (Tabela 14) in ugotovili, da so aktivnosti AChE, BChE

Tabela 13. Aktivnost AChE, BChE in celotne ChE ( $\mu\text{l CO}_2/\text{g/hr}$ ) v retikularni formaciji pri človeku in procent inhibicije s LSD in vitro.

Substrat (mM)	Brez inhibitorja	Procent inhibicije s LSD (10 $\mu\text{M}$ ) (n = 4)
MCh 3,0	902	15
BuCh 10,0	575	57
ACh 3,0	3028	13

in celotne ChE v retikularni formaciji enake kot v hrbtnem mozgu in da imajo odseki optične poti razen lateralnega genikularnega telesca povsod nižjo aktivnost kot je v retikularni formaciji.

Thompson, Tickner in Webster (1955) so izmerili inhibitorski vpliv LSD na aktivnost ChE pri človeku. Z LSD v isti koncentraciji kot je bila naša in v podobni



Tabela 14. Hidroliza ACh, MCh in BuCh ( $\mu\text{l CO}_2/\text{g/hr}$ ) v raznih področjih istih človeških možganov in procent inhibicije z LSD (10  $\mu\text{M}$ ).

	ACh 3,0 mM	LSD Procent inhibicije	MCh 3,0 mM	LSD Procent inhibicije	BuCh 10,0 mM	LSD Procent inhibicije
Retik. formacija	3028	13	902	15	575	57
Hrbtni mozeg	3000	15	990	17	608	58
Lat.genik.telesce	3621	10	1217	17	640	48
Frontalni reženj	960	16	357	15	470	54
Vidni živec	533	28	160	8	434	57
Optična skorja	857	21	335	17	484	50

koncentraciji tudi BuCh (15 mM) se v raznih področjih našli povprečno inhibicije 63 % (44 - 76 %), ki se dobro ujema s procentom, ki smo ga našli za retikularno formacijo. Podatkov za AChE in ChE pa ne moremo primerjati, ker ne navajajo koncentracij substratov, površna ocenitev pa pokaže večji procent inhibicije v naših poskusih. V področjih, kjer smo merili vpliv LSD na aktivnost ChE, smo dobili povsod precej podoben procent inhibicije in vitro.

#### Pomen adrenergičnega sistema pri delovanju LSD na pogojne reflekse

Zanimivo bi bilo videti vpliv LSD in drugih psihotropnih snovi tudi na drug mediatorski sistem v centralnem živčevju, to je adrenergični. Od kar je Vogt (1954)



izmerila nor-adrenalin v posameznih poljih centralnega živčevja in od kar je znana približna lokalizacija MAO v centralnem živčevju (Arioka in Tanimukai, 1957), upoštevajo fiziološki in farmakološki delavci vedno bolj tudi morebitno dejavnost adrenergičnega sistema pri višjem živčnem delovanju.

Mnoge psihotropne snovi npr. 5-HT, meskalin in amfetamin so bodisi substrati bodisi inhibitorji MAO. Tudi nekateri derivati ergota so inhibitorji MAO (Orzechowski, 1941). V poskusih in vitro LSD ne inhibira, niti ne aktivira MAO v možganskem tkivu pri substratih Ty in 5-HT (Cerletti, 1956; Pavlin, 1957), pač pa jo inhibira IIH, ki pa sproži psihične učinke pri človeku le v hudih dozah. IIH je inhibitor MAO in vitro ter in vivo, njegova  $I_{50}$  in vitro (Ty 10 mM) je 10  $\mu$ M, za 5-HT pa okoli 200  $\mu$ M (Tabela 15). Če smo podganam

Tabela 15. Inhibicija MAO podganjih možganov z IIH in vitro.

Substrat (mM)	Molarna koncentracija in procent inhibicije			
	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	
Ty 10,0	78	63	50	Naši poskusi
5-HT 10,0	95	35	0	Canal in Maffei-Faccioli (1959)

injicirali IIH 25 mg/kg podkožno, smo izmerili 90 % inhibicije MAO v homogenatih možganov. Ta podatek se ujema z Zellerjevim (1958) ter rezultati Canala in Maffei-Facciolija (1959). V poskusih s pogojnimi refleksi smo zato podganam injicirali IIH 25 mg/kg in opazovali pogojne reflekse. Niso se spremenili niti reakcijski

časni niti število pogojnih refleksov. Ista doza IIH tudi ni spremenila učinkovanja LSD na pogojne reflekse (Diagram 29).

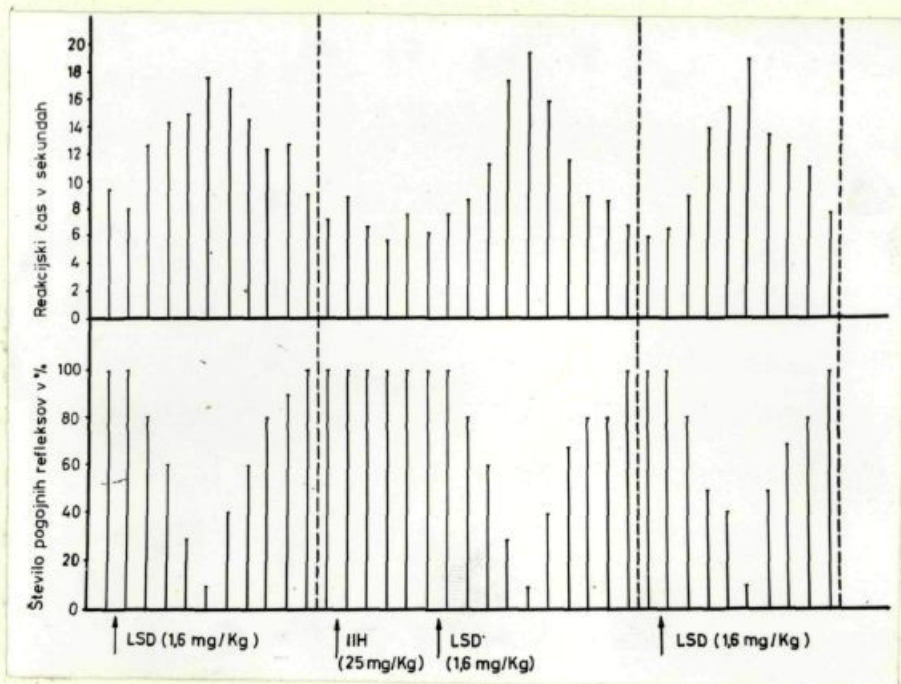


Diagram 29. Vpliv LSD ter IIH in LSD na pogojne reflekse. Legenda kot pri diagramu 3.

Vzrok za to bi bilo lahko počasno prehajanje IIH skozi hemato-encefalno bariero, vendar nista Horisberger in Grandjean (1958) z IIH 100 mg/kg niti v akutnem poskusu niti po 24 urah opazila nobene signifikantne spremembe pogojnih refleksov pri podgani, čeprav sta uporabljala isto tehniko kot je naša. Obratno pa so Fletscher, Steiner in Voelkel (1958) s tehniko skoka na palico pri IIH 100 mg/kg intraperitonealno opazili zavor pogojnih refleksov, ki se je začel v tretji uri



po injiciranju in bil maksimalen v šesti uri. Acheson in sodelavci (1961) so napravili kronični poskus, tako da so podganam priučenim plezanja po vrvi injicirali pet tednov po 100 mg/kg IIH na dan podkožno. Prva dva tedna je bilo plezanje takih živali popolnoma dezorganizirano, kasneje se je uredilo, vendar so bili časi plezanja daljši kot pri kontrolni živali. Nekatere živali so postale v tretjem tednu hiperaktivne in divje ter niso uživale hrane.

IIH je različno učinkoval, vendar je bil različen tudi način aplikacije IIH ali pa interval med aplikacije in testiranjem na pogojne reflekse. Davison (1958) meni, da mora IIH porabiti nekaj ur, da premaga neko intracelularno bariero in pride do mitohondrijev, kjer je MAO skoncentrirana. Zato pa je delovanje dolgotrajno, tako doseže MAO po eni sami dozi IIH šele čez deset dni prvotne aktivnost, aktivnost v možganih pa je tedaj dosegla šele 66 % prvotne aktivnosti (Canal, Maffei-Faccioli, 1959). Subcelularno lokalizacije MAO sta posebno raziskavala Rodriguez de Lores Armeiz in de Robertis (1962), ker ju je zanimala morebitna funkcija MAO v sinaptičnem prenosu. Avtorja sta ugotovila, da MAO ni lokalizirana v sinaptičnih membranah ali mehurčkih neholinergičnih živčnih končičev, pač pa v mitohondrijih in menita: če MAO le ima kakšno funkcijo v adrenergičnih sinapsah, potem je ta verjetno drugačna od one, ki jo ima AChE v holinergičnih sinapsah.

Nair, Lal in Roth (1962) so z radioaktivnim IIH razčistili uganko zakasnelega delovanja IIH. Ugotovili so, da IIH naglo vstopa v možganske celice, da pa se v celici najprej spremeni v aktivno obliko izopropilhidrazin, ki šele inhibira MAO v mitohondrijih.



V naših poskusih kljub inhibirani MAO ni nikakih sprememb na pogojnih refleksi. Zaradi inhibicije MAO se kopičita v možganih 5-HT in dopamin. Preskusili so tudi vpliv teh snovi samih na pogojne reflekse in niso našli skladnih rezultatov; močnega inhibitornega delovanja vsekakor ni (Herz, 1960), vendar pa 5-HT prepreči učinkovanje LSD na pogojne reflekse (Winter in Flataker, 1956). Burkard, Pavlin in Pletscher (1962) so preskusili vpliv LSD in drugih psihotropnih snovi na sintezo 5-HT in dopamina v podganjih možganih. Niso našli praktično nikake inhibicije ustreznih dekarboksilaz z LSD (1,3 in 2,0 mg/kg), meskalinom, morfinom, pilocibinom, bufoteninom, reserpinom, ITH, klorpromazinom in amfetaminom.

Tabela 16. Aktivnost MAO v homogenatih človeških možganov ( $\mu\text{l O}_2/\text{g/hr}$ ). Substrat: Ty 10 mM.

	Poraba kisika	Povprečna aktivnost $\pm$ SNP
Retikularna formacija	229	
	229	
	211	222 $\pm$ 4,0
	210	
	228	
	227	
Optična skorja	66	
	75	66 $\pm$ 5,5
	56	



Do nedavnega so retikularne nevrone imeli za adrenergične (pregled Killam, 1962). Nekateri elektro-fiziologi (Bradley in Mellica, 1958) so menili, da je samo retikularna formacija mesto delovanja amfetamina in verjetno tudi drugih aminov. Uničenje večine retikularne formacije je preprečilo vzdramljenje, ki ga sicer sprožijo amini (Killam, 1962). Vendar so Weilmalherbe in drugi (1961) s triciliranim adrenalinom in nor-adrenalinom ugotovili, da obe snovi komaj vstopata v možgansko tkivo razen v hipotalamusu. Tako bi šele hipotalamična polja, občutljiva za spremembe nivoja adrenergičnih snovi, vplivala na aktivnost retikularne formacije (Killam, 1962). Mi nismo merili aktivnosti MAO v izoliranih živčnih celicah retikularne formacije, pač pa nam je nekaj orientacijskih merjenj s homogenati človeških možganov dalo podatke, ki kažejo nekajkrat večjo aktivnost MAO v retikularni formaciji kot v optični skorji (Tabela 16).

Is gornjih rezultatov lahko rezimiramo:

- da LSD ne inhibira MAO v homogenatih podganjih možganov,
- da IIH inhibira MAO v homogenatih podganjih možganov, vendar v akutnem poskusu ne spremeni poteka pogojnih refleksov in
- da IIH ne spremeni učinkovanja LSD na pogojne reflekse.

POVZETEK REZULTATOV<sup>†</sup>

1. LSD zavira pogojne reflekse in podaljšuje reakcijski čas celo v dozi 0,16 µg/kg.
2. Učinki LSD in nekaterih drugih inhibitorjev na aktivnost holinesteraz v homogenatih možganov. Koncentracije substratov: BuCh 10 mM, MCh 3 mM.

Inhibitor	I <sub>50</sub>	
	BChE	AChE
LSD	10 <sup>-4,7</sup>	10 <sup>-4</sup>
BOL	10 <sup>-4,8</sup>	10 <sup>-3,9</sup>
DPDA	10 <sup>-6</sup>	-
Atropin	10 <sup>-5</sup>	-
BW284051	-	10 <sup>-7</sup>

<sup>†</sup> Če ni drugače navedeno, veljajo podatki za podgano.



3. Procent inhibicije holinesteraz v homogenatih možganov po podkožnem injiciranju inhibitorja.

Inhibitor	Substrat	
	BuCh 10 mM	MOh 3 mM
LSD 3,2 mg/kg	28	6
BOL 4 mg/kg	24	-
DPDA 3,4 mg/kg	50	-
Atropin 5 mg/kg	16	-
BW284C51 0,57 mg/kg	-	24

4. Vplivi raznih inhibitorjev na pogojne reflekse in na delovanje LSD oziroma BOL na pogojne reflekse.

Inhibitor	Doza/kg	Vpliv na pogojne reflekse	Vpliv na delovanje LSD na pogojne reflekse	Vpliv na delovanje BOL na pogojne reflekse
DPDA	0,0034-3,4 mg	ne vpliva	popolnoma zavre	ne vpliva
Atropin	0,29 - 29 mg	ne vpliva	ne vpliva	ne vpliva
BW284C51	0,57 mg	ne vpliva	ne vpliva signifikantno	-
BOL	2 mg	vpliva	-	-
IIH	25 mg	ne vpliva	ne vpliva	-

5. Istočasno injicirana DPDA (3,4 mg/kg) in LSD = zmanjšanje učinkovanja različnih doz LSD na pogojne reflekse. Istočasno injicirana BW284C51 (0,57 mg/kg) in LSD = ni sprememb v učinkovanju LSD na pogojne reflekse.

6. Razredčevanje homogenatov možganov, ki vsebujejo inhibitorje injicirane podkožno, znižuje procent inhibicije AChE z BW284C51, ne pa z LSD (Diagram 23).

7. Aktivnost holinesteraz v izoliranih živčnih celicah retikularne formacije.

Retikularno jedro	nl CO <sub>2</sub> x 10 <sup>-5</sup> /celico/hr					
	ACh		BuCh		MCh	
	(3 mM)	n	(10 mM)	n	(3 mM)	n
pontino oralno	87	26	24	5	38	12
pontino kavdalno	76	29	14	4	-	-
gigantocelularno	73	10	19	4	-	-
parvocelularno	70	11	17	5	-	-
lateralno	22	8	6	3	15	3
Povprečno	65,6		16,5		26,5	

8. Aktivnost BChE smo dokazali v 96 % preiskanih celic retikularnih jeder iz gornje tabele, aktivnost AChE pa le v 66 %.

9. LSD inhibira aktivnost ChE v posameznih retikularnih celicah v dozah močnejših kot 10<sup>-4,6</sup> M, v šibkejših dozah pa je aktivira (Diagram 26).

10. Aktivnost ChE v posamezni celici ni sorazmerna z volumnom celice.



11. LSD  $10^{-5}$  M inhibira BChE (BuCh 10 mM) v retikularni formaciji človeških možganov za 57 %, AChE (MCh 3 mM) za 15 % in celotno ChE (ACh 3 mM) za 13 %.
12. Procent inhibicije BChE, AChE in celotne ChE z LSD v retikularni formaciji človeka je podoben procentu inhibicije v hrbtnem mozgu, frontalnem režnju, vidnem živcu, lateralnem genikularnem telescu in optični skorji.
13. LSD ne inhibira MAO podganjih in človeških možganov.
14. IIR inhibira MAO v homogenatih možganov ( $I_{50}$  pri  $10^{-5}$ ) pri Ty 10 mM.
15. V retikularni formaciji človeka je MAO.
16. LSD (2 mg/kg) ne inhibira aktivnosti dekarboksilaz pri sintezi dopamina in 5-HT.
17. Orientacijski poskusi: atropin  $10^{-3}$  M popolnoma zavre aktivnost BChE, AChE in celotne ChE v posameznih retikularnih celicah; atropin  $10^{-4}$  M zavre aktivnost ChE za 30 %.

## NAJVAŽNEJŠI ZAKLJUČKI

Pričujoče delo je poskus, da bi se približali mehanizmu delovanja LSD in nekaterih drugih psihotropnih snovi. Merili smo učinke teh snovi na pogojne reflekse pri podgani ter skušali najti morebitno zvezo med učinki na pogojne reflekse in aktivnostjo holinesteraz in MAO v takih možganih.

Najprej smo potrdili inhibitorni vpliv LSD na število pogojnih reflexov in na reakcijski čas ter našli najmanjšo učinkovito dozo (0,16 µg/kg). Vzporedno smo merili aktivnost BChE, AChE in celotne ChE v možganih podgane in ugotovili  $I_{50}$  za LSD in nekatere druge snovi. Podobno kot Zsigmond s sodelavci smo dobili mnogo večje inhibicije holinesteraz v nasprotju s Thompsonom, Ticknerjem in Websterjem.

Večino poskusov s pogojnimi refleksi smo delali pri dozi LSD 1,6 mg/kg in 3,2 mg/kg. Nekatero podgano smo žrtvovali tedaj, ko so bili učinki LSD najbolj izraziti in merili aktivnost BChE in AChE v takih možganih. Našli smo, da je bila aktivnost BChE zavrta za 25 % (pri LSD 3,2 mg/kg) in da AChE ni bila inhibirana. Vendar so ti podatki le približni, kajti presoja inhibicije encima in vivo je nezanesljiva predvsem zaradi učinka razredčitve na disociacijo kompleksa encim-inhibitor in morebitne sekundarne inhibicije in vitro. Poskuse smo nadaljevali tako, da smo opazovali učinke LSD pri zavrti BChE ali pa AChE. Če smo zavrti BChE z DPDA, LSDni imel nikakih učinkov na pogojne reflekse. Sam DPDA pa ni vplival na pogojne reflekse, čeprav je močno zavrl aktivnost BChE tako



in vitro kot in vivo. Ker je LSD močan inhibitor BChE, smo skušali razložiti ta pojav glede na lokalizacijo in funkcijo BChE v možganih. DPDA in LSD sta inhibitorja BChE. Prva snov preprečuje delovanje druge snovi na pogojne reflekse, torej mora biti neka zveza med aktivnostjo BChE in opisanimi pojavi. LSD inhibira najbolj BChE človeka, pri katerem so tudi psihični učinki najbolj izraziti in dolgotrajni, mnogo manj pa BChE podgane in miši, kjer so tudi psihični učinki manj izraziti in kratkotrajni (npr. pogojni refleksi). V tej zvezi je zanimivo, da smo našli praktično v vsaki posamezni živčni celici retikularne formacije aktivnost BChE.

Atropin, tipični inhibitor muskarinskih učinkov, ni vplival na pogojne reflekse, niti ni spremenil učinkovanja LSD; atropin je slab inhibitor BChE v možganih.

Selektivni inhibitor AChE, BW284C51, ni signifikantno vplival na učinkovanje LSD pri pogojnih refleksih. V dozi, ki smo jo uporabljali (0,57 mg/kg), BW284C51 sam ni spremenil pogojnih refleksov, inhibicija možganske AChE pa je vsaj 20 %. Našli smo, da se z razredčevanjem kompleksa AChE: BW284C51 znižuje tudi procent inhibicije encima, da pa se to ne zgodi pri razredčevanju kompleksa AChE: LSD, kar kaže, da se LSD praktično ireverzibilno veže na encim.

Za razliko od LSD so psihotropni učinki BOL minimalni. Križna toleranca med BOL in LSD kaže na to, da BOL in LSD tekujeta za isti receptor.

V zadnjih letih poudarjajo elektrofiziologi pomen retikularne formacije pri nastajanju pogojnega refleksa. Skušali smo podrobneje preučiti morebitni vpliv LSD na



pogojni dražljaj - svetlobo. vzdolž optične poti (nervus opticus, corpus geniculatum laterale, tractus opticus, cortex opticus, formatio reticularis) smo pri človeku in podgani jemali vzorce živčnega tkiva ter merili aktivnost ChE in vpliv LSD nanje. Med vzorci raznih področij ni bilo razlike v procentih inhibicije z LSD. Ker se retikularni odccep optične poti konča tudi v kaudalnem pontinem jedru, smo vzeli posamezne celice iz tega jedra in merili vpliv LSD na aktivnost holinesteraze. LSD jo je inhibiral v koncentracijah močnejših od  $10^{-4,6}$  M, v šibkejših koncentracijah pa jo je aktiviral. Aktivacija ChE s LSD v nizkih koncentracijah se dobro ujema z elektrofiziološkimi podatki. Tako je v akustični poti pri mački našel Purpura, da se zelo nizke doze LSD povzročale facilitacije, visoke doze pa inhibicijo kortikalnega odgovora. Da bi dobili jasnejšo sliko o delovanju LSD na ChE vidne poti, bi bilo potrebno med drugim izmeriti še aktivnost ChE in vpliv LSD v retini, posameznih celicah lateralnega genikularnega telesca in možganski skorji.

Če smo v posameznih živčnih celicah določali aktivnost AChE, je v 34 % nismo mogli zaslediti, medtem ko smo praktično v sleherni živčni celici petih retikularnih jeder našli aktivno BChE. Tudi ta podatek kaže, da ima BChE važenjši pomen, kot se ponavadi misli.

IIH, inhibitor MAO, v akutnem poskusu ni vplival na pogojne reflekse, niti ni spremenil delovanja LSD na pogojne reflekse.

Iz pričujočega dela ne moremo zaključiti, da deluje LSD na pogojne reflekse samo tako, da inhibira



ali aktivira možganske ChE. Z druge strani pa naši rezultati vendarle kažejo na zvezo med delovanjem LSD in nekaterih drugih psihotropnih snovi ter ChE, podatek z aktivacije ChE v posamezni celici pa kaže, da bi bilo treba poiskati še druga področja, kjer deluje LSD. Pojav halucinacij po LSD kaže tudi na desinhibitorno komponento, vendar še vedno premalo poznamo inhibicijo samo, da bi mogli napraviti jasne zaključke. Za uspešnejše nadaljevanje zadane naloge bo najbrž treba uporabiti nove mikrotehnike (elektroforetska pipeta), nadaljevati delo s že vpeljanimi (mikrogazometrične tehnike) in upoštevati način delovanja psihotropnih snovi na ustrezne encime.

LITERATURA

- ABRAHAMS, V. C. in EDERY, H. (1964). Brain stem electrical activity and the release of acetylcholine. Objavljeno v: Topics in basic neurology, p. 26 - 36. Izdala Bergmann, W. in Schadé, J. P. Amsterdam: Elsevier.
- ACHESON, R. M., COLE, J., DEARNALEY, D. P. in GLEES, P. (1961). Some effects on performance and behaviour of the daily administration of amine oxidase inhibitors in trained rats. Objavljeno v: Neuro-psychopharmacology, p. 139 - 141. Izdal Rothlin, E. Amsterdam: Elsevier.
- APTER, J. T. in PFEIFFER, C. C. (1957). The effect of the hallucinogenic drugs LSD-25 and mescaline on the electroretinogram. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 508 - 514.
- ARIOKA, I. in TANIMUKAI, H. (1957). Histochemical studies on monoamine oxidase in the mid-brain of the mouse. J. Neurochem. 1, 311 - 315.
- ARNOLD, O. H., HOFMANN, G. in LEUPOLD-LÖWENTHAL, H. (1958). Untersuchungen zum schizophrenieproblem mit C<sup>14</sup>-markiertem  $\alpha$ -Lysergsäurediäthylamid und C<sup>14</sup>-markierter Bernsteinsäure. Objavljeno v: Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung. III. Band. München: Urban & Schwarzenberg.
- AUGUSTINSSON, K. B. (1948). Cholinesterases. Acta physiol. scand. 15, suppl. 52.



- AUGUSTINSSON, K.-B. (1955). The normal variation of human blood cholinesterase activity. *Acta physiol. scand.* 35, 40 - 51.
- BÄTTIG, K. in GRANDJEAN, E. (1957). Der zeitliche Ablauf einer bedingten Fluchtreaktion bei der Ratte. *Arch. exp. Path. Pharmac.* 211, 119 - 132.
- BÄTTIG, K. in GRANDJEAN, E. (1959). Beziehung zwischen Alter und Erlernen einer bedingter Fluchtreaktion bei der weissen Ratte. *Gerontologia* 3, 266 - 276.
- BAYLISS, B. J. in TODRICK, A. (1956). The use of a selective acetylcholinesterase inhibitor in the estimation of pseudocholinesterase activity in rat brain. *Biochem. J.* 62, 62 - 67.
- BENNETT, E. L., ROSENZWEIG, M. R., KRECH, D., KARLSSON, H., DYE, N. in OHLANDER, A. (1958 a). Individual strain and age differences in cholinesterase activity of the rat brain. *J. Neurochem.* 3, 144 - 152.
- BENNETT, E. L., KRECH, D., ROSENZWEIG, M. R., KARLSSON, H., DYE, N. in OHLANDER, A. (1958 b). Cholinesterase and lactic dehydrogenase activity in the rat brain. *J. Neurochem.* 3, 153 - 160.
- BENNETT, E. L., KRECH, D. in ROSENZWEIG, M. R. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain cholinesterase and brain anatomy in the rat. *Acta neurol. scand.* 38, suppl. 1, 57 - 58.



- BENNETT, E. L., KRECH, D. in ROSENZWEIG, M. R. (1963). Effects of environmental complexity and training on acetylcholinesterase and cholinesterase in rat brain. *Fed. Proc.* 22, 1041.
- BLOUGH, D. S. (1957). Some effects of drugs on animal discrimination in the pigeon. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 66, 733 - 739.
- de BOOR, W. (1956). *Pharmakopsychologie und Psychopathologie*. Springer Verlag, Berlin.
- BRADLEY, P. B. in ELKES, J. (1958). The distribution of cholinergic and non-cholinergic receptors in the brain: electrophysiological evidence. Objavljeno v: *Metabolism of the nerve system*. p. 515 - 522. Oxford: Pergamon Press.
- BRADLEY, P. B. in KEY, B. J. (1958). The effect of drugs on arousal responses produced by electrical stimulation of the reticular formation of the brain. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 10, 97 - 110.
- BRADLEY, P. B. in MOLLICA, A. (1958). The effect of adrenaline and acetylcholine on single unit activity in the reticular formation of the decerebrate cat. *Arch. ital. Biol.* 96, 168 - 186.
- BRATTGARD, S.-O. in HYDÉN, H. (1952). Mass, lipids, pentose nucleoproteins and proteins determined in nerve cells by X-ray microradiography. *Acta radiol.* 37, suppl. 94.



- BRODAL, A. (1958). The reticular formation of the brain stem. Edinburgh: Oliver and Boyd.
- BRZIN, M. in ZEUTHEN, E. (1961). Quantitative evaluation of the thiocholine method for cholinesterase as applied to single end-plates from mouse gastrocnemius muscle. Comp. rend. trav. Lab. Carlsberg 32, 139 - 153.
- BURGEN, A. S. V. in HOBBIER, F. (1951). The inhibition of cholinesterases by alkylphosphates and alkyl-phenolphosphates. Brit. J. Pharmacol. 6, 593 - 605.
- BURKARD, W. P., PAVLIN, R., PLETSCHER, A. in GEY, K. F. (1962). Effect of psychotropic drugs on decarboxylase of aromatic aminoacids in rat brain. Int. J. Neuropharmacol. 1, 233 - 237.
- BÜLBRING, E., PHILPOT, F. J. in BOSANQUET, F. D. (1953). Amine oxidase, pressor amines, and cholinesterase in brain tumors. Lancet 264, 865 - 866.
- CANAL, N. in MAFFEI-PAGGIOLI, A. (1959). Aspects of monoamine oxidase inhibition by isopropylisocotinylnyl-hydrazide. Objavljene v: Neuro-psychopharmacology, 288 - 290. Izdali Bradley, P. B., Deniker, P. in Radouco-Thomas, C. Amsterdam: Elsevier.
- CARLSON, V. R. J. (1958). Effect of lysergic acid diethylamide (LSD-25) on the absolute visual threshold. J. Comp. Physiol. Psychol. 51, 58. Cit. v: Ostfeld, A. M. (1961). Effects of LSD 25 and JB 318 on tests of visual and perceptual functions in man. Fed. Proc. 20, 876 - 883.



- CERLETTI, A. (1956). Lysergic acid diethylamide (LSD) and related compounds. Objavljeno v: Neuropharmacology, p. 9 - 84. Izdal Abramson, H.A. New York: Josiah Macy, Jr. Foundation.
- CLOUET, D. H. in WAELSCH, H. (1961). Amino acid and protein metabolism of the brain. VIII. J. Neurochem. 3, 201 - 215.
- COLLMAN, W. S. (1954). Cit. v: Everts, E. V. (1957). A review of the neurophysiological effects of lysergic acid diethylamide (LSD) and other psychotomimetic agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 479 - 495.
- COOK, L., WEIDLEY, E. F., MORRIS, R. F. in MATTIS, P. A. (1955). Neuropharmacological and behavioral effects of chlorpromazine (Thorazine hydrochloride). J. Pharmacol. 113, 11.
- COOK, L. in WEIDLEY, E. (1957). Behavioral effects of some psychopharmacological agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 740 - 752.
- COOK, L. in KELLEHER, R. T. (1961). The interaction of drugs and behavior. Objavljeno v: Neuro-psychopharmacology. Vol. 2, p. 77. Izdal Rothlin, E. Amsterdam: Elsevier.
- CURTIS, D. R., RYALL, R. V. in WATKINS, J. C. (1963). Cholinergic transmission in the central nervous system. Biochem. Pharmacol. 12, suppl. 52.
- DAVISON, A. N. (1953). Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds. 1. Biochem. J. 54, 583 - 590.



- DAVISON, A. N. (1955). Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds. 2. *Biochem. J.* 60, 339 - 346.
- DAVISON, A. N. (1958). Physiological role of monoamine oxidase. *Physiol. Rev.* 38, 729 - 747.
- DESMEDT, J. E. in LA GRUTTA, G. (1957). The effect of selective inhibition of pseudocholinesterase on the spontaneous and evoked activity of the cat's cerebral cortex. *J. Physiol.* 136, 20 - 40.
- DENISENKO, P. P. (1961). The influence of some pharmacological agents on the cholinergic and adrenergic systems of the reticular formation and some other parts of the brain. *Biochem. Pharmacol.* 8, 106.
- ELKES, J. (1957). Effects of psychomimetic drugs in animals and man. *Objavljeno v: Neuropharmacology*, p. 205 - 297. Izdal Abramsen, H. A. New York: Josiah Macy, Jr. Foundation.
- EVARTS, E. V., LANDAU, W., FREYGANG, W. H. JR. in MARSHALL, W. H. (1955). Some effects of lysergic acid diethylamide and bufotenine on electrical activity in the cat's visual system. *Amer. J. Physiol.* 182, 594 - 598.
- FOLDES, F. P., ZSIGMOND, E. K., FOLDES, V. M. in ERDOS, E. G. (1962). The distribution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the human brain. *J. Neurochem.* 9, 559 - 572.
- FREDRIKSSON, T. (1957). Pharmacological properties of fluoro-phosphorylcholines. *Acta physiol. scand.* 42, suppl. 145, 47.

- FREEDMAN, D. X., AGHAJANIAN, G. H. in ORNITZ, E. M. (1958). Patterns of tolerance to lysergic acid diethylamide and mescaline in rats. *Science* 127, 1173 - 1174.
- FRENCH, J. D. (1960). The reticular formation. Objavljeno v: *Neurophysiology*. Vol. 2. p. 1281 - 1305. Izdali Field, J., Magoun, H. V. in Hall, V. E., Washington: Am. Physiol. Soc.
- FUNDENBURK, W. H. in CASE, T. J. (1947). *J. Neurophysiol.* 10, 179 - 188, cit. v: Michelson, M. J. (1961). Pharmacological evidences of the role of acetylcholine in the higher nervous activity of man and animals. *Acta nerv. sup.* 3, 140 - 147.
- GADDUM, J. H. (1961). Antagonism between drugs. Objavljeno v: *Neuro-psychopharmacology*, Vol. 2. p. 19 - 24. Izdal Rothlin, E. Amsterdam: Elsevier.
- GANTT, W. H. (1952). The conditioned reflex function as an aid in the study of the psychiatric patients. Objavljeno v: *Proc. 40<sup>th</sup> Ann. Meeting Am. Psychopathol. Assoc.* New York: Grune Stratton.
- GASTAUT, H. (1957). The role of reticular formation in establishing conditioned reactions. Objavljeno v: *Reticular formation of the brain*, p. 561 - 580. Izdal Jasper, H. H. in drugi. Boston: Little, Brown & Co.
- GASTAUT, H. (1958). Some aspects of the neurophysiological basis of conditioned reflexes on behaviour.



Objavljeno v: Ciba Foundation Symposium on the Neurological Basis of Behaviour, p. 255 - 276, London: Churchill Ltd.

- GELLHORN, E., KESSLER, M. in MINATOYA, H. (1942). Influence of metrazol, insulin-hypoglycemia and electrically induced convulsions on reestablishment of inhibited conditioned reflexes. Proc. Soc. exp. Biol. 50, 260 - 262.
- GIACOBINI, E. (1957). Quantitative determination of cholinesterase in individual sympathetic cells. J. Neurochem. 1, 234 - 244.
- GIACOBINI, E. (1959). Quantitative determination of cholinesterase in individual spinal ganglion cells. Acta physiol. scand. 45, 238 - 254.
- GIACOBINI, E. in HOLMSTEDT, B. (1958). Cholinesterase content of certain regions of the spinal cord as judged by histochemical and cartesian diver technique. Acta physiol. scand. 42, 12 - 27.
- GOGERTY, J. H. in DILLE, J. M. (1955). Tolerance to the pyrotogenic effects of lysergic acid diethylamide. J. Pharmacol. 116, 450 - 452.
- GOLDBERGER, M. (1961). The effects of lysergic acid diethylamide (LSD-25) upon the histochemical reactions for cholinesterase in the central nervous system. Acta anat. 46, 185 - 191.
- GOODMAN, L. S. in GILMAN, A. (1955). The pharmacological basis of therapeutics. Macmillan Co., New York.

- HARRIS, L. S. (1961). The effect of various anticholinergics on the spontaneous activity of mice. *Fed. Proc.* 20, 395.
- HASLETT, W. L., GEORGE, R. in JENDEN, D. J. (1963). Evidence for muscarinic receptors in the mid-brain reticular formation. *Fed. Proc.* 22, 214.
- HAWKINS, R. D. in GUNTER, J. M. (1946). Studies on cholinesterases. 5. The selective inhibition of pseudo-cholinesterase in vivo. *Biochem. J.* 40, 192 - 197.
- HEATH, D. F. (1961). Organophosphorus poisons. Oxford: Pergamon Press.
- HERZ, A. (1960). Drugs and the conditioned avoidance response. Objavljeno v: *International Review of Neurobiology*. Vol. 2, p. 229 - 279. Izdala Pfeiffer, C. C. in Smythies, J. R. New York: Academic Press.
- HIMMWICH, H. E. in RINALDI, F. (1957). The effect of drugs on the reticular system. Objavljeno v: *Brain mechanisms and drug action*, p. 15 - 44. Izdal Fields, V. S., Springfield: Charles C Thomas.
- HOFFMANN, A. (1959). Psychotomimetic drugs. *Acta physiol. pharm. neerl.* 8, 240 - 258.
- HOLTZ, P., BALZER, H. in WESTERMANN, E. (1958). Beeinflussung der Narkosedauer durch Hemmung der Cholinesterase des Gehirns. *Arch. exp. Path. Pharmak.* 233, 438 - 467.



- HORISBERGER, B. in GRANDJEAN, E. (1958). Über die Wirkung von Reserpin und von Isopropyl-Isonicotinsäurehydrazid (Marsilid) auf eine konditionierte Fluchtreaktion der Ratte. *Helv. physiol. acta.* 16, 146 - 151.
- HÜGIN, W. (1947). Das subjective Erlebnis im Curare-Selbstversuch. *Schweiz. med. Wechr.* 450.
- HYDÉN, H. in PIGON, A. (1960). A cytophysiological study of the functional relationship between oligodendroglial cells and nerve cells of Deiter's nucleus. *J. Neurochem.* 6, 57 - 72.
- ILYUTCHENOK, R. J. (1961). The role of cholinergic systems of the brain stem reticular formation in the mechanism of central effects of anticholinesterase and cholinolytic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 8, 91.
- INGVAR, D. H. in HUNTER, J. (1955). Influence of visual cortex on light impulses in the brain stem of the unanesthetized cat. *Acta physiol. scand.* 33, 1 - 25.
- ISELL, H., MINER, E. J. in LOGAN, C. R. (1959). Cross tolerance between D-2-brom-lysergic acid diethylamide (BOL-148) and D-diethylamide of lysergic acid (LSD-25). *Psychopharmacologia* 1, 109 - 116.
- JACOBSON, J. H. in GESTRING, G. F. (1959). *AMA ARCH. OPHTHALMOL.* 62, 599, cit. v: Ostfeld, A. M. (1961). Effects of LSD-25 and JB-318 on tests of visual and perceptual functions in man. *Fed. Proc.* 20, 876 - 883.

- KEY, B. J. (1961). The effect of chlorpromazine and lysergic acid diethylamide on conditioned avoidance responses. Objavljeno v: Neuro-psychopharmacology, p. 158. Izdal Rothlin, E. Amsterdam: Elsevier.
- KILLAM, E. K. (1962). Drug action on the brain-stem reticular formation. Pharm. Rev. 14, 175 - 223.
- KOELLE, G. B. (1954). The histochemical localisation of cholinesterases in the central nervous system of the rat. J. Comp. Neurol. 100, 211 - 228.
- KOELLE, G. B. (1955). Cholinesterases of the central nervous system. J. Neuropath. 14, 23 - 27.
- KRECH, D., ROSENZWEIG, M. R. in BENNETT, E. L. (1959). Correlation between brain cholinesterase and brain weight within two strains of rats. Amer. J. Physiol. 196, 31 - 32.
- KRECH, D., ROSENZWEIG, M. R. in BENNETT, E. L. (1960 b). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. Comp. Physiol. Psych. 53, 509 - 519.
- KRIEG, W. J. (1958). Cit. Domino, E. F. Diskusija v knjigi: Reticular formation of the brain. p. 318. Boston: Little, Brown & Co.
- KRILL, A. E., WIELAND, A. in OSTFELD, A. M. (1960). Effect of two hallucinogens on retinal function in man. Amer. J. Ophtal. 50, 172.



- LASHLEY, K. S. (1938). The mechanism of vision: XV. Preliminary studies of the rat's capacity for detail vision. *J. gen. Psychol.* 18, 123 - 193.
- LASHLEY, K. S. (1950). In search of the engram. *Symposia soc. exp. biol.* 4, 454 - 482.
- LIPPMAN, C. W. (1952). Certain hallucinations peculiar to migraine. *J. Nerv. Ment. Dis.* 116, 346 - 351.
- MAGOUN, H. W. (1962). Higher functions of the nervous system. Objavljeno v: *Neural physiopathology*, p. 39 - 54. Izdal Grenell, R. G., New York: Hoeber, Harper & Row.
- MAHLER, D. J., HUMMOLLER, F. L. in DUNN, A. L. (1958). Comparison of effects of lysergic acid diethylamide and bufotenine on performance of trained rats. *Fed. Proc.* 17, 103.
- MAJČEN, Ž. in ŽUPANČIČ, A. O. (1956). Histokemija holinesteraz v tkivih s muskarinskim in nikotinskim učinkom acetilholina. *Jub. zbor. med. fak. 1945 - 1955*, 173 - 177. Ljubljana: KONUS.
- MARRAZZI, A. S. in HART, E. R. (1955). The possible role of inhibition at adrenergic synapses in the mechanism of hallucinogenic and related drug actions. *J. Nerv. Ment. Dis.* 122, 453 - 457.
- MEESSEN, H. in OLSZEWSKI, J. (1949). A cytoarchitectonic atlas of the rhombencephalon of the rabbit. Basel: Karger.

- MICHELSON, M. J. (1961). Pharmacological evidences of the role of acetylcholine in the higher nervous activity of man and animals. *Acta nerv. sup.* 3, 140 - 147.
- MICKLEWRIGHT, H. L., KURNICK, N. B. in HODES, R. (1953). *Exp. Cell Res.* 4, 151.
- MORRELL, F. (1961). Electrophysiological contributions to the neural basis of learning. *Physiol. Rev.* 41, 444.
- NAIR, V., LAL, H. in ROTH, L. J. (1962). A demonstration of the early entry of iproniazid into the central nervous system. *Int. J. Neuropharmacol.* 1, 361 - 369.
- OSTFELD, A. M. (1961). Effects of LSD 25 and JB 318 on tests of visual and perceptual functions in man. *Fed. Proc.* 20, 876 - 883.
- ORD, M. G. in THOMPSON, R. H. S. (1952). Pseudo-cholinesterase activity in the central nervous system. *Biochem. J.* 51, 245 - 251.
- ORZECZOWSKI, G. (1941). Über die Wirkungsweise der Sympathikomimetika. *Arch. exp. Path. Pharmak.* 198, 27 - 33.
- OSWALD, I. (1962). *Sleeping and waking*. Amsterdam: Elsevier.
- PAVLIN, R. (1957). Diskusija v knjigi: Psychotropic drugs. p. 6. Izdala Garrattini, S. in Ghetti, V. Amsterdam: Elsevier.
- PAVLIN, R. in THOMPSON, R. H. S. (1961). Relative cholinesterase levels in sliced, minced and homogenized preparations of nervous tissue. *Guy's Hosp. Rep.* 110, 168 - 173.



- PENFIELD, W. in RASMUSSEN, T. (1950). The cerebral cortex of man. New York: Macmillan, 1950.  
Cit. v: Ostfeld, A. M. (1961). Effects of LSD 25 and JB 318 on tests of visual and perceptual functions in man. Fed. Proc. 20, 876 - 883.
- PFEIFFER, C. C. in JENNEY, E. H. (1957). The inhibition of the conditioned response and the counteraction of schizophrenics by muscarinic stimulation of the brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 753 - 764.
- PLETSCHER, A., STEINER, F. A. in VOELKEL, A. (1959). Diskusija v: Neuro-psychofarmacology, p. 138 - 144. Izdali Bradley, P. B., Deniker, P. in Radouco-Thomas, C. Amsterdam: Elsevier.
- PURPURA, D. P. (1956). Electrophysiological analysis of psychotogenic drug actions. Arch. Neurol. Psychiat., Chicago 75, 122 - 131.
- PURPURA, D. P. (1957). Experimental analysis of the inhibitory action of lysergic acid diethylamide on cortical dendritic activity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 515 - 536.
- RICCI, G. F. (1963). Electro cortical correlates of avoidance conditioning in the monkey and their modifications with atropine. Biochem. Pharmacol. 12, suppl., 268.
- RICHTER, D. (1961). Biochemical mechanisms related to the site of action of psychotropic drugs. Objavljeno v: Neuro-psychofarmacology. Vol. 2. p. 422 - 434. Izdal Rothlin, E. Amsterdam: Elsevier.

- RODERICK, T. H. (1960). Selection for cholinesterase activity in the cerebral cortex of the rat. *Genetics* 45, 1123 - 1140.
- RODRIGUEZ DE LORES ARNEIZ, G. in DE ROBERTIS, E. D. P. (1962). Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in the rat brain. II. *J. Neurochem.* 9, 503 - 508.
- ROSENZWEIG, M. R., KRECH, D. in BENNETT, E. L. (1960 a). A search for relations between brain chemistry and behavior. *Psych. Bull.* 57, 477 - 492.
- ROTH, L. J. in BARLOW, C. P. (1961). Drugs in brain. *Science.* 134, 22 - 31.
- ROTHLIN, E. (1957). *J. Pharmacol.* 9, 569.
- ROTHLIN, E., CERLETTI, A., KONZETT, H., SCHALCH, W. R. in TAESCHLER, M. (1956). Zentrale vegetative LSD-Effekte. *Experientia* 12, 154.
- ROVETTA, P. (1956). Effect of mescaline and LSD on evoked responses especially of the optic system of the cat. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 8, 15 - 42.
- SCHANKER, L. S. (1962). Passage of drugs across body membranes. *Pharm. Rev.* 14, 512 - 513.
- SCHEIBEL, A. B. in SCHEIBEL, M. E. (1958). *Cit. Domino, E. F. Diskusija v knjigi: Reticular formation of the brain.* p. 318. Boston: Little, Brown & Co.
- SCHARPLESS, S. in JASPER, H. (1956). Habituation of the arousal reaction. *Brain.* 79, 655 - 689.



- SHAW, F. H., MACCALLUM, M., DEWHURST, D. J. in  
MAINLAND, J. F. (1951). Austr. J. exp.  
Biol. 29, 160, cit. v: Giacobini, E.  
(1957). Qualitative determination of  
cholinesterase in individual sympathetic  
cells. J. Neurochem. 1, 234 - 244.
- SHERWOOD, S. L. (1956). Effect of drugs on the beha-  
vior of animals and on psychoses of man.  
Objavljeno v: Neuropharmacology, p. 85 -  
179. Izdal Abramson, H. A. New York: Josiah  
Macy, Jr. Foundation.
- SKINNER, B. F. (1933). The measurement of spontaneous  
activity. J. gen. Psychol. 9, 3 - 23.
- SKLYAROV, Y. P. in KONONENKO, V. S. (1961). The cholin-  
esterase activity of the tissue of the cere-  
bral hemispheres in unconditioned and condi-  
tioned reflex excitation. V. Int. Congr.  
Biochem., Moskva 221.
- SMALL, W. S. (1901). Experimental studies of the mental  
processes of the rat. Amer. J. Psychol. 12,  
206 - 239.
- SMITH, C. E. (1962). Is memory a matter of enzyme indu-  
ction? Science, 138, 889 - 890.
- SPEHMANN, R., KAPP, H. in JUNG, R. (1964). Acetyl-  
cholin-Aktivierung von Neuronen des visuellen  
Cortex durch Mikro-Elektrophorese. Objavljeno  
v: Topics in basic neurology, p. 215 - 240.  
Izdala Bargmann, W. in Schadé, J. P. Amsterdam:  
Elsevier.

- STEINBERG, H., LEGGE, D. in SUMMERFIELD, A. (1961).  
Drug induced changes in visual perception.  
Objavljeno v: Neuro-psychopharmacology, p.  
392 - 396. Izdal Rothlin, E. Amsterdam:  
Elsevier.
- STEWART, C. C. (1898). Variations in daily activity  
produced by alcohol and changes in baro-  
metric pressure and diet, with a description  
of recording methods. Amer. J. Physiol. 1,  
40 - 56.
- STRAUS, O. H. in GOLDSTEIN, A. (1943). Zone behavior  
of enzymes. J. Gen. Physiol. 26, 559 - 585.
- SUZUKI, H. in TAIRA, N. (1961) ., cit. v Mitohawa, K.  
(1963). Mechanisms for the transfer of infor-  
mation along the visual pathways. Internati-  
onal Review of Neurobiology, Vol. 5, p. 121 -  
176. Izdala Pfeiffer, C. C. in Smythies. J.  
R. New York: Academic Press.
- ŠERKO, A. (1913). Im Meskalinrausch. Jb. Psychiatr.  
34, 355.
- TAESCHLER, M., WEIDMANN, H. in CERLETTI, A. (1960).  
Die Wirkung von LSD auf die Reaktionszeiten  
bei einer bedingten Fluchtreaktion und im  
Analgesietest. Helv. physiol. acta 18,  
43 - 49.
- TEOCHAROV, B. (1962). Über die histochemische Lokali-  
sierung der unspezifischen Cholinesterasen  
im Zentralnervensystem der Ratte. Acta neurol.  
scand., 38, suppl. 1, 45 - 46.



- THOMPSON, R. H. S. (1952). Cholinesterases and anti-cholinesterases. Objavljeno v: Lectures on the scientific basis of medicine. Vol. 2. p. 165 - 181. London: Athlone Press.
- THOMPSON, R. H. S., TICKNER, A. in WEBSTER, G. R. (1955). The action of lysergic acid diethylamide on mammalian cholinesterases. Brit. J. Pharmacol. 10, 61 - 65.
- TSAI, C. (1925). The relative strength of sex and hunger motives in the albino rat. J. Comp. Psychol. 5, 407 - 416.
- URSIN, H. (1962). The lack of effect of LSD-25 on amygdaloid and cortical attention responses. Psychopharmacologia 3, 317 - 330.
- VOGT, M. (1954). The concentration of symathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after administration of drugs. J. Physiol. 123, 451 - 481.
- WARDEN, C. J. (1931). Animal motivation, experimental studies in the albino rat. Columbia University Press, New York.
- WAELSCH, H. (1961). Diskusija v: Neuro-psychopharmacology, p. 448 - 449. Izdal Rothlin, E. Amsterdam: Elsevier.
- WARNER, L. H. (1932). The association span of the white rat. J. gen. Psychol. 41, 57 - 90.
- WEINBERGER, L. M. in GRANTT, F. C. (1940). AMA ARCH. OPHTHALMOL. 23, 166, cit. v: Ostfeld, A. M.

(1961). Effects of LSD-25 and JB-318 on tests of visual and perceptual functions in man. *Fed. Proc.* 20, 876 - 883.

WEIDMANN, H. in CERLETTI, A. (1957). Die Wirkung vom D-Lysergsäure-diäthylamid und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) auf spinale Reflexe der Katze. *Helv. Physiol. acta* 15, 376 - 383.

WEIL-MALHERBE, H., WHITEY, L. G. in AXELROD, J. (1961). The uptake of circulatory (3H)norepinephrine by the pituitary gland and various areas of the brain. *J. Neurochem.* 8, 55 - 64.

WIKLER, A. (1957). The relation of psychiatry to pharmacology. p. 197. Baltimore: Williams & Wilkins, Co.

WINTER, C. A. in FLATAKER, L. (1956). Effects of lysergic acid diethylamide upon performance of trained rats. *Proc. Soc. exp. Biol.* 92, 285 - 289.

ZAJIČEK, J. in ZEUTHEN, E. (1957). Quantitative determination of cholinesterase activity in individual cells. *Exp. Cell Res.* 11, 568 - 579.

ZAKUSOV, V. V. (1961). The effects of pharmacological agents on conditioned and unconditioned reflexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 92, Art. 3, 984 - 989.

ZEHNDER, K. in CERLETTI, A. (1956). Hemmung der Menschenserum-Pseudocholinesterase durch Lysergsäure-diäthylamid. *Helv. physiol. acta* 14, 264 - 268.



- ZELLER, A. (1958). Enzymologic effects of mersilid and related hydrazine derivatives. *J. Clin. Exp. Psychopath.* 19, suppl. 1, 27 - 32.
- ZSIGMOND, E. K., FOLDES, F. F. in FOLDES, V. (1960). The lack of correlation between the psychopharmacologic and anticholinesterase effect of LSD and its congeners. *Fed. Proc.* 19, 266.
- ZSIGMOND, E. K., FOLDES, F. F. in FOLDES, V. M. (1961). The inhibitory effect of psilocybin and related compounds on human cholinesterases. *Fed. Proc.* 20, 393.
- ZSIGMOND, E. K., FOLDES, F. F., FOLDES, V. in ERDOS, E. G. (1959). The in vitro inhibitory effect of the lysergic acid (LSD) and its congeners on human cholinesterases. *Fed. Proc.* 18, 463.



SEILER, A. (1958). Pharmacologic effects of narcotic and related hydrazine derivatives. *J. Clin. Exp. Psychopath.* 18, suppl. 1, 27 - 32.

SEIGMOND, E. K., FOLDES, F. V. in FOLDES, V. (1960). The lack of correlation between the pharmacologic and anticholinergic effect of LAD and its congeners. *Fed. Proc.* 19, 366.

SEIGMOND, E. K., FOLDES, F. V. in FOLDES, V. M. (1961). The inhibitory effect of pethidine and related compounds on human cholinesterases. *Fed. Proc.* 20, 393.

SEIGMOND, E. K., FOLDES, F. V., in KRÖS, E. (1959). The in vitro inhibitory effect of the pyruvic acid (LAD) and its congeners on human cholinesterases. *Fed. Proc.* 18, 463.





COBISS 3042300

NARODNA IN UNIVERZITETNA  
KNJIŽNICA



0000437965