

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola  
Összehasonlító Neurobiológia PhD Program

## **A szerotonin és dopamin szerepe a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) embriógenezisében és embrionális viselkedésformáinak szabályozásában**

**PhD értekezés**

**Filla Adrienn**

Témavezetők:

**Dr. Elekes Károly**  
a biológia tudomány doktora

**Dr. Hiripi László**  
a biológiai tudományok kandidátusa

**PÉCS, 2008**

## TARTALOM

<b>1. Bevezetés</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Irodalmi áttekintés</b>	<b>8</b>
<b>1.1.1. A szerotonin (5-HT) és dopamin (DA) bioszintézise és biotranszformációja.</b>	<b>8</b>
<b>1.1.2. 5-HT és DA receptorok</b>	<b>12</b>
<b>1.1.3. 5-HT és DA szerepe a gerincesek idegrendszerében</b>	<b>13</b>
<b>1.1.4. 5-HT és DA szerepe a gerinctelenek idegrendszerében</b>	<b>18</b>
<b>1.2. 5-HT és DA szerepe a nagy mocsári csigában (<i>Lymnaea stagnalis</i>)</b>	<b>27</b>
<b>1.3. A nagy mocsári csiga egyedfejlődése</b>	<b>30</b>
<b>1.4. Az 5-HT és DA rendszer embriogenezise</b>	<b>31</b>
<b>2. Célkitűzések</b>	<b>35</b>
<b>3. Anyagok és módszerek</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Kísérleti állatok tartása</b>	<b>36</b>
<b>3.2. HPLC analízis</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1. 5-HT és DA szint mérése</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2. Tirozin hidroxiláz aktivitás mérése</b>	<b>37</b>
<b>3.2.3. Dekarboxiláz enzim aktivitás mérése</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Farmakológiai kezelések</b>	<b>39</b>
<b>3.3.1. Az embrionális fejlődés nyomon követése</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2. Embrionális viselkedések elemzése</b>	<b>40</b>
<b>3.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok</b>	<b>41</b>
<b>3.5. Ciklikus adenosin monofoszfát (cAMP) analízis</b>	<b>42</b>
<b>3.6. A <sup>3</sup>H-5-HT kötődés vizsgálata</b>	<b>42</b>
<b>3.7. Statisztikai kiértékelés</b>	<b>43</b>
<b>4. Eredmények</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Az 5-HT és DA koncentráció, valamint az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz enzim aktivitás változása a <i>Lymnaea</i> embrió fejlődése során</b>	<b>44</b>
<b>4.2. Farmakológiai kezelések hatása az embrionális fejlődésre és az 5-HT és DA szintekre</b>	<b>52</b>

<b>4.3. DAerg és 5-HTerg farmakonok hatása a <i>Lymnaea</i> embrió különböző viselkedési formáira</b>	56
<b>4.3.1. Forgó mozgás</b>	56
<b>4.3.2. Csúszó mozgás</b>	58
<b>4.3.3. Táplálkozás (radula mozgatása)</b>	59
<b>4.3.4. Szívverés</b>	60
<b>4.4. Farmakológiai kezelések hatása az 5-HT-IR elemek megjelenésére a fejlődő embrióban</b>	62
<b>4.5. 5-HT és LSD hatása a <i>Lymnaea</i> embrió cAMP koncentrációjára</b>	65
<b>4.6. A <sup>3</sup>H-5-HT kötődés vizsgálata</b>	65
<b>5. Az eredmények megvitatása</b>	68
<b>5.1. 5-HT és DA a fejlődő <i>Lymnaea</i> embrióban</b>	68
<b>5.2. Az 5-HT és DA szerepe az embrionális fejlődésben</b>	70
<b>5.3. Az 5-HT és DA szerepe az embrionális viselkedések szabályozásában</b>	71
<b>5.4. Aminerg receptorok a fejlődő csigában</b>	75
<b>6. Összefoglalás</b>	79
<b>7. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk</b>	81
<b>8. Idézett irodalom</b>	83
<b>9. Köszönetnyilvánítás</b>	105

**A SZÖVEGBEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK**

- 2-MPP:** 1-(2-metoxifenil) piperazin
- 5-CT:** 5-karboxiamidotriptamin
- 5-HIAA:** 5-hidroxi-indol-ecetsav
- 5-HT:** szerotonin
- 5-HT-IR:** szerotonin immunreaktív
- 5-HTP:** 5-hidroxi-triptofán
- 5,7-DHT:** 5,7-dihidroxitriptamin
- 6-OH-DA:** 6-hidroxi-dopamin
- 8-OH-DPAT:** 8-hidroxidipropilaminotetralin
- $\alpha$ MPT:**  $\alpha$ -metil-p-tirozin
- ATP:** adenzin-5-trifoszfát
- ÁAK:** átmeneti apikális katekolaminerg
- BOL:** brom-lizergsav dietilamid
- CGC:** cerebrális óriás neuron (cerebral giant cell)
- COMT:** katekol-O-metil-transzferáz
- cAMP:** ciklikus adenzin monofoszfát
- DA:** dopamin
- DA-IR:** dopamin immunreaktív
- DEPHA:** di-(2-etilhexil)-foszforsav
- DOI:** 2,5-dimetoxi-4-jodoamfetamin
- DMT:** N,N-dimetiltriptamin
- FPS:** foszfát puffer sóoldata
- FPS-TX:** foszfát puffer sóoldata + TritonX-100
- GTP:** guanozin-5-trifoszfát
- HPLC:** high performance liquid chromatography
- IBMX:** izobutilmetilxantin
- L-DOPA:** 3,4-dihidroxi-fenilalanin
- LSD:** lizergsav-dietilamid
- MAO:** monoamin-oxidáz
- MGC:** metacerebrális óriás neuron (metacerebral giant cell)
- MPP<sup>+</sup> jodid:** 1-metil-4-fenilpiridinium jodid

**MPTP:** N,metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

**Nsd-1015:** 3-hidroxibenzilhidrazin

**pCPA:** p-klórfenilalanin

**TRYP:** triptofán

## 1. BEVEZETÉS

Az 5-HT-ről az első említés a 19. század közepén történik. Kimutattak a vérből egy olyan kémiai összetevőt, amely összehúzóásra készíti az erek sima izomzatát, de azonosítani ekkor még nem sikerült ezt az anyagot. Az 5-HT-val kapcsolatos valódi kutatások az 1930-as évek végén egy olasz kutató Vittorio Erspamerrel vette kezdetét, aki mindenekelőtt a simaizom működésével foglalkozott. Munkásságának egy részében emlősök gyomor- és bélnyálának valamint polip nyálmirigyének az összetevőit vizsgálta, olyan aminok után kutatva, amik az izom összehúzását váltják ki. A bél enterokromaffin sejtjeiből kimutatott egy anyagot, amit enteraminnak nevezett el, és ami a szín teszt alapján az indol vegyületekhez tartozott (Erspamer és Asero, 1952). Az 1940-s évek végén a Cleveland Clinic egyik kutatócsoportja, Irvine Page, Maurice Rapport és Arda Green, a magas vérnyomás kialakításában résztvevő, vérben található anyagokat kutatta. A csoportnak sikerült vérszérumból izolálnia, megtisztítania és azonosítania egy szérum összetevőt, amit szerotoninnak neveztek el. Az érdem elsősorban Rapporté, aki eredményeiket 1949-ben publikálta is (Rapport, 1949). A későbbi kutatások folyamán kiderült, hogy az Erspamer-féle enteramin megegyezik azzal az anyaggal, amit a Clevelandi kutatócsoport azonosított. Később Rapport vegyészekkel együtt dolgozva szintetikus úton elő is állította az 5-HT-t. Ezzel közel egy időben, az 5-HT-ről mit sem tudva, Betty Mack Twarog kagyló simaizomzatának összehúzását és elernyedését vizsgálva próbálta meghatározni, milyen anyagok vesznek részt ennek a folyamatnak a szabályozásában. Az összehúzásért az acetilkolint tartotta felelősnek, míg az elernyedésért egy olyan, eddig még ismeretlen anyagot, aminek szerkezetileg hasonlítania kellett volna az adrenalinra illetve az ergot alkaloidokra. Kipróbálva a Rapport által megszintetizált 5-HT-t bebizonyította, hogy az ismeretlen átvivőanyag (vagy transzmitter) az 5-HT. Felfedezése csak 1954-ben jelenhetett meg (Twarog, 1954), noha addigra sikerült kimutatnia az 5-HT jelenlétét emlős agyban is (Twarog és Page, 1953). Ugyanekkor Gaddum (Amin és mtsai., 1954) is felfedezte az 5-HT jelenlétét az emlős agyban, valamint megfigyelte, hogy a tudattágítóként ismert lizergsav-dietilamid vagy ismertebb nevén LSD gyengíti az 5-HT kiváltotta választ a bél simaizomzatán (Gaddum és Hameed, 1954). Az 5-HT jelenléte az agyban felvetette a kutatókban annak a gondolatát, hogy nem csak a gyomor-bél rendszer

simaizomzatának összehúzódásában van szerepe, ahogy eddig vélték, hanem fontos lehet a viselkedés szabályozásában is. Az 1950 és 1970-es évek közötti időszakra jellemző, hogy Amerikában, Svédországban és Angliában kutatócsoportok jöttek létre az 5-HT szerepének és elhelyezkedésének vizsgálatára az élő szervezetben. Nagyszámú publikáció jelent meg ekkor, melyek nem csak az 5-HT biokémiai és farmakológiai tulajdonságairól adtak számot, hanem az agy 5-HT tartalmú neuronjainak elhelyezkedéséről, valamint kulcsfontosságú szerepéről a mentális egészség fenntartásában. A 70-es évek elejétől számos olyan kémiai anyagot kezdtek alkalmazni a kísérletek során, pl. triptofán, 5-HT agonisták, antagonisták, enzimgátlók, melyek képesek befolyásolni az 5-HT működését, így fedezve fel annak élettani szerepét, és kapcsolódását számos viselkedésbeli szindrómához, mint például depresszió, skizofrénia. A kémiai anyagok használata maga után vonta az egyes 5-HT receptor típusok azonosítását és farmakológiai tulajdonságainak megismerését is. Az 5-HT, ahogy korábban már említettem, nem csak az agyban fordul elő, hanem a periférián is termelődik a bél enterokromaffin sejtjei révén. A képződött 5-HT ezután a vérbe kerül, ahol a vérlemezkék felveszik és speciális vezikulumokban tárolják. Sérülés esetén felszabadul a vérlemezkékből és elősegíti a lemezekék összekapcsolódását, valamint segít szabályozni az ér tónusát. Ezen kívül, hat az érfal normál feszülésére, azáltal hogy befolyásolja az ér simaizomzatára ható serkentő és gátló faktorok egyensúlyát.

A DA-t 1910-ben szintetizálta Barger és Hill, biológiai aktivitását pedig először Dale vizsgálta. Sokáig nem tekintették fontos anyagnak, csak a noradrenalin szintézisében résztvevő köztes terméknek vélték a kutatók. Az 1950-es években kezdték csak felismerni fiziológiai hatásának fontosságát. Carlsson, aki munkájáért 2000-ben fiziológiai és orvostudományi Nobel díjat kapott, nagy koncentrációban mutatta ki a DA-t olyan szövetekben is, ahol nincs noradrenalin. További vizsgálatok után arra a következtetésre jutott, hogy a DA maga is ingerületátvivő anyag, valamint szerepet játszik a spontán mozgások szabályozásában (Carlsson és mtsai., 1958). A 60-as évek közepén az is kiderült, hogy összefüggés van az agy alacsony DA szintje és a Parkinson kór között (Ehringer és Hornykiewicz, 1960). 1964-ben Dahlström és Fuxe először számoltak be részletesen a katekolamin és 5-HT tartalmú neuronok eloszlásáról patkány agyban (Dahlström és Fuxe, 1964). A 60-as évek közepére, tehát tisztába voltak a DA jelenlétével az agyban, csökkent szintjével a Parkinson betegség során, L-DOPA hatékonyságával eme betegség kezelésében. Továbbá a

DA tartalmú axonok hálózatát is kezdték láthatóvá tenni az akkor kifejlődő fluoreszcens hisztokémiai módszer segítségével, amit a 80-as évek elején követett az immunhisztokémia, még részletesebb térképezést téve lehetővé. Az 1980-as években a kutatók elkezdtek a DA receptorokkal foglalkozni. A technika fejlődése már lehetővé tette a DAerg rendszer és specifikus DA receptorok közötti kapcsolat tanulmányozását (Kebabian és mtsai., 1972; Seeman és mtsai., 1976; Strange, 1991)

Napjainkban is igen intenzív kutatások folynak mind az 5-HT-nal, mind a DA-nal kapcsolatban. A különféle molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával lehetővé vált a két monoamin receptorait, transzportereit, metabolizmusokban szerepet játszó enzimeit kódoló gének szerkezetének megismerése. Ezen ismeretek birtokában mutáns kísérleti állatok létrehozásával további lehetőségek nyíltak meg a két monoamin élettani és viselkedésbeli szerepének pontosabb megismerésében. Kísérleti "alany" pedig akad bőven, mivel a felfedezésük óta eltelt évtizedek során szinte az egész állatvilágban kimutatták jelenlétüket: megtalálhatóak valamennyi gerinctelen (Klemm, 1985; David és Coulon, 1985; Messenger, 1996; Walker és mtsai., 1996; Takeda, 1997) és gerinces fajban (Parent, 1984; Smeets és Reiner, 1995; Björklund és Dunnett, 2007). Amellett hogy széles körben elterjedtek, igen ősi molekulák is, mert már a legprimitívebb gerinctelenekben, pl. a bordásmedúzákban, is jelen vannak. Az élő szervezetben megtalálhatóak a központi idegrendszerben, de a perifériás rendszerben is előfordulnak. Részt vesznek az ingerületek továbbításában, befolyásolják más ingerületátvivő anyagok hatását illetve hormonként is viselkedhetnek (Walker és Kerkut, 1978; S.-Rózsa, 1984; Nässel, 1988; Weiger, 1996; Björklund és Dunnett, 2007). Mai tudásunk szerint, az 5-HT fontos szerepet játszik a testhőmérséklet, alvás, étvágy, hangulat, szexualitás valamint a hányinger szabályozásában. Az agresszióban, ingerlékenységben, feszültségérzésben, szorongásban egyfajta visszafogó transzmitterként viselkedik. A DA-t az agy örömközpontjával hozzák összefüggésbe, ahol örömet idéz elő, ezzel motiválva az egyedet bizonyos cselekedetek végrehajtására. A mozgáskoordinációban is szerepet játszik, valamint kontrollálja az információáramlást. A DAerg rendszerben fellépő rendellenességek hanyatlást idéznek elő az emlékezésben, odafigyelésben. Parkinson kóros betegek agyában a DA szintje a normálhoz képest alacsonyabb. Neurohormonként szabályozza a hipofízis elülső lebenyének prolaktin elválasztását. Mindkét monoamin szintjének



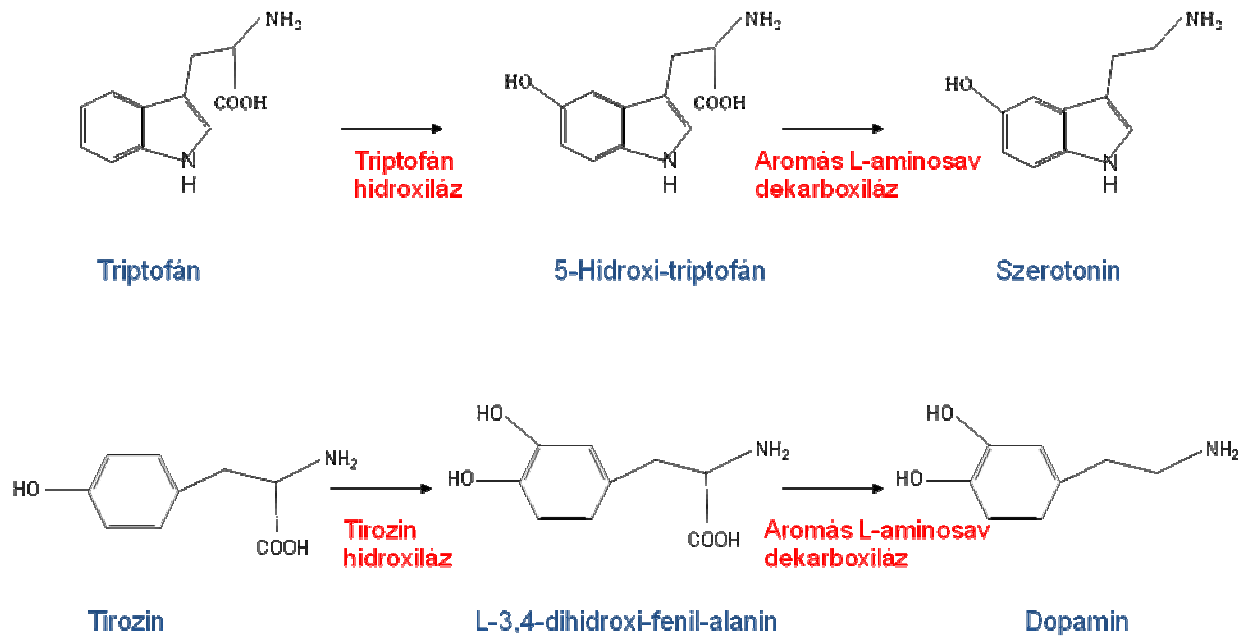
kóros megváltozása hangulatzavarokat eredményezhet, mint pl. a skizofrénia és a depresszió.

## 1.1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

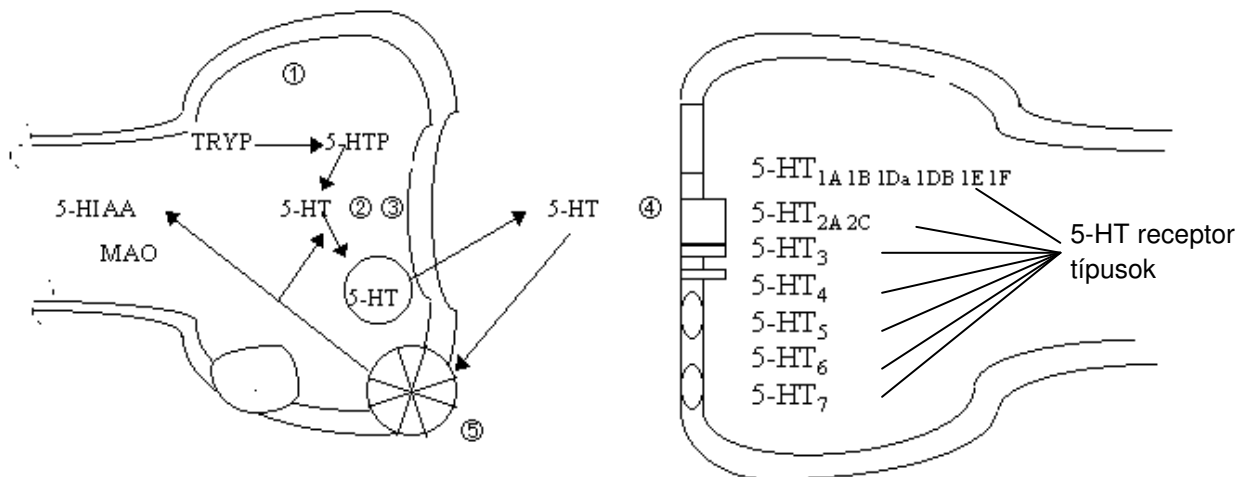
### 1.1.1. A szerotonin és dopamin bioszintézise és biotranszformációja

Az 5-HT-t szerkezete és az alapján, hogy az élő szervezetben aminosavból keletkezik, a biogén aminok közé soroljuk. A szervezetben az 5-HT a központi idegrendszer 5-HT tartalmú sejtjeiben, illetve a gyomor-bél rendszer enterokromaffin sejtjeiben szintetizálódik. A triptofán nevű aminosavból jön létre, rövid metabolizációs folyamat révén, melyben két enzim, a triptofán hidroxiláz és az aminosav-dekarboxiláz, vesz részt. Hidroxilálás következtében a triptofánból 5-hidroxi-triptofán (5-HTP) keletkezik, mely átalakulás meghatározza az 5-HT keletkezésének sebességét. Ezután a dekarboxiláz enzim eltávolít az 5-hidroxi-triptofánról egy karboxil csoportot és kialakul az 5-HT (1. ábra). Ugyanez a dekarboxiláz enzim képes átalakítani a 3,4-dihidroxi-fenilalanint (DOPA) DA-ná. Éppen ezért, a triptofán hidroxilázzal szemben, ez az enzim nem csak az 5-HT tartalmú idegsejtekben fordul elő.

A DA szintén a biogén aminok közé tartozik és legfőképpen az agy idegsejtjeiben valamint a mellékvesében termelődik. Szintézise során a tirozin nevű aminosavat hidroxilálja a tirozin-hidroxiláz enzim, így DOPA keletkezik. Ez az átalakulás a sebesség-limitáló része a szintézisnek. A következő lépésben a DOPA-t dekarboxilálja az aminosav-dekarboxiláz enzim és kialakul a DA (1. ábra). A DA más neurotranszmitterek szintézisének a kiinduló pontja, tovább alakulva noradrenalin és adrenalin keletkezik, mely lépéseket a DA  $\beta$ -hidroxiláz és a feniletanolamin N-metiltransferáz katalizálja.



**1. ábra A szerotonin és dopamin szintézise**

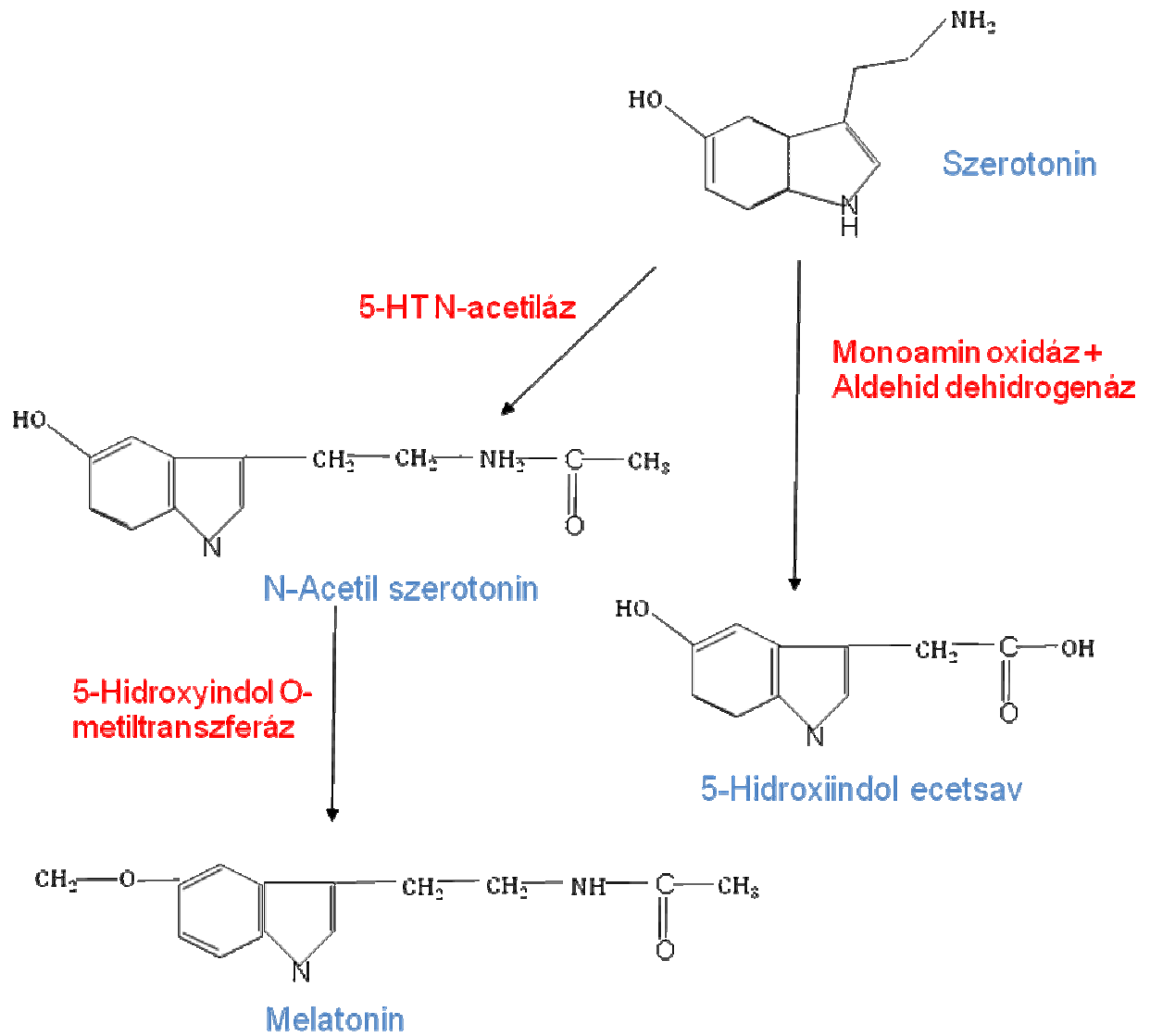


1. 5-HT szintézise (TRYP – triptofán, 5-HTP – 5-hidroxi-triptofán, 5-HIAA – 5-hidroxi-indol-ecetsav, MAO – monoamin oxidáz)
2. 5-HT tárolása vezikulákban
3. felszabadulás
4. posztzinaptikus membrán receptorhoz történő kapcsolódás
5. transzporter az 5-HT-t visszajuttatja a sejtbe, ahol vagy enzimatikusan lebomlik vagy vezikulákba kerül ismét

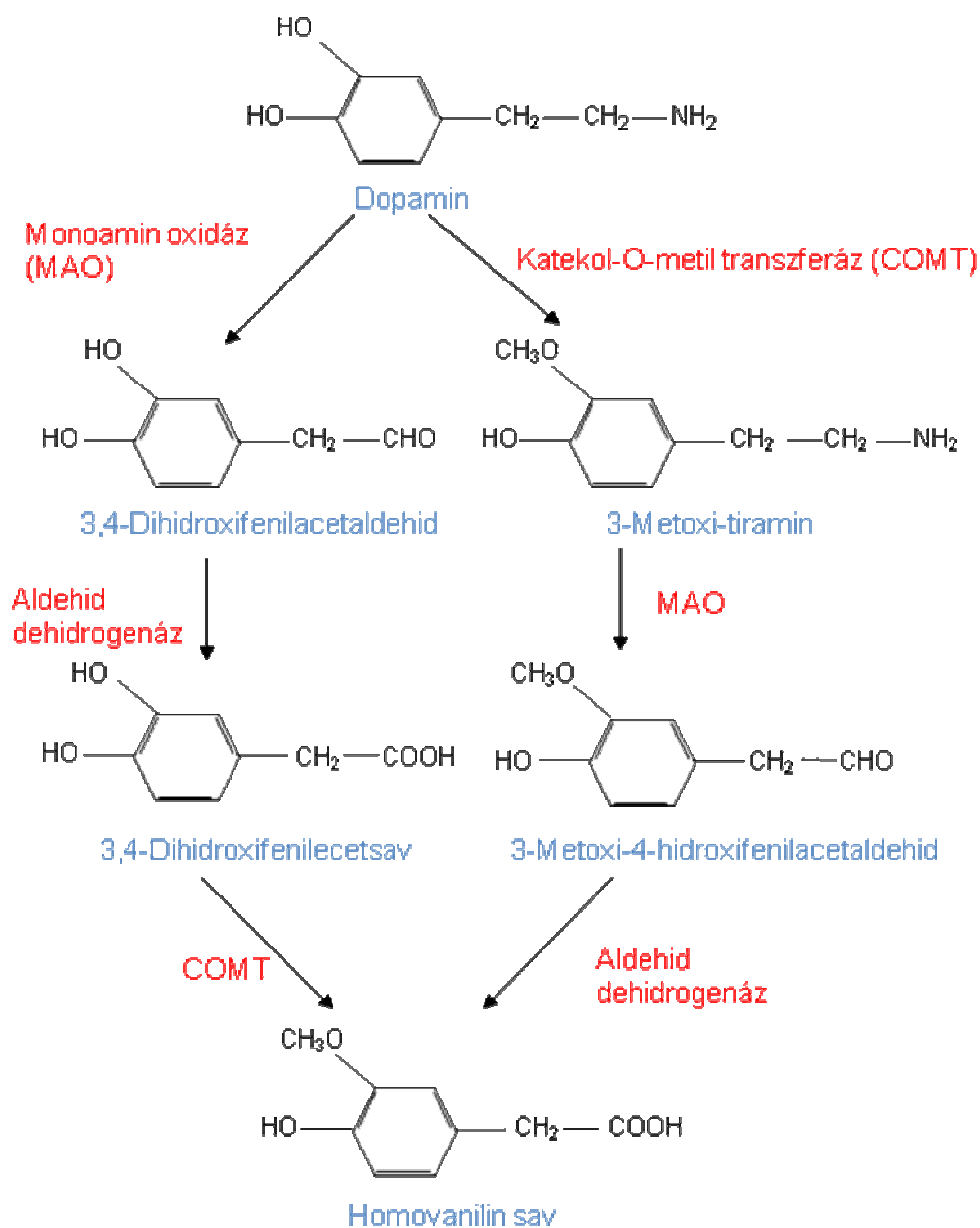
**2. ábra A szerotonin útja az idegi kapcsolatokban** (Módosított ábra. Wong és mtsai., 1995

*Life Sciences* 57: 411-441)

Az 5-HT és a DA olyan idegsejtek közötti ingerületek továbbításában vesz részt, melyek kémiai szinapszissal kapcsolódnak össze. A preszinaptikus (küldő) sejt idegvégződésében az aminok vezikulákba csomagolva helyezkednek el. Inger hatására a sejt membránja depolarizálódik, ennek következtében a feszültségfüggő kalcium csatornákon keresztül  $\text{Ca}^{2+}$  áramlik az idegvégződésbe megemelve a citoplazma  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját. Ez a megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  szint kiváltja a vezikulák összeolvadását a sejtmembránnal és a vezikulákba csomagolt aminok felszabadulását a szinaptikus részbe. Ott a posztszinaptikus (fogadó) idegsejt membránján lévő receptoraikhoz kötődve a monoaminok továbbadják az ingerületet, megváltoztatva a posztszinaptikus sejt elektromos potenciálját (2. ábra). Az ingerület továbbítása után, a felszabadult monoaminokat a szervezet különféle módon eltávolítja a szinaptikus részből, így téve lehetővé az idegsejtek újraingerelhetőségét. Az egyik lehetőség, hogy transzporterek segítségével visszavevődnek a pre- vagy posztszinaptikus sejtbe, ahol enzimek hatására lebomlanak vagy újra vezikulákba csomagolódnak. A transzporter valójában egy szimport,  $\text{Na}^+$  szállítással kapcsolatos képes a sejtbe juttatni a monoaminokat. A másik lehetőség a diffúzióval történő eltávolítás a részből. A preszinaptikus sejtbe visszakerült 5-HT-ből enzimatis lebontódás során az aldehid-dehidrogenáz és a mitokondrium külső membránjában található monoamin-oxidáz (MAO) enzimek 5-hidroxi-indol-ecetsavat állítanak elő, mely tovább már nem alakul és a vizelettel eltávozik a szervezetből (3. ábra). A DA lebomlása történhet az idegvégződés citoplazmájában, vagy glia sejtben. A metabolizmusban résztvevő fő enzimek a MAO, a katekol-O-metil-transzferáz (COMT) és az aldehid dehidrogenáz. A lebomlás során keletkező végtermék a homovanilin sav (4. ábra).



3. ábra A szerotonin metabolizmusa



4. ábra A dopamin metabolizmusa

### 1.1.2. 5-HT és DA receptorok

A monoaminok sokféle fiziológias hatásukat membrán-kötött receptoraikon keresztül fejtik ki. Mindegyik DA és 5-HT receptor, kivéve az 5-HT<sub>3</sub> típusút, a G-fehérje kapcsolt receptorok nagy családjába tartozik és hét transzmembrán doménnel rendelkezik. Az egyes receptor típusok azonosításában lényeges szerepet

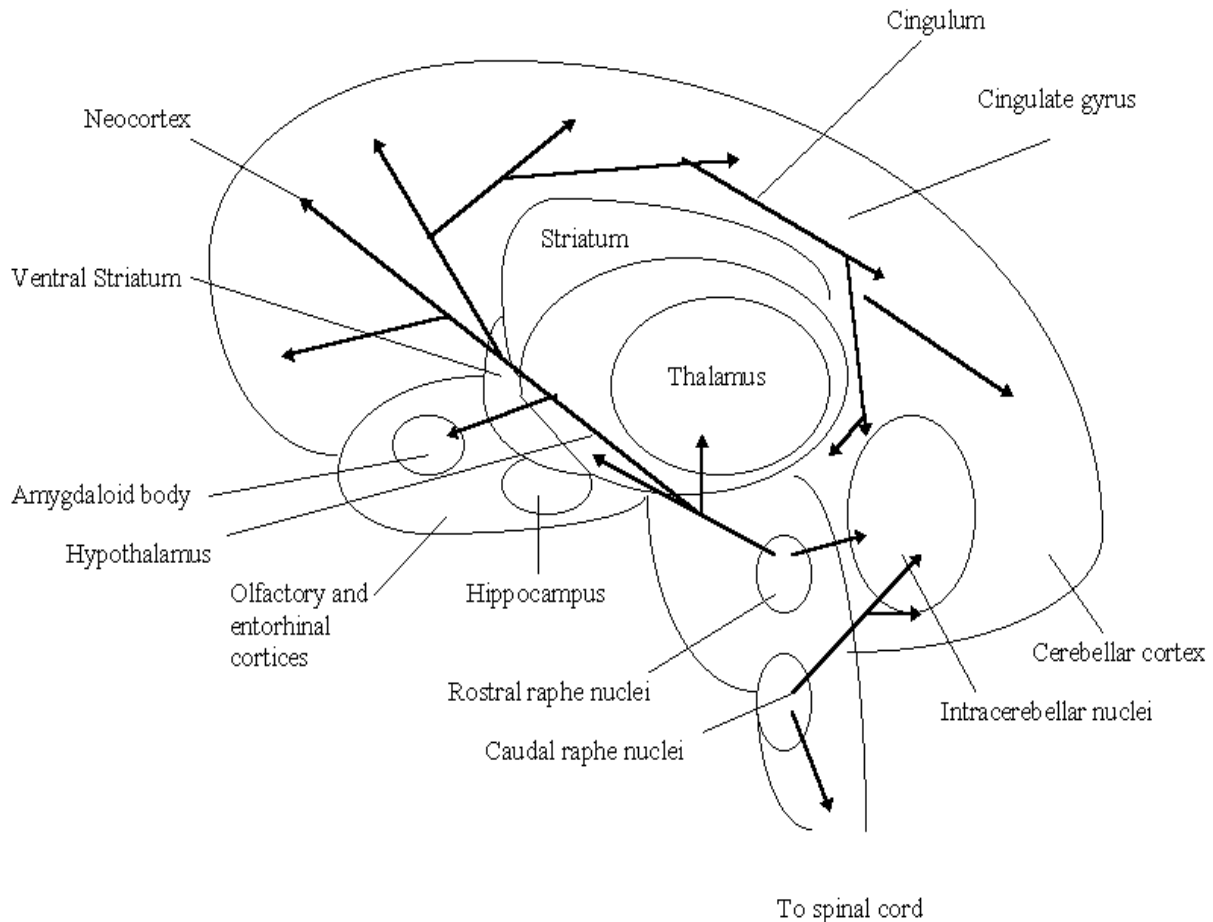
játszott a radioaktív ligand-receptor kötődés technika kifejlődése, majd ezt követően a molekuláris biológiai technikák megjelenése. Jelenleg tizennégy 5-HT receptort különböztetnek meg, melyeket hét osztályba sorolnak, és ezzel a legkomplexebb családot alkotják a neurotranszmitter receptorokon belül (Glennon és mtsai., 2000; Hoyer és mtsai., 2002; Pauwels, 2003). Az 5-HT<sub>1</sub> osztály öt receptor altípusból áll, ezek az 1A, 1B, 1D, 1E és 1F. A hozzájuk kapcsolódó G<sub>i/o</sub>-fehérjéken keresztül gátló hatást fejtenek ki az adenilát cikláz működésére. Az 5-HT<sub>2</sub> típus stimulációja következtében a foszfinozitol specifikus foszfolipáz C enzim aktivációja megnő. Ide tartozik 2A, 2B és 2C receptorok. Az 5-HT<sub>3</sub> receptor ligand vezérelt ioncsatorna. Az 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> és 5-HT<sub>7</sub> receptorok G<sub>s</sub>-fehérjén keresztül, serkentik az adenilát cikláz működését. Ami az 5-HT<sub>5</sub> receptort illeti, sem az adenilát cikláz sem a foszfolipáz C enzim aktivitását nem befolyásolja, és jelenleg nem ismert mi továbbítja jelátvitelét a sejten belül. A DA receptorokat két nagy családba sorolják (Civelli, 2000). A D<sub>1</sub> családba tartoznak a D<sub>1</sub> és D<sub>5</sub> altípusok, míg a D<sub>2</sub> tagjai a D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> és D<sub>4</sub> altípusok. A DA a D<sub>1</sub> család receptoraihoz kapcsolódva G<sub>αs</sub>-fehérjén keresztül, serkenti az adenilát cikláz működését, így a sejtben megemelkedik a ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) koncentráció. A D<sub>2</sub> család tagjait aktiválva G<sub>αi</sub>-fehérjén keresztül viszont a foszfodiészteráz aktivitását emeli meg, ami lebontja a cAMP-t.

### 1.1.3. 5-HT és DA szerepe a gerincesek idegrendszerében

#### 5-HT

Fluoreszcens hisztokémiai és immuncitokémiai módszerekkel kimutatták, hogy emlősökben az 5-HT tartalmú idegsejtek elsősorban az agytörzs „raphe” magjaiban találhatóak. A rostrális raphe magok nyúlványaikon keresztül az előagy különböző területeit idegezik be, mint a diencephalon részen belül a talamusz, hipotalamusz, a telencephalon részen belül a nucleus accumbens, neopallium, amygdala, striatum, cingulum, gyrus cinguli és hipokampusz (5. ábra). A kaudális magok nyúlványokat küldenek a mélyen fekvő kisagyi magvakba és a kisagy kéregállományába, valamint leszálló axonjaik szinapsziszokat képeznek a gerincvelő érző és mozgató neuronjain, így hatással vannak a perifériára futó szimpatikus idegi kimenet mintázatára (Frazer

és Hensler, 1999). A szimpatikus idegrendszer a vegetatív idegrendszer egyik része, neuronjai a gerincvelő oldalsó szarvában helyezkednek el. Készenléti, riasztási funkciókat lát el, főként stresszhelyzetben aktivizálódik.



### 5. ábra A szerotoninerg rendszer sematikus ábrázolása emlősgyagban

Az 5-HTerg sejteket tartalmazó raphe magok az agytörzs középvonalában helyezkednek el és egy rostrális meg egy kaudális csoportra oszlanak szét. A rostrális raphe magok az előagy nagy részét idegezik be. A kaudális csoportból indulnak ki azok az axonok, melyek a gerincvelő érző és motor neuronjaihoz futnak. (Az ábra L. Heimertől származik; *The Human Brain és Spinal Cord*. Springer, New York, 1983.)

Általánosságban az 5-HT neuromodulátor szerepet tölt be a gerinces agyban. Azáltal, hogy más neurotranszmitter hatását szabályozza, számos viselkedés és élettani folyamat irányításában vesz részt, így befolyással van az észlelés folyamatára, a napi ritmusra, a hangulatra, részt vesz a memória kialakításában és a tanulási folyamatokban, fontos jóllakottságjelző molekula, a szexuális étvágyra viszont csillapítólag hat. Viselkedést szabályozó hatása főleg gátló (stabilizáló)

jellegű (Aghajanian és Sanders-Bush, 2002). A különféle helyeken kiváltott hatása eltérő, de biológiailag egymáshoz kapcsolódó folyamatokat indít el; tompítja az ideg- és az immunrendszer reakcióit. Leegyszerűsítve az agyban kétféle 5-HT rendszer működik:

- Az egyik az érzelmi veszteségeket és fájdalmakat enyhíti. Segít elviselni ezeket az érzéseket. Hiányában erősebb a testi-lelki fájdalom átélése, ami a téli depresszió kialakulásához is vezet. Ez a rész az agytörzs mediális raphe részéhez köthető.
- A másik rendszer, mely a dorzális raphe területén található, a félelem - és a szorongáskeltésben fontos, megakadályozva a szélsőséges cselekedeteket, az agressziót (Randy, 2006). Potenciálisan veszélyes külső ingerek hatására megbénítja a szervezetet. A rendszer károsodása esetén már ártalmatlan ingerek is kiváltják a vészreakciót.

Az 5-HT biológiai hatásának feltérképezésében jelentős segítséget nyújt a transzgenikus állatok alkalmazása (Bohlen és mtsai., 2006). Olyan egerekben, ahol az 5-HT<sub>2C</sub> receptor túlexpresszált, nagyobb volt az egyedek súlyvesztése, mint a vad típusú egyedeknél. A nátrium hiány kiváltotta só étvágyat csökkenteni lehet egy 5-HT<sub>2</sub> antagonistával, a ketanszerin szedésével. 5-HT<sub>1B</sub> hiányos egerek agresszívabbak, mint társaik. Az 5-HT számos hormon felszabadulásáért felelős. Ilyen a kortikotropin, prolaktin és gonadotropin. Tény, hogy a hipotalamuszban található kortikotrofin felszabadító faktort tartalmazó sejtek 5-HT tartalmú szinaptikus kapcsolatokkal rendelkeznek.

Számos betegség kialakulásában van szerepe a felborult 5-HT rendszernek. Az agy lecsökkent 5-HT szintje figyelhető meg migrénes, depressziós, szorongásos vagy étkezési rendellenességben szenvedő betegeknél (Baumel, 1998). 5-HT túltengés esetén, noha a beteg étvágya megnő, mégis súlyt veszít, álmosává válik, tompul a tudata, lassabban gondolkodik, csökken az izom tónusa és lassul a keringése is (Birkmeyer és Riederer, 1989). Szintén az agy magas 5-HT szintje áll a szerotonin-szindróma (Prator, 2006) és a magas vérnyomás hátterében.



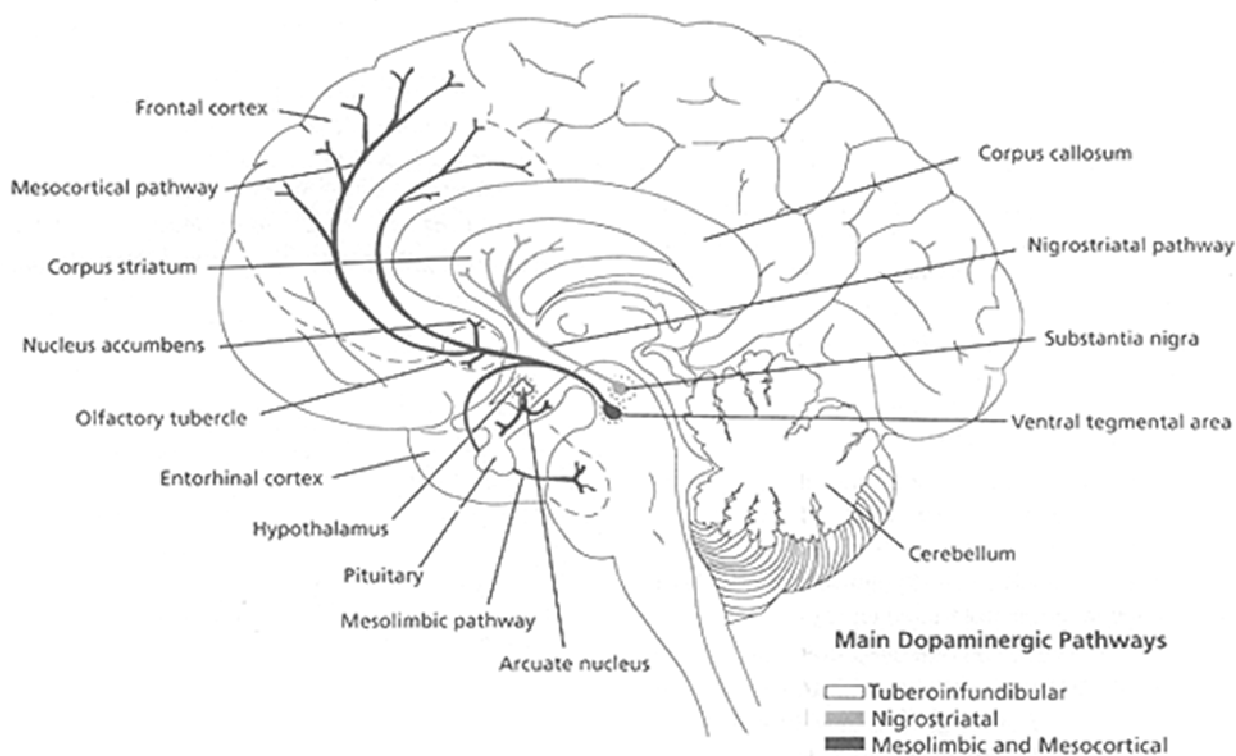
## DA

Miután a kutatók felfedezték, hogy a DA-nak szerepe van mind a skizofrénia, mind a Parkinson betegségben, és sikerült azonosítani a DA receptorokat is, a további kutatásokban egyre szelektívebb kémiai anyagok kerültek alkalmazásra, melyek agonistaként vagy antagonistaként hatottak egyes DA receptorra, vagy neurotoxinok voltak. Susan Iversen és Cambridge-i laboratóriuma élenjáró volt ezekben a kutatásokban. Ezek az anyagok alapvető fontosságúnak bizonyultak a DA szerepének vizsgálatában, nagyban lendítettek élettani hatásának megismerésében. Ilyen anyag pl. a 6-hidroxi-dopamin (6-OH-DA) neurotoxin. Közvetlenül a DAerg rendszerbe injektálva képes azt specifikusan károsítani (Uretsky és Iversen, 1970). Az ezt követő néhány évben számos cikk számolt be a DA és egyes viselkedésformák, mint pl. mozgás, sztereotipikus viselkedések, tanulás, motiváció, táplálék felvétel, jutalmazás kapcsolatáról. Egy másik neurotoxin, az 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) volt, mely szintén elősegítette a DA szerepének megértését a Parkinson betegségben (Treseder és mtsai., 2000). A szintetikus heroin egyik összetevőjeként drogosoknál Parkinson jellegű tüneteket idézett elő, és ekkor került a kutatók figyelmének középpontjába. Az 5-HT-al szemben a DA az agy számos területén szintetizálódik. Kissé leegyszerűsítve elmondható, hogy a legtöbb DA tartalmú idegsejt a középagy substantia nigra állományában, a ventrális tegmentális területén (ventro tegmental area, VTA) és a hipotalamuszban található (Fuxe és mtsai., 2007). Axonjaik négy fő útvonalon idegeznek be az agy fő területeit (6. ábra):

- mezokortikális rendszer: a ventrális tegmentális területet köti össze az agykéreggel és részben a frontális lebennyel. Alapvető szerepe van a dorzolaterális prefrontális kéreg normális kognitív működésében, ezáltal a motivációban és az érzelmi válaszok kialakításában (Wise és Rompre, 1989; Berridge és Robinson, 1998). A rendszer megnövekedett DA aktivitása egyik velejárója a skizofréniaának.
- mezolimbikus rendszer: a ventrális tegmentális területet köti össze a nucleus accumbenssel, mely a limbikus rendszer striatum részén található. Szabályozó szerepet tölt be a különböző motoros és kognitív funkciók végrehajtásában (Chudasama és Robbins, 2006; Koob és Swerdlow, 1988). Szerepe van a szexuális viselkedés szabályozásában (Mitchell és

Gratton, 1994). DA neurotranszmisszióban bekövetkező elváltozások kapcsolatban lehetnek az úgynevezett figyelemzavar/hiperaktivitás kialakulásával (Castellanos és Tannock, 2002).

- nigrostriális rendszer: a substantia nigrát köti össze a striatummal. Része az úgynevezett bazális ganglion motoros huroknak. Szerepe ezért főleg a mozgás szabályozásában van. (Crossman, 2000). DA tartalmú idegsejtek elvesztése az egyik fő patológiás tünete a Parkinson kórnak (Sourkes, 1989).
- tuberoinfundibuláris rendszer: a hipotalamusz arcuate nucleus területén található DA tartalmú neuronokat köti össze az agyalapi miriggyel (hipofízis). Részt vesz a hipofízis prolaktin szekréciójának szabályozásában (Freeman és mtsai., 2000). Szerepe van az anyai viselkedés kialakulásában (gondoskodás), terhességben.



**6. ábra A dopaminerg rendszerek lokalizációja az emlősagyban** (Ann D. Crocker, *Dopamine – mechanisms of action*. Australian Prescriber, 1994)

Vannak olyan viselkedési formák, melyek DAerg szabályozása nem köthető csak az egyik útvonalhoz. Ilyen a szexuális viselkedés szabályozása. A nemi aktusra való

kedv kiváltásában a mezolimbukus rendszer vesz részt. A nigrostriatalis rendszer azáltal, hogy a mozgás aktivitásának szabályozásában vesz részt, elengedhetetlen magához a közösüléshez (Giuliano és Allard, 2001).

#### 1.1.4. Az 5-HT és DA szerepe a gerinctelenek idegrendszerében

A férgek idegrendszere viszonylag egyszerű felépítésű, kevés idegsejtből áll. A legtöbb idegsejt a garat körül található, nyúlványaikkal gyűrűt képeznek körülötte. A többi idegsejt a hasi idegpálya idegdúcaiban és a farokban helyezkedik el. A férgek háti (dorzális) és hasi (ventrális) oldalán hosszanti lefutású idegpályák, valamint subventrális és subdorzális elhelyezkedéssel vékonyabb idegtörzsek futnak. A férgek hasdúcláncában az 5-HT nagy mennyiségben fordul elő, pl. *Lumbricus* esetében 7-10 µg/g (Gardner és Walker, 1982). Az 5-HT eloszlását részletesen vizsgálták a pióca idegrendszerében. A feji (anteriorális) rész szegmentális ganglionjaiban mérhető a legmagasabb 5-HT koncentráció, ennél kisebb koncentrációban fordul elő a cerebrális ganglionban és mennyisége a farki régió felé haladva folyamatosan csökken a szegmentális idegdúcokban (Lent és mtsai., 1991). A *Caenorabditis elegans* idegrendszerében az 5-HT összesen 8 különböző idegsejtben szintetizálódik, ezek közül is két, garatban található motoros neuronban mutatható ki a legnagyobb mennyiségben (Chase és Koelle, 2007). Ezek az úgynevezett NSM sejtek, melyek morfológiájuk alapján szekretórikusak (Albertson és Thomson, 1976; Horvitz és mtsai., 1982). Piócában az 5-HT mennyiség fele az óriási Retzius sejtekben (50-80 µm) szintetizálódik. Ezek a sejtek unipolárisak, párosával mindegyik ganglionban előfordulnak, axonjaik a test adott szegmentjének perifériás szöveteit, pl. izom, bőr és mirigyek látják el 5-HT beidegzéssel (Lent és mtsai., 1991). A Retzius sejteken kívül mindegyik idegdúc tartalmaz még 5 darab 5-HTerg tartalmú idegsejtet, ill. az anteriorális régióban további 5-HTerg sejteket azonosítottak (Caretta, 1988). Ezeknek a neuronoknak az axonjai nem lépnek ki a központi idegrendszerből, ezért feltételezhetően interneuronok.

A *Caenorabditis* 5-HTerg rendszere a táplálék jelenlétét közvetíti az éhes féreg számára. A táplálék kiváltotta 5-HT felszabadulás hatására lelassul a kiéhezett állat mozgása, ennek következtében az állat a táplálék közelében marad (Sawin és mtsai., 2000). Emellett kiváltódik egy gyors pumpáló garatmozgás, valamint a

felszabadult 5-HT elnyomja a bélizomzat összehúzódását is, amikor kezd üríteni a féreg. Az 5-HTerg rendszernek szerepe van még a peterakás beindításában is. (Rogers és mtsai., 2001; Niacaris és Avery, 2003; Weinshenker és mtsai., 1995; Horvitz és mtsai., 1982). Ezeknek a feladatoknak a szabályozásában az 5-HT részt vehet, mint hormon, vagy mint neurotranszmitter. Pióca szervezetében az 5-HTerg rendszer fontos szerepet tölt be az úszás szabályozásában, a táplálkozás beindításában, a bőr nyálkakiválasztásában és a nyáleválasztásban (Gardner és Walker, 1982; Caretta, 1988; Lent és mtsai., 1991; Kristan és mtsai., 2005). Mennyiségi mérések kimutatták, hogy éhes állat 5-HT szintje magasabb, mint a jóllakott állaté. Anatómiai, elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az 5-HT-erg rendszer éhes piócában kiváltja a táplálékkereső viselkedést (intenzívebb mozgás), és beindítja az emésztést (Lent és mtsai., 1991; Kristan és mtsai., 2005). Serkenti a garat összehúzódásait, a szívó mozgást, és a nyáleválasztást. Az 5-HT hatását mind hormonnként mind neuromodulátorként kifejti. Számos vizsgálat felvetette az 5-HTerg rendszer szerepét tanulási folyamatok (szenzitizáció, diszhabitáció) kialakításában is.

Az ízeltlábúak központi idegrendszerére jellemző a központosuló hasdúc-lánc. A fej első három szelvényének ganglionjai összeolvadva alkotják az úgynevezett agyat, az ezután következő három ganglionpár a garatalatti dúcot. Biokémiai és farmakológiai vizsgálatok igazolják, hogy a rovarok agyában (Hiripi és S-Rózsa, 1987; Nässel, 1988; Fuchs és mtsai., 1989; Homberg, 1994) nagy koncentrációban van jelen az 5-HT, mely viszonylag kevés neuronban szintetizálódik. A rovarok központi idegrendszerében az 5-HTerg sejtek főleg, mint intraszegmentális interneuronok fordulnak elő, pl. a tücsök terminális ganglionjában (Elekes és mtsai., 1987) vagy egyes rovarok agyában (Homberg, 1999) és látólebenyében (Nässel, 1985). A látólebeny három neuropil régióra tagolódik: lamina, medulla és lobula. Az 5-HTerg idegsejtek a lamina és medulla egész területén előfordulnak (Nässel, 1985), míg 5-HTerg rostokat mindhárom neuropil, így a lobula is tartalmaz, melyek összekötik a lobulát az oldalsó protocerebrummal. A rovarok központi idegrendszerének legnagyobb részét interszegmentális 5-HTerg axonok hálózják be, melyek közül néhány beidegzi a perifériás területeket is. Az 5-HT tartalmú neuronok populációja a szegmentális interneuronok mellett efferens neuronokat (genitális szervek) is tartalmaz (Hustert és Topel, 1986; Elekes et al., 1987), továbbá egyes rovarok érző neuronjaiban is azonosították az 5-HT jelenlétét. A sáska lábában

elhelyezkedő szenzoros neuronok 2 csoportját különítették el (Lutz és Tyrer, 1988). Az egyik csoportjuk a külső mechanoreceptorokkal, míg a másik csoportjuk a belső proprioreceptorokkal kapcsolt. 5-HT tartalmú sejteket a belső proprioreceptorokat tartalmazó szervben, a chordotonális szervben is találtak, tehát az 5-HT szenzoros neurotranszmitter is.

Az 5-HT tartalmú neuronok diverz (interneuron, érző és efferens neuron) jelenléte arra utal, hogy az 5-HT a rovarokban motoros-, interneuronos- és szenzoros neurotranszmitter is (Walker és Holden-Dye, 1991). Az 5-HTerg rendszer számos rovar fajban, pl. sáskában (Nässel, 1988; Cuttle és mtsai., 1995), méhben (Kloppenburg és Erber, 1995) szabályozza a vizuális rendszert, valamint tücsökben a napi cirkadián ritmust is a látólebenyben található 5-HTerg sejteken keresztül (Saifullah és Tomioka, 2002). Az 5-HT befolyásolja a Malpighi-edények és a nyálmirigy szekrécióját (Maddrell és Phillis, 1975; Baines és mtsai., 1989; Baines és Tyrer, 1989). Ezen kívül egyéb perifériás szerepe is van, pl. a sztomatogasztrikus rendszerben vagy a neurohemális szerv, a corpus cardiacumon keresztül (Nässel, 1988) neurohormonként funkcionál, valamint a terminális ganglionon keresztül, szabályozza a genitális szerveket is (Kumashiro és mtsai., 2008).

A decapoda rákok hasdúcláncában közel 100 sejt mutat 5-HT immunreaktivitást (Beltz és Kravitz, 1983). Méretüket tekintve kis sejtek, axonjaik lefutása túl finom hogy nyomon lehessen követni, kivéve a torakális és első abdominális ganglion 5-HT immunreaktív (5-HT-IR) sejtjeinek nyúlványait. Ezek a sejtek viszonylag gyengén elágazódó dendriteket és axonokat bocsátanak ki a saját ganglionjaik neuropil hálózatába, míg fő nyúlványaik az egyes ganglionokat összekötő idegköteg felépítésében vesznek részt, és kettő vagy több ganglionon is áthaladnak, míg eléri célterületeiket, ahol sűrűn szétágazódnak. Nagyméretű 5-HTerg sejtek a rákokban a 4. és 5. torakális ganglionban, ill. az első abdominális ganglionban fordulnak elő. A központi idegrendszeren kívül még a perifériás neurohormonális szervekben is kimutattak 5-HT-IR-t.

Az 5-HTerg rendszer aktiválódása egy megfeszített végtag állapotot idéz elő a rákban, ami a támadó, vagy dominanciát kifejező testtartásának felel meg (Glusman és Kravitz, 1982). Ebben az esetben az 5-HTerg rendszer beindít egy motoros programot, mely a testtartásban résztvevő vázizmokat beidegző ingerlő és gátló idegsejtek koordinált tüzelési mintázatából áll. A decapoda rák periférikus szövetei igen érzékenyek az 5-HT-ra. Glusman és Kravitz (1982) szerint az 5-HT egyes ideg-

izom preparátumokon végzett vizsgálatok során fokozta a serkentő és gátló idegvégződések transzmitter felszabadulását, valamint megnövelte az izomrostok kontrakcióját. Mivel számos az 5-HT-ra érzékeny periférikus szövetben nem tudtak 5-HT tartalmat mérni, nagy valószínűséggel *in vivo* ezekben a szövetekben neurohormonként hathat. A hemolimfa mérhető 5-HT koncentrációja ezt támasztja alá. Az 5-HT a második torakális idegyökér mentén található idegvégződések gazdag hálózatából és kisebb mértékben a központi idegsejtekből juthat a hemolimfába (Beltz és Kravitz, 1983). Az 5-HTerg rendszer szintén hormonális úton szabályozza a rák szív működését, meggyorsítva a szívverés frekvenciáját és erősségét (Cook, 1966).

A puhatestűek idegrendszerére jellemző, hogy az idegsejtek ganglionokba tömörülnek, melyek többsége a nyelőcső kezdeti szakasza körül található, és párhuzamosan futó axon kötegekkel, az úgynevezett konnektívumokkal kapcsolódnak össze. A ganglionokból kilépő idegek a test minden részét beidegezik. A ganglionokon belül található egy idegnyúlványok alkotta komplex központi neuropil régió, melyet gyűrűszerűen körbevesz a sejtestek rétege. Az idegsejtek között előfordulnak óriás méretűek is (200-1000  $\mu\text{M}$ ). A puhatestűek központi idegrendszere viszonylag nagy mennyiségű 5-HT-t tartalmaz. Kerkut és Cottrell (1963) analizálta a *Helix aspersa* agyát, ami 4  $\mu\text{g/g}$  (nedves tömeg) 5-HT-t tartalmazott, míg a köpeny és a szív 1, ill. 3  $\mu\text{g/g}$ . Egyes kagylók központi idegrendszere ennél jóval több 5-HT-t tartalmaz, pl. a *Venus* fajban a ganglionok 5-HT tartalma magasabb, mint 40  $\mu\text{g/g}$  (Welsh és Moorhead, 1960), az *Anodonta* fajban pedig 32-43  $\mu\text{g/g}$  (nedves tömeg) között mozog a szezonális körülményektől függően (Hiripi és mtsai., 1973). Míg az emlősökben az 5-HT tartalmú neuronok a középagy raphe magjaiban koncentrálnak, addig az ízeltlábúakhoz hasonlóan a puhatestűek központi idegrendszerében szétszórtan a főbb ganglionokban, azokon belül is azok kitüntetett régióiban fordulnak elő csoportokat alkotva (Matsutani és Nomura, 1986; Uemura és mtsai., 1987; Kristan és mtsai., 2005).

A puhatestűek törzsén belül a csigáknál vizsgálták a legrészletesebben az egyes, kitüntetett 5-HT tartalmú idegsejt nyúlványrendszerek hálózatát, kapcsolatait és szerepüket a légzésben, mozgásban, táplálkozásban (Chase, 2002). A csigák központi idegrendszerében az 5-HT-IR neuronok döntően a cerebrális és pedális ganglionokban helyezkednek el (Longley és Longley, 1986; Kemenes és mtsai., 1989; Satterlie és mtsai., 1995; Jing és Gillette, 1999; Hochberg, 2007), míg a

bukkális és pleurális ganglionokban nincs vagy csak nagyon kevés fordul elő belőlük. Egyes 5-HT tartalmú sejt homológ megfelelője számos csiga fajban megtalálható, ilyen pl. a cerebrális ganglion elülső régiójában azonosított óriási 5-HT-IR sejt pár, melyből 5-HT tartalmú axonok futnak a cerebro-bukkális konnektívumba, és beidegzik a bukkális gangliont, valamint a pofaizomzat egyes részeit (Granzow és Rowell, 1981; Pentreath és mtsai., 1982; Croll, 1987; Kemenes és mtsai., 1989; Satterlie és mtsai., 1995). Hasonlóan az emlősök és az ízeltlábúak 5-HTerg rendszeréhez a csigák egész központi idegrendszerét sűrűn behálózzák az 5-HT-IR idegrostok, és gazdag 5-HT tartalmú axon hálózat jellemző egyes periférikus szövetekre is, pl. a tapogatókra, a talp hámrétegére, szaporodási szervekre, ajkakra, pofarégióra és a nyelőcsőre (Moroz és mtsai., 1997; Hochberg, 2007). A légzőnyílás, tapogatók és ajkak érző hámrétegében az 5-HT-IR idegrostok glomeruláris szerkezetbe rendeződve találhatóak, mely valószínűsíti az 5-HT érző jelátvivő szerepét (Moroz és mtsai., 1997).

Az 5-HT az összes puhatestű idegrendszerében az egyik legfontosabb neurotranszmitter, szerepe központi és periférikus folyamatok szabályozásában egyaránt fontos (Gerschenfeld, 1973; Walker és mtsai., 1986). A csigák ganglionjaiban található 5-HT-IR sejtek különböző érző és motoros neuronhálózatok intrinsic (belső) elemei, ahol neuromodulátor szerepet töltenek be (Gillette és Davis, 1977; Katz és mtsai., 1994; Kupfermann és Weiss, 1981; McPherson és Blankenship, 1991; Satterlie és Norekian, 1996; Walters, 1991). Ilyen neuronhálózat, pl. a táplálkozást, menekülést vagy mozgást szabályozó motoros (mozgató) neuronhálózat, ahol az 5-HT-IR sejtek belső serkentést (intrinsic excitation) kiváltva a hálózat mintázatgenerálásában vesznek részt, aminek következtében kifejeződik a sztereotipikus motoros mintázat (Mackey és mtsai., 1989; Gillette és Jing, 2001; Jing és Gillette, 2000; Jing és Gillette, 2003). A hálózatok 5-HT-IR sejtjei szenzorikus afferens idegbemenetekkel rendelkeznek, valamint az általuk modulált hálózattól is kapnak szinaptikus visszacsatolást. A táplálkozási rendszer központi mintázatgenerálója a metacerebrális óriás 5-HTerg neuron pár (MGC), aktivációja hat a táplálkozás felvételi szakaszának kezdetére, illetve a „táplálkozás motoros programját” szabályozza különböző csigafajokban (Granzow és Kater, 1977; Pentreath és mtsai., 1982; McCrohan és Audesirk, 1987; Yeoman és mtsai., 1996). A csigák szív működésének idegi szabályozásában is részt vesz az 5-HTerg rendszer, mivel a szívserkentő neuronok egy része 5-HT felszabaduláson keresztül serkenti a

szívizomzat összehúzódását, amit a szívizmokban kimutatható 5-HT-IR axonok jelenléte is alátámaszt (S-Rózsa, 1984; Skelton és mtsai., 1992; Malyshev és mtsai., 1999). Számos szabályozó interneuron játszik szerepet a memória kialakításában és a tanulás folyamatában, melyek közül a legfontosabbak 5-HT-t használnak az ingerület továbbítására (Byrne és mtsai., 1991, Nelson és Alkon, 1997; Kemenes és Benjamin, 1989; Yamanaka és mtsai., 2000).

Csigákban az 5-HT, mint egy általános arousal ("izgalmi") faktor funkcionál (Kupfermann és Weiss, 1981; Sakharov, 1990), mely részt vesz a védekező reflexek mind rövid mind hosszú távú szenzitizációjában (Byrne és mtsai., 1991; Carew és Sahley, 1986). Ezen kívül befolyásolja a táplálkozási „arousal” állapotát *Aplysiában* (Weiss és mtsai., 1978; Rosen és mtsai., 1989), *Helixben* (Pentreath és mtsai., 1982; Hernádi és mtsai., 2004) és *Lymnaeában* (Yeoman és mtsai., 1996) és ezen keresztül szabályozza az étvágyat (Hernádi és mtsai., 2008). Az egyes központi neuronhálózat 5-HTerg elemei kémiai és elektromos szinapszisokon keresztül kapcsolatban állnak egymással, így egy tagolt 5-HTerg rendszert, vagy más néven tagolt arousal hálózatot (distributed arousal network) alakítanak ki (Gillette és Jing, 2001; Jing és Gillette, 2000; Jing és Gillette, 2003). Ez lehetővé teszi az állat környezetéhez és belső állapotához legmegfelelőbb viselkedési forma kifejeződését.

A központi idegrendszerből kilépő és a periférikus szöveteket behálózó 5-HT-IR idegnyúlványokon keresztül az 5-HTerg rendszer képes közvetlenül is szabályozni az élettani folyamatokat és viselkedéseket. *Helix* gyomor-bélrendszere gazdagon innervált 5-HT-IR kötegekkel, amik a központi ganglionból indulnak ki (Hernádi és mtsai., 1998) és a gyomor-bél (gasztrointesztinális) idegrendszer kívülről érkező (extrinsic) eleme lehet. Megfigyelték, hogy a *Helixben* az 5-HT gátolja a bél spontán kontrakcióját, tehát az 5-HT-nak fontos szerepe van a gyomor motilitás szabályozásában (Lehman és Greenberg, 1987; Hernádi és mtsai., 1998). Az 5-HT, nem csak a bélizomzatra fejt ki modulátoros hatást, hanem különböző egyéb perifériás izmok kontrakciójának hosszúságát is képes növelni vagy csökkenteni (Weiss és mtsai., 1978; Cottrell és mtsai., 1983; Lehman és Greenberg, 1987). A tengeri és édesvízi csigák esetében a láb csillókkal borított hámszöveve fontos szerepet játszik az állat mozgásában. Számos megfigyelés támasztja alá, hogy csigák pedális ganglionjában található 5-HTerg sejtek igen erőteljesen innerválják a talp csillós hámfelületét, továbbá az 5-HT jól ismert szabályozója a csillók aktivitásának (Audesirk és mtsai., 1979; Jiang és mtsai., 1998).



Az 5-HT nem csak neuromodulátorként hat a csigákban, hanem a hemolimfában lévő 5-HT periférikusan neurohormonként fejt ki hatását. Az 5-HT a hemolimfába kerülhet a központi vagy perifériális idegrendszerben lévő szinapszisokból (Goldstein és mtsai., 1984; Zhang és mtsai., 1991; Hernádi és mtsai., 1989), de a hemocitákból is a hemolimfába juthat, mivel ezek a sejtek is képesek az 5-HT szintézisére (Stefano és mtsai., 1989). A csigák táplálkozása és mozgása napi ritmust mutat, mely jól követi *Aplysiában* a hemolimfa 5-HT mennyiségének napi ingadozását (Levenson és mtsai., 1999). Számos kísérletben megfigyelték, hogy az állatok mesterségesen megemelt 5-HT szintje intenzívebb viselkedési aktivitást vált ki (Palovcik és mtsai., 1982; Gillette és mtsai., 1997).

Az 5-HTerg rendszer funkciói közé sorolhatók még a szinaptikus plaszticitás és a szinaptikus növekedés szabályozása is (Siegelbaum és Kandel, 1991; Koert és mtsai., 2001)

A katekolaminok közül a DA fordul elő a gerinctelenek törzseiben (Walker és Holden-Dye, 1991). Főleg motoros transzmitterként működik. Továbbá interneuronális transzmitter a gyűrűs férgekben, rovarokban, puhatestűekben (Klemm, 1985). Számos fajban feltérképezték a DA tartalmú neuronok elhelyezkedését. A *C. elegans* hermafrodita egyedeiben 8 neuron, míg hím egyedeiben további 6 neuron szintetizál DA-t (Chase és Koelle, 2007). A 14 neuron mindegyike mechanoszensorikus. A DAerg rendszer szerepet játszik a mozgás szabályozásában és a tanulási folyamatokban, segíti az állatot abban, hogy nyomon követhesse környezetének változásait. A DAerg sejtek képesek érzékelni a táplálék fizikai jelenlétét, aktiválódásuk gátolja a jóllakott féreg mozgásgenerátorának működését, ennek következtében az állat mozgása lelassul (Sawin és mtsai., 2000). Amennyiben a táplálék elfogy, új táplálékforrások keresésének hatékonyságában is szerepet játszik (Hills és mtsai., 2004), így a DAerg rendszer két eltérő funkciót tölt be a mozgási viselkedés szabályozásában. A DAerg befolyásolja a különböző tanulási formákat is, mint a habituáció mechanikai ingerekhez (Sanyal és mtsai., 2004), vagy szagokhoz való adaptálódás (Colbert és Bargmann, 1995).

Ízeltlábúak agyában és a garatalatti ganglionban a DA interneuronokban mutatható ki (Vieillermaringe és mtsai., 1984; Schürmann és mtsai., 1989; Nässel és Elekes, 1992; Homberg, 1994). A legtöbb neuron mindkét oldalon szimmetrikusan elhelyezkedő csoportokba tömörül, vagy párokat alkot, ritka az egyedül álló DAerg sejt. Utóbbi típus közül a garatalatti ganglionokban fordul elő néhány, ezeket angolul

ventral unpaired median (VUM) neuronoknak nevezik. A DA-IR axonok behálózják a gombatest egész területét kivéve a kelyhet, a látólebeny medulla és lobula régióját, valamint a protocerebrum, tritocerebrum és a garatalatti ganglion nem glomeruláris neuropiljét. A rovar agy mindegyik DAerg neuronja nagyon hosszú nyúlványokat bocsát ki, melyek főbb idegkötegekbe csatlakoznak, ahol más típusú neuronok axonjaival futnak együtt. Ez az idegi mintázat feltételezi, hogy a DAerg rendszer inkább szabályozó folyamatokban vesz részt, mint sem helyi idegi kölcsönhatásokban. A *Drosophila* agyában szintén kétoldalian szimmetrikusan helyezkedik el hat, DA tartalmú neuronokból álló csoport, valamint a látólebeny medulla részében is található DA-t termelő sejtek, melyek az agy nagy részét beidegzik (Hamasaka és Nässel, 2006). A házi méh agyában biokémiai és farmakológiai kísérletek igazolták, hogy az 5-HT mellett DA is nagy koncentrációban fordul elő (Fuchs és mtsai., 1989).

Hasonlóan az 5-HTerg rendszerhez a DAerg rendszer is hatással van az ízeltlábúak, pl. *Drosophila* általános aktivitására (Andretic és mtsai., 2005; Kume és mtsai., 2005). A kutatások során metamfetaminnal csökkentették a DA transzporter aktivitását és serkentették a D<sub>1</sub> és D<sub>2</sub> receptorokat, ezáltal megemelték az extracelluláris DA szintet. A vizsgálatokból megállapítható, hogy a DA a rovar izgalmi állapotának (arousal) kulcsszabályozó molekulája. A rovar túl alacsony vagy túl magas DA szintje negatívan befolyásolja a komplex viselkedések végrehajtását, ahogy az emlősökben is előfordul. Az idegi kapcsolatok intenzívebb DA átvitele fokozza a *Drosophila* sztereotipikus viselkedésének aktivitását, pl. nagy mennyiségű DA hatására az állat alvás ideje lerövidül, tovább maradt ébren és mozgása is intenzívebbé válik. Ezzel szemben, ha a DA szint lecsökken az állat alvásideje hosszabb lesz. Hímekben a DA szintje hatással van a párzási viselkedésre is. Megemelkedett DA mennyiség hatására az állat izgatottabbá válik, ez a figyelem rovására megy, így több időt tölt el az udvarlással és a párzással (Andretic és mtsai., 2005). A vizuális érzékelésre is kihat az egyed DA szintje. A normálistól eltérő magas vagy alacsony DA mennyiség látásromlást idéz elő. A gombatestben elhelyezkedő DA útvonal felveti a DAerg rendszer szerepét a memóriában és a tanulásban, azon belül is az averzív tanulásban (Schwaerzel és mtsai., 2003). Rákok szív működésére serkentőleg hat a DA (Ando és Kuwasawa, 2004). Mivel nem tudtak kimutatni DAerg sejteket a szív ganglionban, nagy valószínűséggel neurohormonként viselkedik és a perikardiális szervekből származik.

Tengeri (*Aplysia californica* és *Tritonia diomedea*) és édesvízi csigafajok (*Lymnaea stagnalis* és *Helisoma trivolvis*) központi idegrendszerének DA koncentrációját vizsgálva (McCaman és mtsai., 1979) megállapítható, hogy a pleurális ganglionban található a legkisebb DA koncentráció, míg a pedális ganglion tartalmazza a legtöbbet. Az édesvízi fajok rendelkeznek egy óriási neuronnal, melynek DA tartalma mérhető. Ez a sejt *Lymnaeában* a jobb pedális ganglionban, míg *Helisomában* a bal pedális ganglionban helyezkedik el. Vélhetően homológ megfelelői a *Planorbis corneus* jobb pedális ganglionjában azonosított DA tartalmú óriás sejtnek. Ez a sejt képes serkentő, gátló vagy kétfázisú szinaptikus potenciált kiváltani az őt követő sejteken (Berry és Cottrell, 1975). A DA tartalmú neuronok eloszlása is hasonló képet mutat, főleg a pedális és cerebrális ganglionban fordulnak elő nagy számban, azután a bukkális ganglionban, majd a pleuro-parietális-viszcerális komplexben található a legkevesebb ilyen neuron (Kiehn és mtsai., 2001). A szárazföldi csigafajokban a DAerg idegsejtek ganglionok közötti eloszlása nem igen tér el a vízi csigákban tapasztaltaktól. A *Helix* központi idegrendszerében kisméretű DA-IR sejtek figyelhetők meg a bukkális, cerebrális és pedális ganglionokban, míg a pleuro-parietális-viszcerális komplex mentes DA-IR sejtektől, de tartalmaz DA-IR axonokat (Hernádi és mtsai., 1993). A DA-IR neuronokból axonok nyúlnak a ganglionok neuropiljébe, valamint a perifériális idegeken keresztül kilépnek a ganglionokból is. A DA-IR nyúlványok mintázata alapján feltételezhető, hogy a DAerg neuronok fontos szerepet játszhatnak a szenzoros információk feldolgozásában, ill. a szenzo-motoros rendszer szabályozásában (Hernádi és Elekes, 1999).

DAerg rendszer részt vesz a csigák táplálkozásának és légzésének szabályozásában. A csigák bukkális ganglionjában elhelyezkedő központi mintázatgenerátor kontrollálja a táplálkozási viselkedést, mely szabályozás a szintén itt elhelyezkedő motoros neuronok különböző aktivitási mintázatán keresztül valósul meg. Számos csigafajban sikerült azonosítani olyan DAerg interneuront, mely a táplálkozás központi mintázatgenerátorának belső elemeként, alapvető szerepet tölt be a bukkális motoros mintázat kiváltásában és ritmusának szabályozásában (Yeoman és mtsai., 1995; Quinlan és mtsai., 1997; Kabotyanski és mtsai., 2000). A szájüregből és a nyelőcső elülső szakasza felől a bukkális idegen keresztül kemoszenzorikus afferens bemenetet kap a DAerg interneuron. A csigák légzésének szabályozásáról szerzett ismeretek java része *Lymnaea* vizsgálatából származik,

amely ismertetését a 1.2. fejezet tartalmazza. A DAerg rendszer nemcsak központilag, hanem a periférián is részt vesz a légzés szabályozásában. Swann és mtsai. (1982) *Aplysia* kopoltyú izmaiban DA-IR idegrostokat és varikozitásokat találtak, míg Ruben és Lukowiak (1983) bebizonyították, hogy a DA periférikusan képes befolyásolni a kopoltyú kontrakcióját. A DAerg rendszer kapcsolódik a tanulási folyamatokhoz is. *Aplysiában* közreműködik a nem kondicionált ingerek közvetítésében mind az appetitív klasszikus mind a jutalmazáson alapuló operáns tanulás során (Baxter és Byrne, 2006). Valamint funkciói közé sorolható a szinaptikus növekedés szabályozása is (Dobson és mtsai., 2006).

### **1.2. 5-HT és DA szerepe a nagy mocsári csigában (*Lymnaea stagnalis*)**

A *Lymnaea stagnalis* az összehasonlító neurobiológia egyik kiemelkedő modell állata. Felnőtt *Lymnaea* központi idegrendszerében közel hasonló számban fordul elő 5-HT-IR és DA-IR idegsejt, azonban elhelyezkedésükben és méretükben eltérőek (Kemenes és mtsai., 1989; Elekes és mtsai., 1991). A DA-IR neuronok kis és közepes méretű sejtek (10-40  $\mu\text{m}$ ), míg az 5-HT-IR neuronok közül számos nagyméretű (60-70  $\mu\text{m}$ ) vagy egyenesen óriási (> 70  $\mu\text{m}$ ) található. Vannak olyan idegsejtek, melyek 5-HT-t és DA-t is tartalmaznak, pl. a cerebrális ganglion elülső lebenyében a cerebro-bukkális konnektívum eredésénél található sejtek. Az 5-HT-IR neuronok az egész központi idegrendszerben előfordulnak kivéve a pleurális gangliont, többségük csoportokat alkot, bár néhány külön helyezkedik el a többtől (Kemenes és mtsai., 1989). Az 5-HT tartalmú axonok mindegyik ganglion neuropil régióját gazdagon behálózzák, valamint finom 5-HT-IR rostok és varikozitások mutathatók ki a ganglionokat körülvevő kötőszövetben is. Mindegyik fő kommisszúrában, konnektívumban és idegben megtalálhatóak. Biokémiai mérések kimutatták, hogy a pedális ganglionban található az egész központi idegrendszer 5-HT koncentrációjának az 54,6 %-a. A cerebrális ganglionban 19,2 %, a visceroparietális komplexben 14,1%, a bukkális ganglionban 6,1% fordul elő. A maradék 6%-ot pedig a cerebrális és bukkális ganglionokat összekötő konnektívumban és a laterális, ill. ventrális bukkális idegekben mérték. A ganglionok 5-HT tartalma jól korrelál a bennük azonosított 5-HT-IR neuronok számával. DA-IR sejtek legnagyobb számban a cerebrális ganglionban fordulnak elő, ami a központi idegrendszerben

található DA-IR állomány 50,4%-a, de a teljes DA koncentrációnak csak 34,3%-a (Elekes és mtsai., 1991), ami azzal magyarázható, hogy ebben a ganglionban DA-IR sejtek nagy része kisméretű. A DA koncentráció 45,5%-a a pedális ganglionban mérhető, míg a DA-IR sejtek csak 31%-a fordul elő itt. Azonban ezek a sejtek főleg közepes méretűek, és az óriás DA-IR neuron, az RPeD1 is itt található. A neuropil DA-IR axon arborizációja szintén jelentős. A bukkális ganglion és a pleuro-parietális-viszcerális komplex DA-IR sejtjeinek száma és a DA koncentrációja jól korrelál. Számos periférikus ideg, pl. bukkális ideg, ajak ideg, pedális ideg DA immunfluoreszcens jelölődést mutat, továbbá DA-IR sejtek is előfordulnak egyes periférikus szövetekben, mint nyelőcső, ajak, tapogatók, genitális szervek. Ezek az idegsejtek kisméretűek, bipolárisak vagy multipolárisak. Rövid nyúlványaik a körülöttük található hámszövetbe nyúlnak, míg hosszú axonjaik kötegeket formálva a központi ganglionokba tartanak (Elekes és mtsai., 1991).

Számos tanulmány foglalkozott és írta le az 5-HT és DA élettani és viselkedések szabályozásában betöltött szerepét a felnőtt *Lymnaea*-ban. A légzésben szerepet játszó izmok a viscerális és a jobb parietális ganglionban található motoros neuronoktól kapnak beidegzést (Syed és Winlow, 1991). A motoros neuronok működését a légzés központi mintázat generátorának három interneurona szabályozza, az egyik interneuron az úgynevezett RPeD1 DA tartalmú idegsejt (Syed és mtsai., 1990; Magoski és mtsai., 1995; Croll és mtsai., 1999). Ez az óriás DA-IR neuron felelős a légzés beindulásáért és fenntartásáért, valamint moduláló hatást fejt ki a másik két interneuron aktivitására is (Syed és mtsai., 1990; Barnes és mtsai., 1994; Inone és mtsai., 2001). Syed és mtsai. (1990) az RPeD1 és a DA aktivizáló hatását tenyésztett ideghálózaton (culture network) is letesztelték. Az RPeD1 neuron több funkciós szereppel rendelkezik. Azon túl, hogy a légzés központi mintázat generátorának egyik interneurona, koordinálja a vízfelszínre bukkanó *Lymnaea* légzőnyílásából érkező érző-motoros bemeneteket is, melyek hatására beindul a csiga légzése (Haque és mtsai., 2006).

A szívben a fő monoamin az 5-HT, de a DA is jelen van, még ha kisebb koncentrációban is (Buckett és mtsai., 1990). Mindkét monoamin megemeli a szívverés frekvenciáját és amplitúdóját. Hill, Welsh és Jones is lehetséges transzmitternek tartják a csigák szívében ezeket az aminokat (Hill és Welsh, 1966; Jones, 1983). A monoaminok mint neurotranszmitterek a motoros neuronok idegvégződéseiből felszabadulva kerülhetnek a szívbe. Eddig két motoros neuront

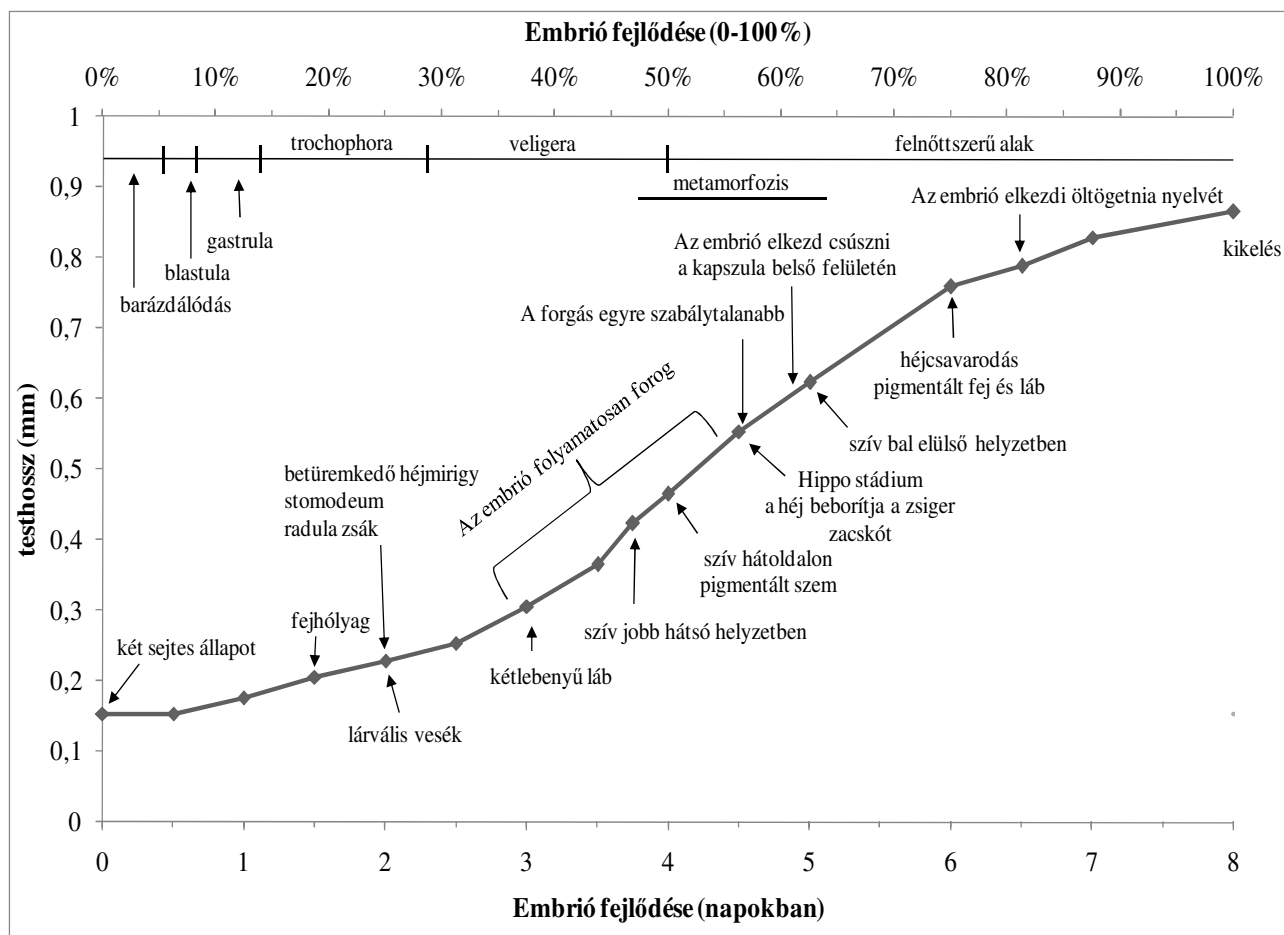
(Hhe és She) sikerült azonosítani a *Lymnaea* központi idegrendszerében, melyek 5-HT felszabaduláson keresztül serkentik a szív működést (Buckett és mtsai., 1990b). A légzési mintázat generátor három interneuronja is hatással van a szívverésre, ezek közül az egyik a már előbb megismert DA tartalmú RPeD1 sejt. Ezek az interneuronok ingerületbe képesek hozni a szív serkentő motorneuronjait, illetve gátolni a szív gátló motorneuronját.

Egyik jól vizsgált viselkedési forma *Lymnaea* esetében a csúszó mozgás. Pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálatok felfedték, hogy a csiga talpát sűrű csillók alkotta szőnyeg borítja (Syed és mtsai., 1988). Mozgása során a csiga ezekkel a csillókkal halad előre, de a talp izmai és a testfal segítségével úgynevezett sodró mozdulatra is képes. Syed szerint a pedális ganglionból eredő 5-HT tartalmú idegrostok mélyen beidegzik a lábat. Semi-intact preparátumokon végzett kísérletei során a pedális ganglionban lévő úgynevezett A csoport sejtjeinek ingerlése kiváltotta a csillók intenzívebb mozgását, valamint a nyál tartalmú sejtek fokozottabb elválasztását. A talpba injektált 5-HT pedig gyorsabb csillómozgást váltott ki. Pavlova és Bakeeva (1993) farmakológiai kísérletei megerősítették, hogy ez a szabályozás igen is ingerlő jellegű. McKenzie HPLC-s módszerrel kimutatta, hogy a *Lymnaea* lábában hasonló mennyiségben mind az 5-HT mind a DA jelen van (McKenzie és mtsai., 1998), és feltételezte, hogy a DA is egy lehetséges modulátorra a csilló mozgásnak. Ezt a feltételezést támasztják alá Tsyganov és Sakharov eredményei (1999) is.

Egy másik viselkedésforma, a táplálkozás szabályozásában is szerepe van a két monoaminnak. A cerebrális óriási sejt (CGC- cerebrális giant cell) mint extrinsic modulátor interneuronja a táplálkozási mintázatgenerátornak az egyetlen 5-HT tartalmú neuron, ami része a táplálkozási neuronhálózatnak. A hálózat szinte minden tagját innerválja és serkentőleg hat rájuk (Straub és Benjamin, 2001). A CGC nem csak a hálózat tagjaival áll kapcsolatban, hanem 5-HTerg axonjai a pofarégió izomzatát is beidegzik (Benjamin, 1983; Pentreath és mtsai., 1982), így az idegvégződésekből felszabaduló 5-HT közvetlenül is hat a táplálkozásban résztvevő izmokra. *Lymnaeában* sem a táplálkozási mintázatgenerátor sem a táplálkozási neuronhálózat tagjaként még nem sikerült DA tartalmú neuronokat kimutatni csak *Aplysiában* és *Helisomában*. Ezért feltételezhetjük, hogy *Lymnaeában* is részt vesznek a mintázatgenerátor intrinsic elemeként a táplálkozás szabályozásában.

### 1.3. A nagy mocsáricsiga egyedfejlődése

A nagy mocsáricsiga (*Lymnaea stagnalis*) a csigák (*Gastropoda*) osztályába, azon belül a tüdőcsigák (*Pulmonata*) rendjébe, a *Lymnaeidae* családba tartozó faj. A csiga hímnős, többnyire két egyed kölcsönösen megtermékenyíti egymást. Az egy alkalommal kibocsátott mintegy 200-300 petét kocsonyás anyag burkolja be, ami védelmet nyújt a ragadozó halakkal szemben. Az édesvízi csigák, mint a *Lymnaea*, *Helisoma*, *Planorbis*, *Physa* lárvális fejlődésére jellemző, hogy az egész folyamat a petezsákon belül történik szemben a tengeri puhatestűek szabadon úszó lárváival. A petekapszulán belül minden egyes pete áthalad a blasztula, gasztrula, trochophora és veligera állapotokon majd keresztül esik egy metamorfózison, ami után már úgy néz ki, mint a felnőtt egyedek miniatűr mása. Az átlátszó peteburok miatt az egész fejlődés jól nyomon követhető. A folyamat 25 °C hőmérsékleten körülbelül 8 napig tart. A faj morfológiai és organogenezisééről jelentős ismeretanyag áll rendelkezésre (Raven, 1958; Morrill, 1982; Mescheriakov, 1990). Az ismeretek felhasználásával a fejlődés egyes stádiumai könnyen beazonosíthatóak egyszerű mikroszkóp alatt is, ehhez támpontot nyújtanak egyes szervek, testrészek megjelenése, továbbá a szem és a kültakaró pigmentációjának kezdete, valamint egyes viselkedési formák megjelenése, mint forgó mozgás, csúszó mozgás, reszelő nyelv öltögetés (7. ábra). Az embrionális fejlődési állapotokat százalékban fejezik ki, ahol a 0% az első barázdálódásnak felel meg, a 100% pedig a kapszulából való kikelésnek (Marois, 1989). A kikelt állat testfelépítésben a felnőtt egyed kicsinyített változata, de szaporodásra még nem képes.



**7. ábra A nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) egyedfejlődésének sematikus ábrázolása (módosított ábra, Morrill 1982).**

Az embrió hossz növekedését láthatjuk a fejlődés függvényében, valamint egyes morfológiai tulajdonságokat és viselkedési formákat, melyek segítenek a fejlődési állapot meghatározásában.

#### 1.4. Az 5-HT és DA rendszer embriógenézise

Az 5-HT és DA tartalmú sejtek a fejlődés során már korán megjelennek, majd párhuzamosan fejlődnek a központi idegrendszer elemeivel a ganglionokkal. Marois és Croll (1992) immunhisztokémiai módszerrel nyomon követték az 5-HT tartalmú sejtek és axonok megjelenését, fejlődését az embrionális élet során. Az első 5-HT immunreaktivitást mutató sejtek a fejlődő cerebrális ganglion területén megjelenő C4 nevű páros sejt, melyek a cerebrális kommisszúrán át nyúlványt küldenek az átellenes oldalon lévő cerebrális ganglionba. Itt mindegyik axon futása elkanyarodik majd tovább haladnak a cerebrális-pedális konnektívumon keresztül lefelé a fejlődő láb felé. Mintegy 2-3 %-al későbbi stádiumban, a pedális ganglionokban is



megjelennek az első 5-HT tartalmú sejtek, az úgynevezett Epe1 sejtek. Hasonlóan a C4 sejtekhez, axonokat bocsátanak ki a fejlődő láb felé. A további fejlődés során egyre nő az 5-HT tartalmú idegsejtek száma a központi idegrendszerben. A sejtek többsége sejtcsoportokba tömörül, sokuk azonosítása csak a csoport meghatározására terjed ki. A cerebrális ganglionokra jellemző, hogy az embrionális élet végére a CF csoport összes tagja megjelenik, köztük a C1 metacerebrális óriás sejt, melynek nyúlványai behálózzák a bukkális gangliont. Más sejtcsoport, mint a CC, CB és CD egyes tagjai is kimutathatóak, de a létszám nem teljes, mivel a kikelés utáni posztembrionális fejlődés során a csoportok létszáma tovább duzzad (Croll és Chiasson, 1989). A pedális ganglionokra jellemző, hogy az 5-HT tartalmú idegsejtek száma igen intenzíven növekszik, és az innen kiinduló axonok egyre sűrűbben hálózzák be a fejlődő láb területét. Idővel a cerebrális és pedális ganglionokból eredő 5-HT-IR axonok megjelennek az abdominális gyűrűben is, ami összeköti a pleurális, parietális és viscerális ganglionokat. A fejlődés későbbi szakaszaiban megjelennek a juvenilis korra jellemző 5-HT tartalmú idegsejtek. A bal parietális és pleurális ganglionok nem tartalmaznak 5-HT-IR idegsejteket csak rostokat. Az egész embrionális szakasz során nem jelennek meg 5-HT tartalmú idegsejtek a periférián.

A DA tartalmú sejtek megjelenését és fejlődését Voronezhskaya és munkatársai tárták fel a nagy mocsárcsiga embriókban (1999) szintén immunhisztokémiai módszer alkalmazásával. Az 5-HT-nal szemben a DA tartalmú sejtek nem csak a központi idegrendszerben, hanem a periférián is megtalálhatóak az embrióban. Így van ez a fejlődés 32-35% szakaszában elsősre megjelenő, kétoldalt a szájtól mintegy dorzolaterális irányban elhelyezkedő szimmetrikus DA tartalmú sejtekkel is. A kikelés előtt ezek a sejtek már nem láthatóak, ezért átmeneti anteriorális katekolamin tartalmú sejteknek nevezik. Egy vagy két hosszú axont küldenek az apikális rész felé, amik szétágazódva varikóz rostok hálózatát hozzák létre. Oldalirányú vastag nyúlványaik az epitéliumon áthaladva az apikális és kefalikus rész határán található csillóknál végződnek. A későbbiek során a láb mindkét oldalának elülső részén további DA tartalmú sejtek jelennek meg, ezek száma a fejlődés során gyorsan nő, amihez csatlakoznak a száj körül, illetve a tapogatókban megjelenő további DA tartalmú sejtek. A lábban lévő sejtek axonokat küldenek a pedális ganglionok neuropiljeibe, míg a száj körüliek a cerebrális ganglionok neuropiljeibe. A metamorfózis után jelennek meg csak DA tartalmú sejtek a központi idegrendszerben, először a cerebrális ganglionokban. Ezek a sejtek

axonjaikon keresztül, beidegzik a központi neuropilt, illetve a cerebrális-pedális konnektívumon keresztül a pedális ganglionokat is. Később a jobb pedális ganglionban is megjelenik egy sejt, az úgynevezett RPeD1 sejt, melyet behatóan tanulmányoztak már a felnőtt egyedek központi idegrendszerében. Időközben a cerebrális ganglion DA tartalmú sejtjei axonjaikkal behálózzák a bukkális ganglion középső részét. Kikelésig a periférián előforduló DA tartalmú sejtek száma drámaian megnő, megtalálhatóak most már a nyelőcsőben és a pofa régióban is. A pedális ganglionokban is már előfordul a DA-IR sejteknek egy vagy két csoportja.

Nagyon kevés ismerettel rendelkezünk az 5-HT és a DA szerepéről a *Lymnaea* embriógenézisének vagy embrionális viselkedésének szabályozásában. Voronezhskaya és kollégái (2004) vizsgálták *Lymnaea stagnalis* és *Helisoma trivolvis* embriókon az apikális elhelyezkedésű érző neuronok szerepét az egyedek fejlődésének szabályozásában. Kedvezőtlen életkörülmények között *Helisoma* esetében 5-HT, *Lymnaea* esetében DA szabadul fel ezekből a sejtekből, melyek hatására lelassul a fejlődés, amíg kedvezőbbé nem válik a környezet. Más puhatestű fajon elvégzett kísérletek rávilágítottak a monoaminok szerepére a metamorfózisban (Pires és mtsai., 2000; Leise és mtsai., 2001; Pechenik és mtsai., 2002). Továbbá felvetődött szerepük a szinaptogenezisben, az idegnyúlványok növekedésében, illetve a növekedés irányának meghatározásában (Diefenbach és mtsai., 1995; Spencer és mtsai., 1998).

Nem csak az egyedfejlődésben, hanem az embriók viselkedésében is szerepet tölthetnek be, ahogy ez a *Helisoma trivolvis* esetében bebizonyosodott. A *Helisoma* embriókban az apikális sejtek nyúlványokat küldenek a talpban elhelyezkedő csillós hámsejtekhez (Kuang és Goldberg, 1991; Koss és mtsai, 2003). Különböző kísérleti beavatkozást (5-HT adása, a sejtek lézeres roncsolása, vagy pCPA kezelés) követően bizonyítást nyert, hogy ezeknek a sejteknek 5-HT neurotranszmitter használatával szerepük van a csillók aktivitásának és ezen keresztül a forgásnak a szabályozásában (Diefenbach és mtsai., 1991; Kuang és Goldberg, 2001; Doran és mtsai., 2004). Anatómiai adatok alátámasztják, hogy ezek az apikális sejtek kettős funkciót töltenek be, egyszerre motoros és érző neuronok is, mivel apikális nyúlványokkal is rendelkeznek az embrió testfelszíne felé. A legújabb kutatások alapján az apikális sejtek képesek érzékelni a környezet lecsökkent oxigén tartalmát (hipoxiás állapot), aktiválják a csillós sejteket, felgyorsítva az embrió forgását, ennek hatására keveredik a kapszula folyadék és a környezetből az oxigén hatékonyabban

képes az embrióhoz eljutni (Goldberg és mtsai., 2008). A jelátadás 5-HT<sub>1</sub> és 5-HT<sub>7</sub> típusú receptoron keresztül történhet.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Az Irodalmi áttekintésből látható, hogy számos tanulmány született az 5-HT és a DA szerepéről a felnőtt csigák, így a mocsári csiga idegrendszerében, viselkedésében. Azonban csak kevés ismerettel rendelkezünk arról, hogy milyen szerepet töltenek be a fejlődő embrió szervezetében. Más puhatestű fajon végzett ilyen irányú kísérletek száma is kevés, ezért szükségessé vált egy összehasonlító és részletes farmakológiai vizsgálat elvégzése, kiterjesztve egyes embrionális viselkedésekre is, hogy pontosabban megvilágítsa az 5-HT és DA rendszer funkcióját az embriógeneszis során. Az így nyert ismeretek mélyebb bepillantást tehetnek lehetővé a felnőtt *Lymnaea* sokszínű viselkedésének kialakulásába és idegrendszeri hátterébe. Eredményeink egyben az 5-HTerg és DAerg rendszerek evolúciójának és általános összehasonlító vonatkoztatásainak aspektusait is gazdagítják. Ezért jelen munkánk célja a következő volt:

- biokémiai módszerekkel nyomon követni a fejlődő embrió 5-HT és DA szintjének változását az egyedfejlődés során
- meghatározni szintézisük módját az embrióban, a résztvevő enzimeket jellemezni
- kideríteni van-e szerepük a fejlődés szabályozásában
- megállapítani, van-e hatásuk egyes embrionális viselkedésre, mint a forgómozgás, csúszás a kapszula belső felszínén, vagy a radula mozgatása, továbbá egyes fiziológiai folyamatokra, mint a szívverés
- farmakológiailag jellemezni az 5-HTerg és DAerg szabályozásban résztvevő receptoraikat

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Kísérleti állatok tartása

A nagy mocsári csigák (*Lymnaea stagnalis*) felnőtt egyedeit a Kis-Balaton csatornáiból gyűjtöttük tavasztól-őszig, majd laboratóriumi akváriumokban tartottuk és neveltük tovább. Az akváriumokba a vizet a Balatonból nyertük, azt folyamatosan levegőztettük és hetente cseréltük. A víz hőmérsékletét 20-25 °C-on tartottuk. A felnőtt és juvenilis egyedeket salátával etettük. Az így tartott mocsári csiga állomány folyamatosan ellátott minket a munkánkhoz szükséges petezsák mennyiséggel. Morrill (1982) és Mescheriakov (1990) megfigyeléseit alapul véve, az embriók fejlődési állapotát morfológiai, morfometriai és viselkedésbeli tulajdonságok specifikus összerendeződése alapján állapítottuk meg. A fejlődési állapotokat a teljes embrionális fejlődés százalékában fejeztük ki, melyben a 0% az első sejtosztódásnak, míg a 100% a kikelésnek felel meg (7. ábra) (Marois és Croll, 1992).

#### 3.2. HPLC analízis

##### 3.2.1. Monoamin szint mérése

Az embrió endogén DA és 5-HT szintjének meghatározásához egy petezsákból véletlenszerűen 25 db embriót szedtünk ki minden egyes fejlődési stádiumnál 12-100% között (12, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 60, 75, 80, 85, 100). A kiszedett embriókat, miután a kapszula burkot is eltávolítottuk, 1,5 ml Eppendorf csőbe helyeztük és elhomogenizáltuk ultraszonikus homogenizálóval (4710 modell, Cole-Parmer, Chicago, USA; 50W, 30%-s pulzálási erővel 15 másodpercig) 100 µl jéghideg 0,1 N perklórsavban, ami 1 pmol/µl izoproterenolt mint belső sztenderdet tartalmazott. A homogenizátumot egy éjszakára lefagyasztottuk, majd újra homogenizáltuk. Ezt követte egy 10 perces centrifugálás 4 °C-on, 13000 g erősséggel. A tiszta felülúszóból 80 µl-t közvetlenül beinjektáltunk a Waters HPLC rendszerbe (Milford,

USA). Ez a rendszer egy pumpából (1500 modell), egy injektorból (717 plus Auto sampler), egy elektrokémiai detektorból (460 modell) és egy kolonna fűtőből (Waters) állt és ezt mind egy 4-s verziószámú Millennium szoftver vezérelte. A monoaminok szétválasztása Lichrospher 100-5 RP-18 vagy Waters 5  $\mu\text{m}$  Spherical C<sub>18</sub> oszlopon történt. A folyadék fázist 0,1 M foszfát puffer (pH 4), 1 mM EDTA, 1 mM oktánszulfonsav és 10% metanol alkotta. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt, az injektor hőmérséklete 10 °C-ra, míg az oszlop hőmérséklete 40 °C-ra volt állítva. A detektor feszültsége + 0,65 V volt. Ugyanezt a módszert alkalmaztuk farmakológiailag kezelt embriók megváltozott monoamin szintjének meghatározására. Minden egyes HPLC mérést háromszor ismételtük meg.

### 3.2.2. Tirozin hidroxiláz aktivitás mérése

Hetven darab 90%-os stádiumban lévő embriót véletlenszerűen kiszedtük a petezsákból és elhomogenizáltunk 200  $\mu\text{l}$  *Lymnaea* fiziológiás sóoldatban (40 mM NaCl, 1,7 mM KCl, 1,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 4 mM Ca<sup>2+</sup> és 10mM Tris-HCl; pH 7,4), majd 10 percig centrifugáltuk 12500 *g* erősséggel, 4 °C-on. Későbbiekben ezt a homogenizátumot használtuk enzim forrásként. Az enzim működésére jellemző paraméterek megállapításához állandó enzimkoncentráció jelenlétében változtattuk a szubsztrát koncentrációját és mértük a keletkezett termék mennyiségét. Az inkubációs elegy 200  $\mu\text{l}$  térfogata 80  $\mu\text{l}$  homogenizátumot, 1 mM 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetra-hidropterint, 1 mM vas-ammónium szulfátot, 0,15 mM kálium foszfát puffert (pH 6) és szubsztrátként 0,15-4 mM között változó koncentrációban L-tirozint tartalmazott. A vakként használt minta nem tartalmazott szubsztrátot. Az inkubációt 37 °C-on, 20 percig végeztük, a reakciót 100  $\mu\text{l}$ , 0,2 N perklórsav (mely tartalmazott 0,7 pmol/ $\mu\text{l}$  izoproterenolt, 0,05% EDTA-t és 0,1 % Na-diszulfidot (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)) hozzáadásával állítottuk le. Ezután 1 ml 1 M Tricin puffert (pH 8,6; tartalmazott 0,05% EDTA és 0,1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) és 1 mg alumínium-oxidot adtunk a mintákhoz. A mintákat 20 percig ráztuk, hogy a katekolaminok az alumínium-oxid felületére adszorbeálódjanak, majd az alumínium-oxidot mostuk egyszer 1ml 1 M Tricin pufferrel (pH 8,6) és kétszer desztillált vízzel. A katekolaminokat 150  $\mu\text{l}$  0,1 N perklórsav hozzáadásával távolítottuk el az oxid felületéről. A HPLC rendszerbe 90  $\mu\text{l}$  tiszta felülúszót injektáltunk be. A rendszerben keringő folyadék fázis 0,1 M foszfát

puffert (pH 3), 0,1 mM EDTA-t, 0,25 mM oktánszulfonsavat és 6% metanolt tartalmazott. A mérést legalább háromszor megismételtük.

### 3.2.3. Dekarboxiláz enzim aktivitás mérése

Dekarboxiláz enzim aktivitását 35%-os állapotból kiindulva folyamatosan mértük a kikelés előtti 95%-os fejlődési állapotig. A fejlődés során a petezsákokból véletlenszerűen 20 db embriót szedtünk ki, majd elhomogenizáltuk 200  $\mu$ l 0,1 M foszfát pufferben (pH 7). A homogenizátum szolgált enzim forrásként. Mivel az irodalmi adatok arra utalnak, hogy ez az enzim mind az 5-HT mind a DA szintézisében részt vesz, kísérleteinkben két szubsztrátot használtunk, L-DOPA-t és 5-HTP-t. A 200  $\mu$ l végtérfogatú inkubációs elegy tartalmazott 0,02 mM pargilint, 0,3 mM piridoxál-5 foszfátot, 2 mM L-DOPA-t vagy 0,1 mM 5-HTP-t és 40  $\mu$ l szövet homogenizátumot. A kinetikai elemzések során az L-DOPA koncentrációját 0,1-2 mM között, míg az 5-HTP koncentrációját 0,0025-0,1 mM között változtattuk. A vak minta nem tartalmazott szubsztrátot. Az inkubációt szobahőmérsékleten 20 percig végeztük. Mivel az inkubációs elegyben, magas koncentrációban szubsztrátként szereplő, valamint a szövetben jelenlevő aminosavak a reakció során képződött monoaminok detektálását zavarhatják, folyékony ioncserés módszerrel választottuk el az inkubációs elegyből az 5-HT-t és a DA-t. A módszer a monoaminoknak azt a tulajdonságát használja ki, hogy semlegeshez közeli pH értéken nagyobb affinitással kötődnek kation cserélő gyantához, mint aminosav prekurzorai, így azoktól szelektíven elválaszthatók, majd savas oldattal eluálhatók a gyantáról. Az inkubációs elegyhez jéghideg 500  $\mu$ l 0,1 pmol/ $\mu$ l izoproterenolt (50 mM pH 7-es foszfát pufferben feloldva) és 500  $\mu$ l 0,1 M di-(2-etilhexil)-foszforsavat (DEPHA) tartalmazó kloroformot adtunk, majd 10 másodperces rázás és ezt követő 5 perces centrifugálás (5 °C, 12500 g) után eltávolítottuk a felső vizes fázist. A DEPHA oldat 400  $\mu$ l-hez 100  $\mu$ l 0,1N-os sósav oldatot adtunk. Rázás és centrifugálás után a felülúszó sósavas fázisból 60  $\mu$ l injektáltunk be a HPLC rendszerbe. Hasonló módon jártunk el, amikor az enzim aktivitását *in vitro* kísérletben karbidopával (0,0001-100  $\mu$ M), Nsd-1015-el (0,001-200  $\mu$ M) és  $\alpha$ -metil-DOPA-al (0,001-1000  $\mu$ M) 20 percig gátoltuk. Minden mérést legalább háromszor megismételtük.

### 3.3. Farmakológiai kezelések

#### 3.3.1. Az embrionális fejlődés nyomon követése

A veligera lárvákat (40%) eltávolítottuk a petezsákokból és Petri csészékbe helyeztük őket, úgy hogy minden csészébe 20-25 embrió került. A kontroll csoportban az embriókra 5 ml szűrt Balaton vizet öntöttünk, míg a farmakológiailag kezelt csoportoknál az adott kémiai farmakon oldatát (1. táblázat, mindegyik kémiai anyag a Sigma Chemical vállalattól származik) 0,001-1 mM közötti koncentrációban. Az embriók fejlődését folyamatosan nyomon követtük sztereo mikroszkóp segítségével, az egyes fejlődési stádiumokat pedig Morrill (1982) és Mescheriakov (1990) által leírt specifikus morfológiai és viselkedésbeli tulajdonságok alapján határoztuk meg. Mindegyik kezelést legalább négyszer végeztük el. Az eredmények kiértékelése után a legkisebb, de még hatásos (küszöb) koncentrációkkal dolgoztunk tovább hasonló módon kezelve az embriókat, hogy megállapítsuk a monoamin szintjük változását. A monoamin szintet közvetlenül kikelés előtt mértük mind a kontroll mind a kezelt egyedekben HPLC módszerrel (3.2.1 fejezet). A kontroll csoportokban mért mennyiségeket 100%-nak vettük. A kezeltékben mért monoamin szintet a kontroll értékekkel összehasonlítva megállapítottuk a változás mértékét, amit százalékban fejeztünk ki. Mindkét vizsgálat során az oldatokat naponta frissre cseréltük.

Prekurzor	Enzimgátló	Cél enzim	Neurotoxin
L-triptofán	p-klórfenilalanin (pCPA)	triptofán-hidroxiláz	5,7-dihidroxitriptamin (5,7-DHT)
tirozin	3-hidroxibenzilhidrazin (Nsd-1015)	aromás-L-aminosav dekarboxiláz	6-hidroxi-dopamin (6-OH-DA)
	$\alpha$ -metil-p-tirozin ( $\alpha$ MPT)	tirozin hidroxiláz	N,metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)
			1-metil-4-fenilpiridinium jodid (MPP <sup>+</sup> jodid)

1. táblázat. Az embriógenézis befolyásolására alkalmazott farmakonok.



### 3.3.2. Embrionális viselkedések elemzése

5-HT, DA és aminerg farmakonok (2. táblázat; mindegyik kémiai anyag a Sigma Chemical vállalattól származik) hatását vizsgáltuk három embrionális viselkedési formára, úgymint forgó mozgás, csúszó mozgás és a reszelő nyelv (radula) mozgatása, valamint egy élettani folyamatra a szívverésre. Voronezhskaya és munkatársainak (1999) tanulmánya alapján a forgó mozgást 35-40%-os fejlődési állapotban, a szívverést metamorfózis után 75%-os állapotban, a kapszula belső felületén történő csúszó mozgást 85%-os állapotban, míg a radula mozgást közvetlenül kikelés előtt 95%-os stádiumban lévő embriókban vizsgáltuk. Az embriókat kapszulával együtt véletlenszerűen kiszedtük a petezsákból, majd kis üvegcikrában lévő szűrt Balaton vízbe helyeztük. A szív és a szájmogás esetében, 10 perces inkubáció után sztereo mikroszkóp alatt megszámloltuk az 1 perc alatt bekövetkezett szívverést, illetve a nyelv kinyújtását. Szintén 10 perces inkubáció után kezdtük meg a csúszó mozgás sebességének a meghatározását, de a számolás 5 percig tartott. Az így szerzett adatok szolgáltak kontroll értéként. Ezután a vizet lecseréltük a farmakonokat tartalmazó oldatokra, majd 5-10 perc elteltével a korábbi módon meghatároztuk a mozgások és a szívverés sebességét. A forgó mozgás esetében hasonló módon jártunk el, csak az 5 perces inkubálást egy 2 perces számolási fázis követte. A kezelések során kapott értékeket a kontroll csoport értékeivel hasonlítottuk össze, az eltérést százalékban fejeztük ki. Minden kezelés esetében a vizsgálat átlag értéke legalább 20 embrió viselkedéséből adódik, melyek legalább két különböző petezsákból származnak.

5-HT agonisták	hatás	5-HT antagonisták	hatás
5-karboxiamidotriptamin (5-CT)	5-HT <sub>1</sub>	ketanszerin	5-HT <sub>2</sub>
2,5-dimetoxi-4-jodoamfetamin (DOI)	5-HT <sub>2</sub>	7-metiltriptamin	nem szelektív
N,N-dimetiltriptamin (DMT)	nem szelektív	metiszergid	5-HT <sub>1</sub> , 5-HT <sub>2</sub>
8-hidroxi-dipropilaminotetralin (8-OH-DPAT)	5-HT <sub>1</sub>	mianszerin	5-HT <sub>2</sub>
5-hidroxitriptamin (5-HT)		brom-lizergsav dietilamid (BOL)	
D-lizergsav dietilamid (LSD)	nem szelektív		
1-(2-metoxifenil) piperazin (2-MPP)	5-HT <sub>1</sub>		
2-metilszerotonin	5-HT <sub>2</sub>		
triptamin	nem szelektív		

DA agonisták	hatás	DA antagonisták	hatás
apomorfin	nem szelektív	flupentixol	nem szelektív
bromokriptin	D <sub>2</sub>	klórpromazin	nem szelektív
dopamin		SCH-23390	D <sub>1</sub>
m-tiramin	nem szelektív	szulpirid	D <sub>2</sub>
p-tiramin	nem szelektív		
SKF-38393	D <sub>2</sub>		

**2. táblázat. Az embrió viselkedéseinek befolyásolására alkalmazott farmakonok.**

### 3.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Minden egyes kezelés során, a petezsákból kiszedtünk 70 db veligera lárvát (40%) és két csoportra osztottuk; az egyik csoportot szűrt Balaton vízben neveltük, míg a másik csoportot 0,01 mM p-klórifenilalanin (pCPA; triptofán-hidroxiláz gátló) vagy 0,1 mM 3-hidroxibenzilhidrazin (Nsd-1015; dekarboxiláz gátló) oldatban. A triptofán-hidroxiláz gátló esetében az 5-HT tartalom változását 60%-os és 85%-os, míg a dekarboxiláz gátló esetében 75%-os fejlettségi állapotot elért embriókban néztük meg immunhisztokémiai módszerrel. Az embriókat körülvevő burkot és a külső vázat (csigahéj) eltávolítottuk, majd 0,1 M foszfát pufferben oldott 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk őket 16 óráig 4 °C-on. A preparátumokat többször mostuk foszfát pufferes sóoldattal (FPS), majd ezt követően először 1 óráig inkubáltuk őket 4% Triton X-100-at tartalmazó FPS-ben (FPS-TX), majd ismét 1 óráig 0,25% marha szérum albumint tartalmazó FPS-TX-ben. A mintákat monoklonális (egér) anti-5-HT elsődleges antitesttel (Dako, Kopenhagen, Dánia) egész éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. Az antitestet 1:500 arányban hígítottuk FPS-TX-ben. Inkubálás után a preparátumokat 3 x 10 percig FPS-TX-ben mostuk, majd 4 órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk fluoreszcens izotiocianáttal (FITC, Dako) kapcsolt egér ellen termeltetett másodlagos antitesttel, melyet 1:50 arányban hígítottunk FPS-TX-ben. Mosás (FPS) után a preparátumokat glicerin és FPS 3:1 arányú elegyében helyeztük, majd Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk. A fényképezéshez Canon PS G5 típusú digitális kamerát használtunk.

### 3.5. Ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) analízis

Ötven 90%-os fejlettségű embrió 5 percig inkubáltunk 250 µl fiziológias oldatban, ami tartalmazott 0,5 mM izobutimetilxantint (IBMX), 0,1 mM guanozin-5-trifoszfátot (GTP) és 0,1 mM 5-HT-t vagy LSD-t, majd 0,5 mM adenzin-5-trifoszfát (ATP) adtuk az elegybe és tovább inkubáltunk még 10 percig szobahőmérsékleten. Ezután az elegyet centrifugáltuk, a folyadékot leszívtuk és az embriókat elhomogenizáltuk 1 ml savas etanolban (1 ml 1N HCl/100 ml etanol). A homogenizátumot ezután lecentrifugáltuk, majd a felülúszót liofilizáltuk. Az üledéket újraszuszpendáltuk 50 mM Tris-EDTA pufferben. Egy újabb centrifugálás után a felülúszóból 50 µl kivettünk és megmértük a cAMP koncentrációját fehérje kötődési módszert alkalmazva. A méréshez az Amersham cég előre összeállított készletét használtuk a mellékelt utasítások alapján. Kontroll cAMP koncentráció meghatározásakor az inkubációs elegy sem 5-HT-t sem LSD-t nem tartalmazott.

### 3.6. A <sup>3</sup>H-5-HT kötődés vizsgálata

Metamorfózis előtti embriókat kiszedtük a petezsákból és 40 térfogat 0,05 M pH 7,4-es Tris-HCl pufferben homogenizáltuk Polytron PT10-es homogenizátorral. Ezután a homogenizátumot négyszer centrifugáltuk 4°C-on, 30000 g fordulatszámon, 30 percig, közbenső re szuszpendálással. A második centrifugálás után a re szuszpendálást követően az elegyet 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk az endogén ligand teljes eltávolítása céljából. Az <sup>3</sup>H-ligand kötődésének vizsgálatokor 2 mg pelletet inkubáltunk 1 ml Tris-HCl pH 7,4-es pufferben. A kötődés kinetikai paramétereinek meghatározásakor az elegy 0,25-10 nM koncentrációtartományban <sup>3</sup>H-5-HT-t tartalmazott. A leszorításos kísérletekben 5 nM <sup>3</sup>H-5-HT mellett a következő farmakonokat alkalmaztuk: 5-CT, spiperon, WAY100635, 8-OH-DPAT. Az elegyet szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk, majd az inkubálást GF/C üvegszálás szűrőn át történő gyors vákuumszűréssel fejeztük be. A szűrőpapírt 2-szer mostuk 5 ml hideg pufferrel, majd 10 ml toluol triton-X 100 alapú szcintillációs folyadékba tettük és 24 órán keresztül extraháltuk, majd a radioaktivitást mértük. A nem specifikus kötődést 10 nM hideg 5-HT jelenlétében mértük. Radioaktív ligandként 5-hidroxi <sup>3</sup>H triptamin trifluoroacetátot (Amersham) használtunk.

### 3.7. Statisztikai kiértékelés

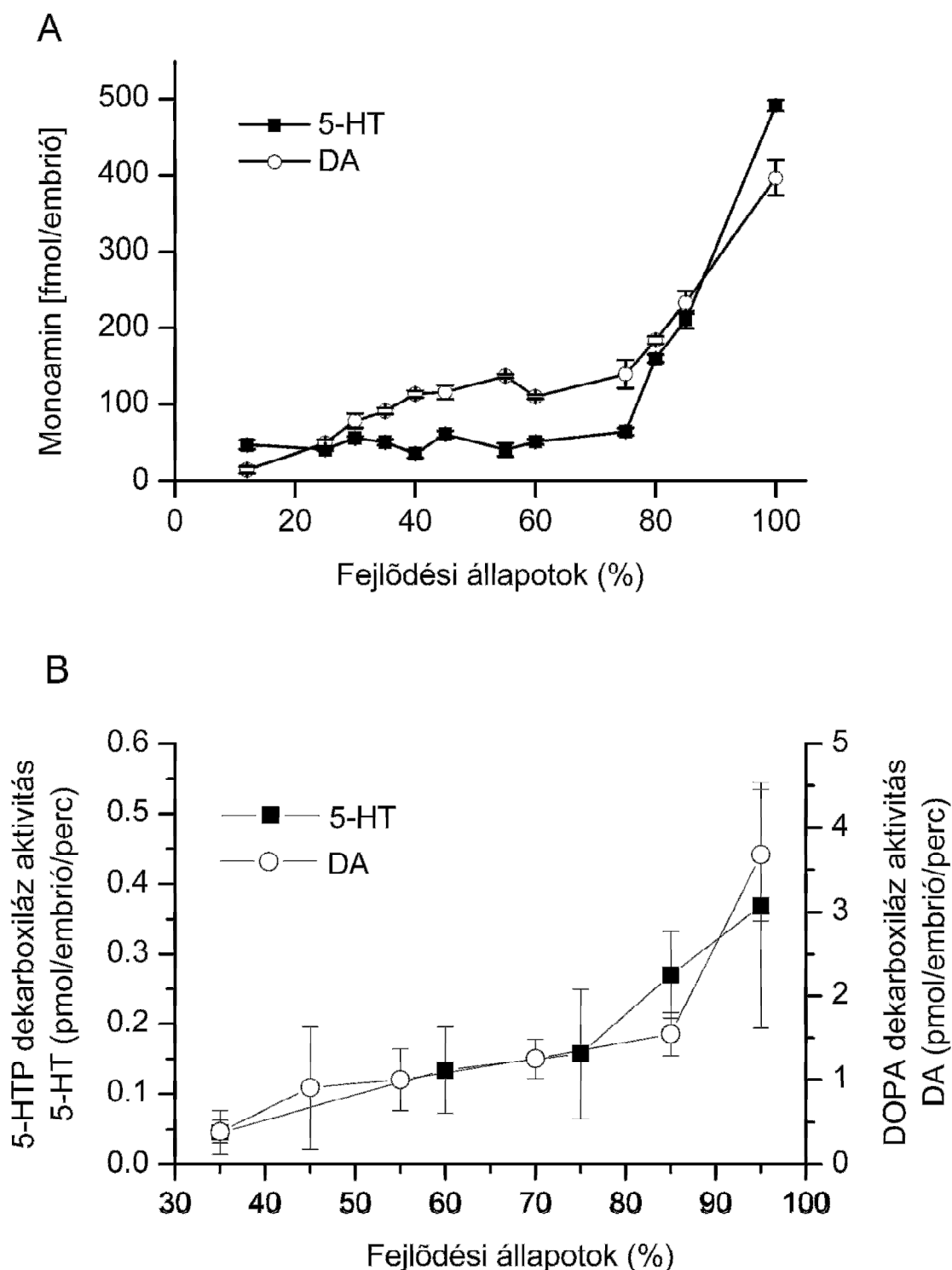
Az enzimek kinetikai paramétereit és a gátlás  $IC_{50}$  értékeit GraFit számítógépes program segítségével számoltuk, míg a farmakológiai adatok elemzésére és grafikus megjelenítésére Origin illesztő programot használtunk. Az eredményeket átlag  $\pm$  S.E.M adtuk meg. A szignifikáns eltéréseket t-teszttel vizsgáltuk, illetve a viselkedések vizsgálatánál ANOVA és Dunnet tesztet alkalmaztunk Statistica programot használva.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Az 5-HT és DA koncentráció, valamint az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz enzim aktivitás változása a *Lymnaea* embrió fejlődése során

A *Lymnaea* embriók endogén 5-HT és DA tartalmát 12%-os fejlettségi állapotban kezdtük mérni. Az 5-HT tartalom ekkor 47 fmol/embrió volt és ez a mennyiség lényegében nem változott a 75%-os stádium eléréséig (8. A ábra). A fejlődés további szakaszában azonban jelentősen megemelkedett, kikeléskor elérte a 490 fmol/embrió értéket. Az embriók DA szintjének alakulása ettől némileg eltérő képet mutatott, a 12%-os állapotban, kisebb mennyiségben, mindössze 15 fmol/embrió koncentrációban volt jelen az 5-HT-hoz képest, viszont mennyisége fokozatosan emelkedett a metamorfózis kezdetéig (40%). A metamorfózis alatt és után egészen a 80%-os állapot eléréséig viszonylag állandó szinten maradt, ez kb. 150 fmol/embrió koncentrációt jelentett. A fejlődés utolsó két napjában (80-100%) az 5-HT-hez hasonlóan, ugrásszerűen megnőtt a mennyisége elérve a 400 fmol/embrió mennyiséget (8. A ábra).

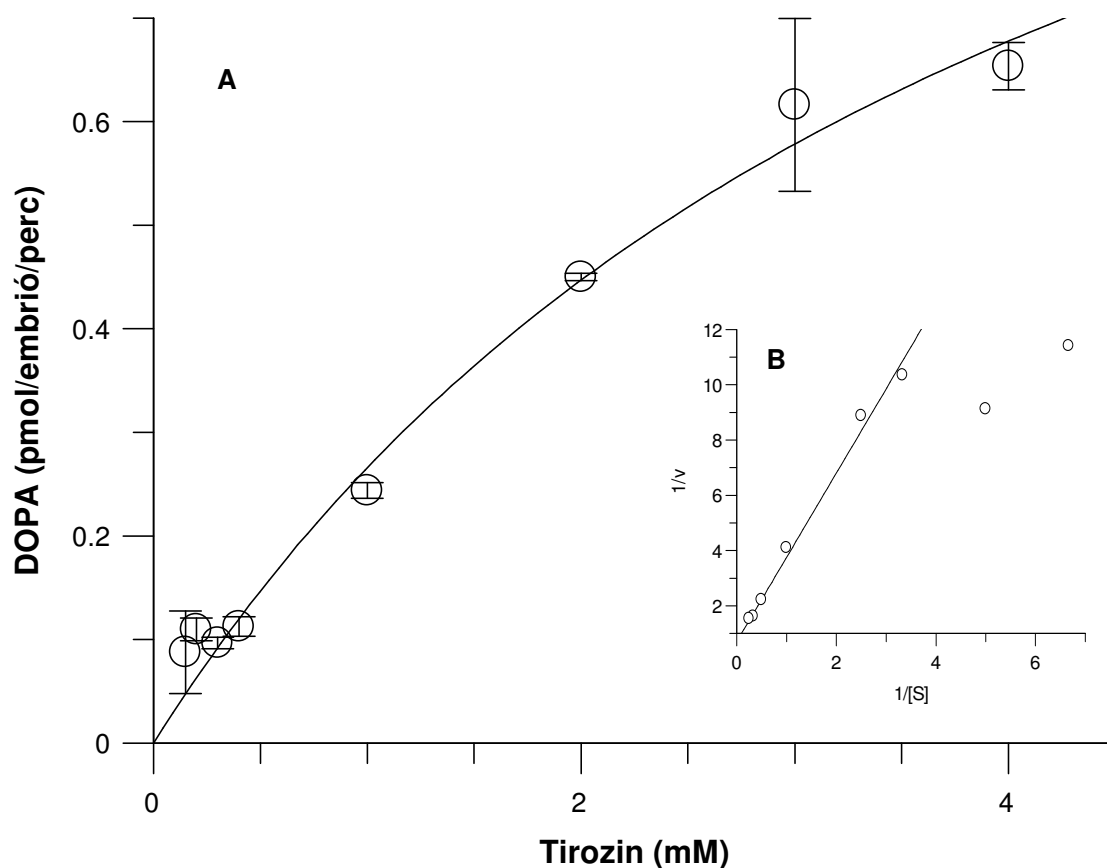
Vizsgálataink során kimutattuk a monoaminok szintézisében résztvevő enzimek, nevezetesen a tirozin hidroxiláz és az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz jelenlétét *Lymnaea* embrióban. Az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz enzim aktivitása az embriógenézis során, a szintetizálódott monoaminok tükrében, hasonló változást mutatott az endogén 5-HT és DA szint változásával (8. B ábra). 35-85%-os fejlettségi állapotok között az enzim aktivitása, mint egy a háromszorosára növekedett, majd a fejlődés utolsó két napján (85-100%) 100-150%-al nőtt meg a 85%-os stádiumban mérthez képest.



**8. ábra Az 5-HT és DA tartalom, valamint az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz aktivitás változása az embrió fejlődése során**

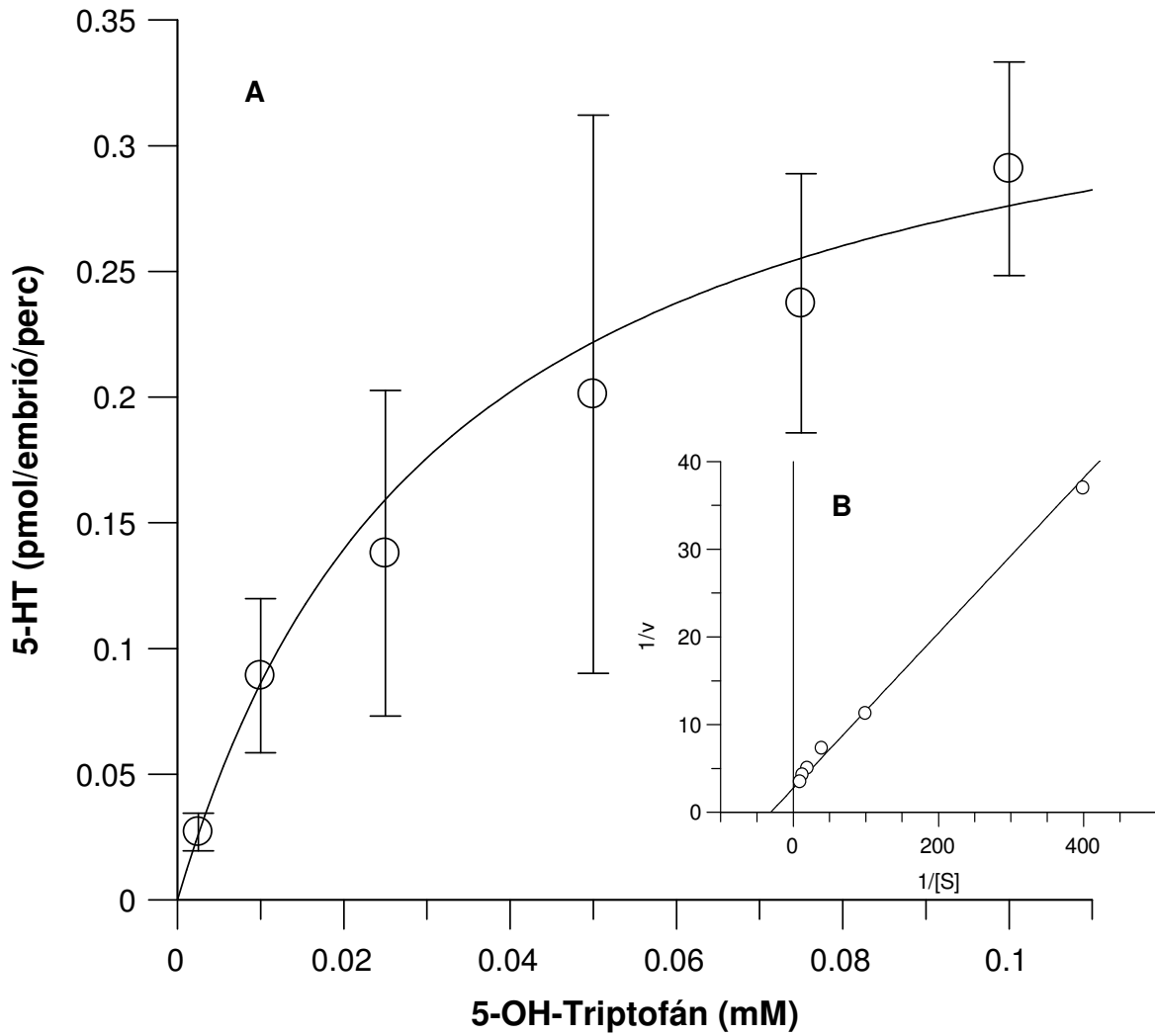
**A.** Különböző fejlődési állapotban lévő *Lymnaea* embriók 5-HT és DA tartalma (átlag  $\pm$  SEM). Mindkét monoamin koncentrációjának esetében drámai növekedés tapasztalható a fejlődés utolsó két napján (80%-100%). **B.** 5-HTP/DOPA dekarboxiláz aktivitásának változása az embriógenézis során. Az enzim aktivitásának változása párhuzamosan követi a monoamin szintek változását, az embriógenézis utolsó két napján az enzim aktivitása szintén nagymértékben megnő (150%).

A részletes enzimológiai vizsgálatokat 90%-os fejlettségű embriók homogenizátumán végeztük. A tirozin hidroxiláz és 5-HTP/DOPA dekarboxiláz aktivitása szubsztrátjaikkal egyszerű telítési kinetikával jellemezhető, Lineweaver-Burk ábrázolásuk lineáris összefüggést ad. Tirozin hidroxiláz esetében a  $V_{\max}$  értéke  $1,3 \pm 0,21$  pmol/embrió/perc, míg a  $K_M$  értéke  $3,7 \pm 0,2$  mM volt (9. ábra). A dekarboxiláz enzim kinetikai paraméterei 5-HTP-re vonatkoztatva  $V_{\max} = 0,4 \pm 0,04$  pmol/embrió/perc,  $K_M = 0,045 \pm 0,01$  mM (10. ábra), míg DOPA-ra  $V_{\max} = 3,52 \pm 0,32$  pmol/embrió/perc,  $K_M = 1,98 \pm 0,3$  mM (11. ábra). Az értékekből kitűnik, hogy DOPA esetén az enzim nagyobb aktivitással működik, mint 5-HTP esetén, viszont az 5-HTP nagyobb affinitással kötődik az enzimhez, mint a DOPA. Az enzimek kinetikai paramétereit a 3. táblázatban foglaltuk össze.



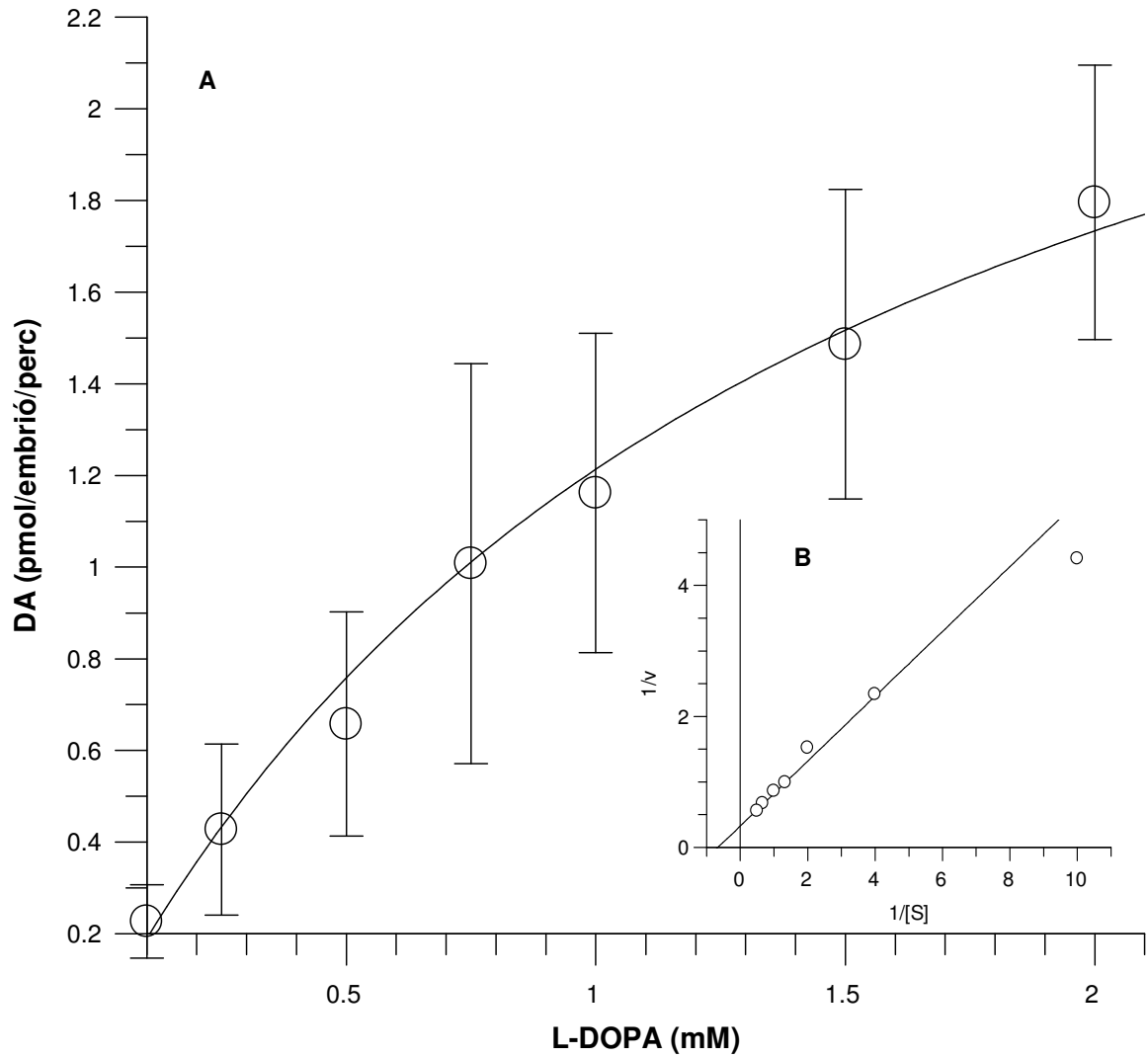
### 9. ábra Tirozin hidroxiláz aktivitása tirozin szubsztrát jelenlétében

**A** Az enzim aktivitása telítési kinetikát mutat. **B** Az adatok Lineweaver-Burk transzformációja lineáris összefüggést ad, az enzim aktivitásának maximális sebessége  $1,3 \pm 0,21$  pmol/embrió/perc,  $K_M$  értéke  $3,7 \pm 0,2$  mM.



**10. ábra 5-HTP/DOPA dekarboxiláz aktivitása 5-HTP szubsztrát jelenlétében**  
**A** Az enzim aktivitása telítési kinetikát ad. **B** Az adatok Lineweaver-Burk-féle transzformációja lineáris összefüggést ad.  $V_{\max}$  értéke  $0,4 \pm 0,04$  pmol/embrió/perc,  $K_M$  értéke  $0,045 \pm 0,01$  mM.





**11. ábra 5-HTP/DOPA dekarboxiláz aktivitása DOPA szubsztrát jelenlétében.**  
**A** Az enzim aktivitása telítési kinetikát mutat. **B** Az adatok Lineweaver-Burk transzformációja lineáris összefüggést ad, az enzim aktivitásának maximális sebessége  $3,52 \pm 0,32$  pmol/embrió/perc,  $K_M$  értéke  $1,98 \pm 0,3$  mM.

Enzimek és szubsztrátjaik	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (pmol/embrió/perc)
Tirozin hidroxiláz (Tirozin)	$3,7 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,21$
DOPA-dekarboxiláz (L-DOPA)	$1,98 \pm 0,3$	$3,52 \pm 0,32$
5-HTP-dekarboxiláz (L-5-HTP)	$0,045 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,04$

### 3. táblázat Az 5-HT és DA szintézisében résztvevő enzimek kinetikai paramétereit 90%-os *Lymnaea* embriókban.

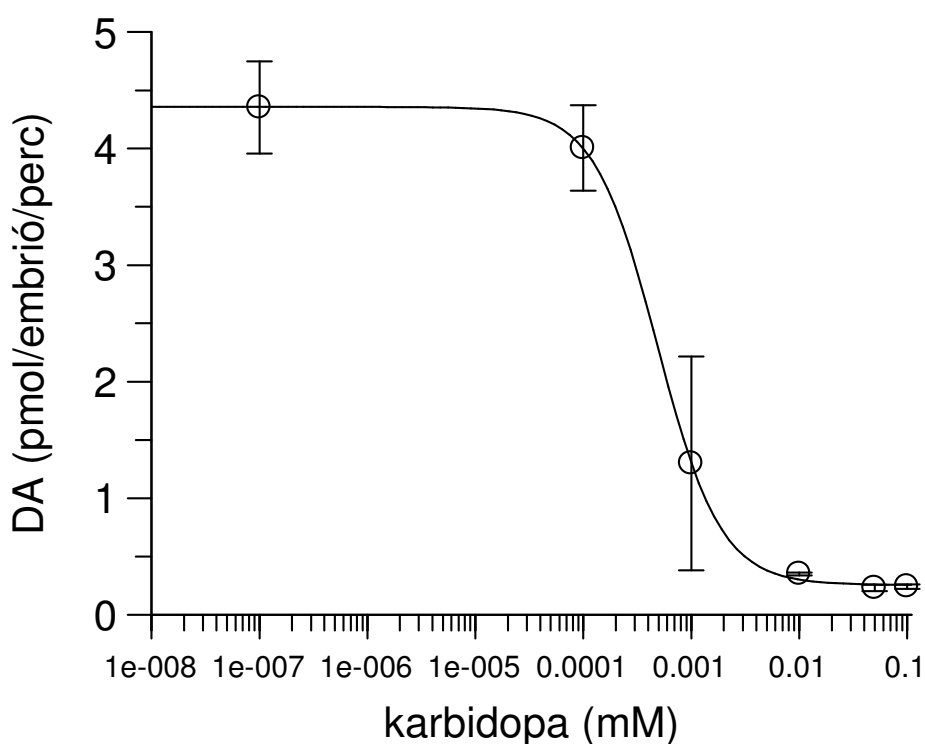
A dekarboxiláz enzim esetében a kapott  $K_M$  értékekből arra következtethetünk, hogy az 5-HTP szubsztrát nagyobb affinitással kötődik az enzimhez, mint az L-DOPA szubsztrát, de a  $V_{max}$  értékek szerint az enzim nagyobb mennyiségben dekarboxilálja az L-DOPA-t.

*In vitro* kísérletekben vizsgáltuk egyes dekarboxiláz gátlók hatását az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz működésére. A gátlások hatékonysága  $IC_{50}$  értékben van kifejezve. Ez az érték mutatja meg azt a gátlószer mennyiséget, aminek alkalmazásánál az enzimátikus átalakulás mértéke a felére csökken. DOPA szubsztrát jelenlétében kapott  $IC_{50}$  értékeit a 4. táblázat mutatja. Az eredmények alapján a karbidopa gátolta a leghatásosabban ( $0,2 \mu\text{M}$ ) az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz működését (12. ábra). Az Nsd-1015 ( $41,6 \mu\text{M}$ ) és az  $\alpha$ -metil-DOPA ( $630 \mu\text{M}$ ) ennél gyengébb hatást fejtettek ki az enzim aktivitására (13. és 14. ábra). Nsd-1015 gátló hatását mértük 5-HTP szubsztrát jelenlétében is, ahol már  $2,9 \mu\text{M}$  koncentrációban képes volt a felére csökkenteni a szubsztrát enzimátikus átalakulását 5-HT-ná (15. ábra). A kapott eredményekből következik, hogy az Nsd-1015 jobban képes gátolni a karboxil csoport eltávolítását 5-HTP-ről, mint a DOPA-ról.

<b>gátlószer neve:</b>	<b>IC<sub>50</sub> érték (μM)</b>
karbidopa	0,2
Nsd-1015	41,6
alfa-metil-DOPA	630

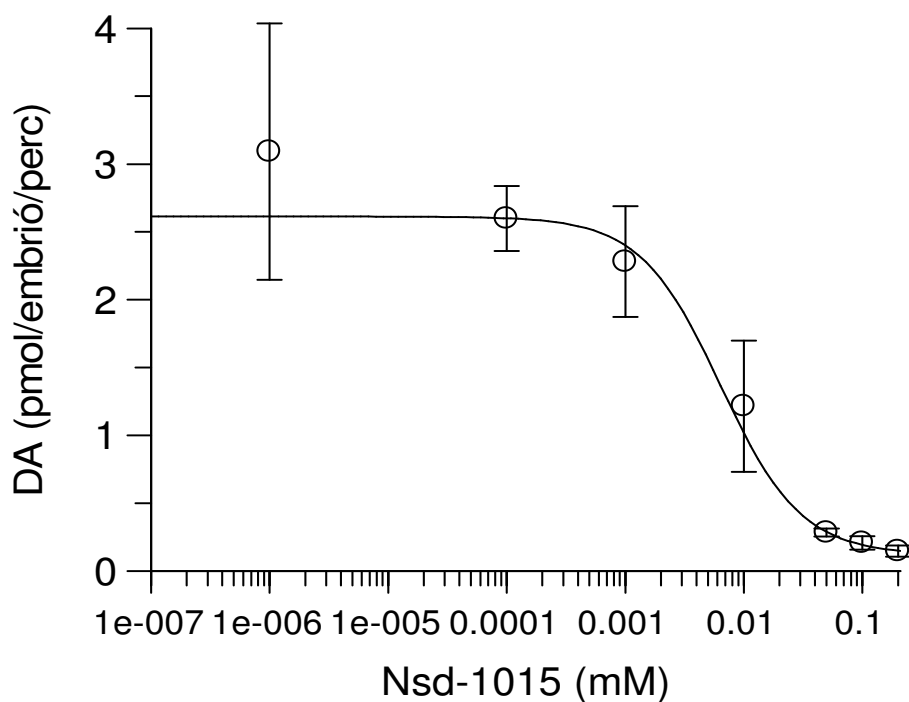
**4. táblázat Dekarboxiláz gátlók hatása 5-HTP/DOPA dekarboxiláz aktivitására DOPA szubsztrát esetén.**

Az egyes gátlószer IC<sub>50</sub> értékeit összehasonlítva kiderül, hogy a karbidopa képes a leghatékonyabban gátolni a dekarboxiláz enzim működését.



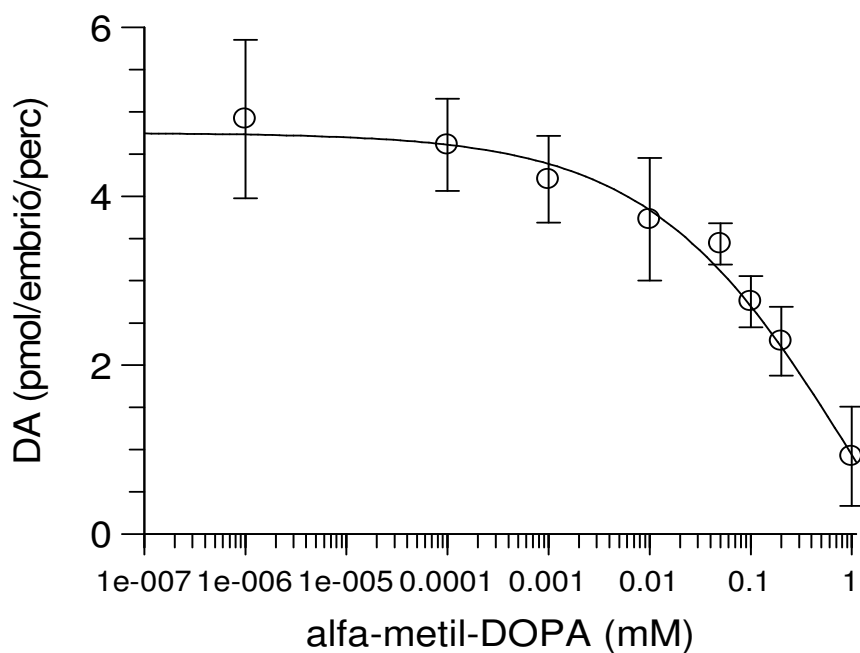
**12. ábra Karbidopa gátló hatása 5-HTP/DOPA dekarboxiláz működésére DOPA szubsztrát jelenlétében**

A mérés értékeiből szerkesztett dózis-válasz görbéből leolvasható, hogy a karbidopa igen kis koncentrációban (0,2 μM) már képes a felére csökkenteni a dekarboxiláz aktivitását.



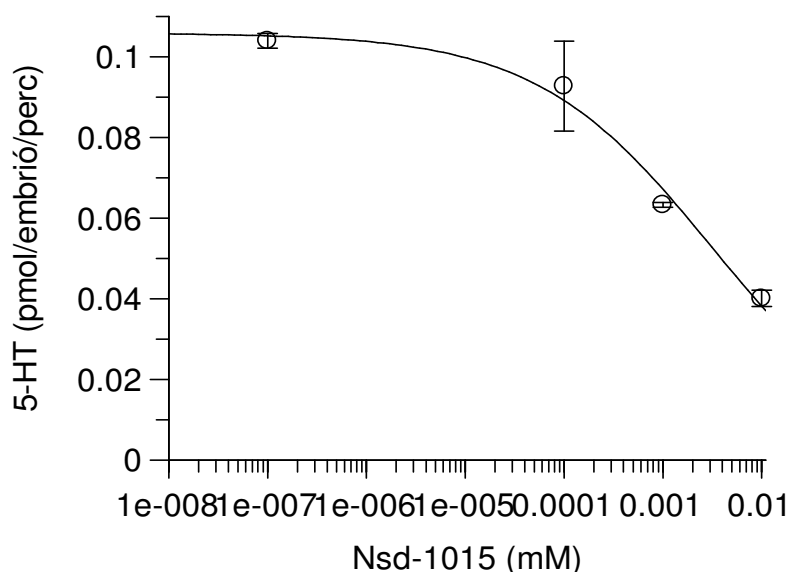
**13. ábra Nsd-1015 gátló hatása 5-HTP/DOPA dekarboxiláz működésére DOPA szubsztrát jelenlétében**

Az enzim aktivitása 41,6  $\mu$ M Nsd-1015 hatására csökkent a felére.



**14. ábra Alfa-metil-DOPA gátló hatása 5-HTP/DOPA dekarboxiláz működésére DOPA szubsztrát jelenlétében**

A dekarboxiláz enzim 50%-os gátlása 630  $\mu$ M  $\alpha$ -metil-DOPA hatására következik be.



**15. ábra Nsd-1015 gátló hatása 5-HTP/DOPA dekarboxiláz működésére 5-HTP szubsztrát jelenlétében**

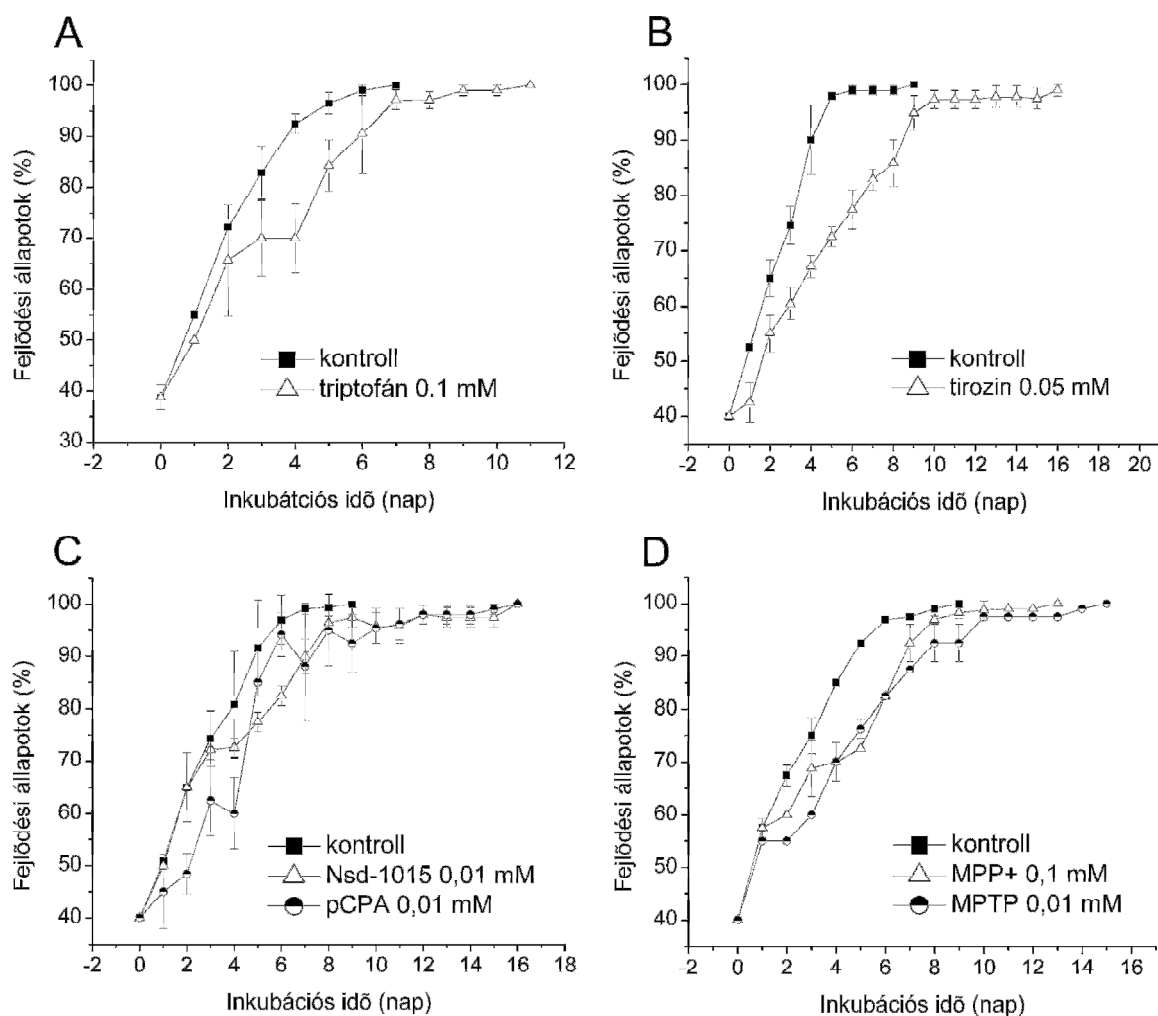
Az Nsd-1015 2,9  $\mu$ M koncentrációban a felére csökkenti a dekarboxiláz aktivitását. A DOPA szubsztrát jelenlétében mért  $IC_{50}$  érték ennél nagyobb, ami azt jelenti, hogy az Nsd-1015 hatékonyabban képes gátolni az 5-HTP átalakulását 5-HT-vé, mint a DOPA átalakulását DA-ná.

#### **4.2. Farmakológiai kezelések hatása az embrionális fejlődésre és az 5-HT és DA szintekre**

Veligera lárva állapottól kezdve folyamatosan kezeltük a mocsári csiga embriókat prekursorokkal, enzim gátlókkal és neurotoxinokkal, hogy megállapítsuk, van-e szerepe a DA-nak és 5-HT-nak a fejlődés szabályozásában. Amint azt az irodalmi áttekintésben említettük az 5-HT szintézis kiinduló molekulája az L-triptofán, míg a DA-né a tirozin. Az L-triptofán 100  $\mu$ M koncentrációban szignifikánsan megváltoztatta az embriógeneszis idejét; a kezelt embriók fejlődése kb. négy nappal (57%) tovább tartott, mint a kontroll egyedeké (16 A. ábra). A kezelt csoportban mindkét monoamin szintjét megnövelte, az 5-HT mennyisége  $189,5 \pm 40,6\%$ -al emelkedett, míg a DA tartalom  $123,6 \pm 49,4\%$ -al (17. ábra). Az 50  $\mu$ M tirozinnal kezelt embriók hét nappal (78%) később keltek ki (16 B. ábra), noha a DA szintjük csak mérsékelten (24%) volt nagyobb, mint a kikelés előtti kontroll embrióké. Mindkét prekursor esetén a nagyobb dózisokban történő adagolásuk az embriók torzulásához vagy halálához vezetett.

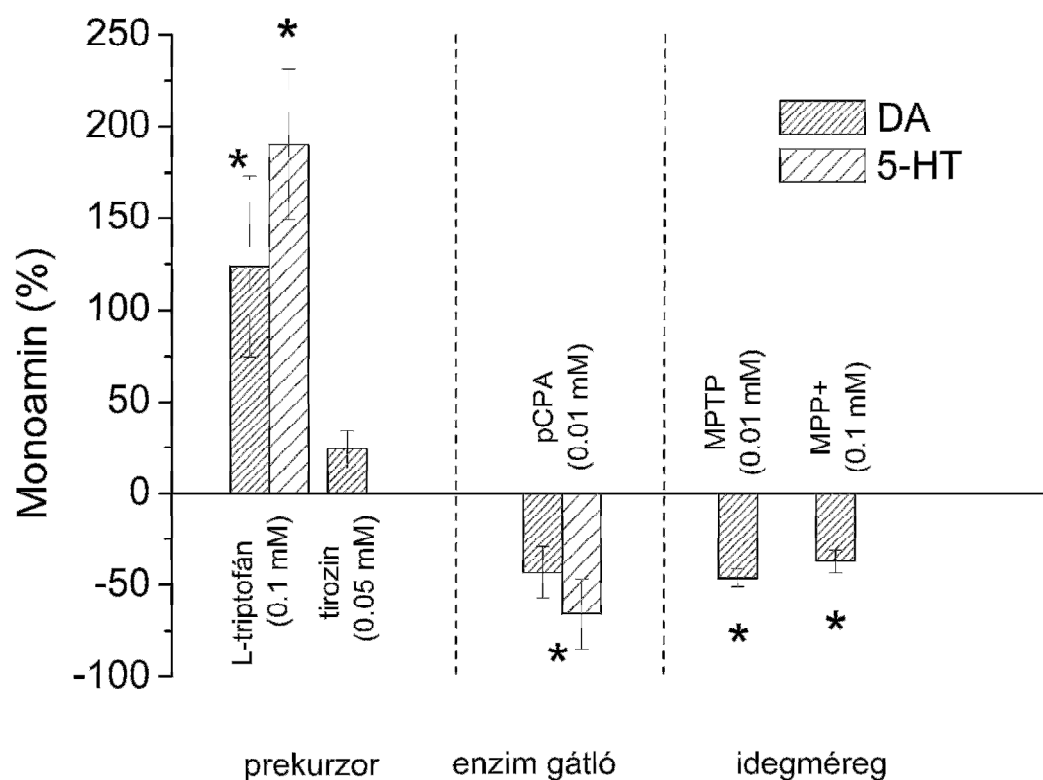
Az embriók kifejlődése 10  $\mu\text{M}$  pCPA-ban történő inkubációjuk esetében kb. hét nappal (78%) tovább tartott (16 C. ábra). Ez alatt mindkét monoamin szintje lecsökkent, az 5-HT  $65,5 \pm 19\%$ -al, a DA  $43,45 \pm 14\%$ -al (17. ábra). Ezzel szemben, a tirozin hidroxiláz gátló,  $\alpha\text{MPT}$  300  $\mu\text{M}$  koncentrációban nem befolyásolta az intrakapszuláris élet hosszát, nagyobb koncentrációban pedig először morfológiai torzulásokat, majd az embriók pusztulását okozta. Az aromás aminosav dekarboxiláz gátló, Nsd-1015 (10  $\mu\text{M}$ ) lelassította a fejlődést, a kikelés itt is hét nappal később következett be a kontroll egyedekhez képest (16 C. ábra).

A neurotoxinok közül a két DA toxin az MPTP és egy aktív metabolitja az  $\text{MPP}^+$  hatása volt értékelhető. Mindkét toxin alkalmazása esetén megnyúlt az embriók fejlődésének az ideje, 10  $\mu\text{M}$  MPTP kb. hat nappal (67%), míg 100  $\mu\text{M}$   $\text{MPP}^+$  kb. négy nappal (44%) késleltette a kikelést (16 D. ábra). A DA szint is jelentősen csökkent, MPTP esetében  $46 \pm 5\%$ -al,  $\text{MPP}^+$  esetében  $37 \pm 6\%$ -al (17. ábra). Egy másik DA neurotoxin a 6-OH-DOPA, valamint egy 5-HT neurotoxin az 5,7-dihidroxi-triptamin letálisnak bizonyult, mert igen kis koncentrációban (1  $\mu\text{M}$ ) alkalmazva is a *Lymnaea* embriók elpusztultak.



### 16. ábra A-D Különböző monoamin prekursorok, enzimgátlók és neurotoxinok hatása az embrionális élet hosszára.

A kezelések 35-40%-os állapotú veligera lárvákon kezdődtek. Kontroll csoportban az embriók átlag 22 °C hőmérsékleten körülbelül 9 nap alatt fejlődtek ki. L-triptofán kezelésnél azonban a kontroll egyedek 2 nappal korábban, azaz 7 nap múlva keltek ki, mert a hőmérséklet 24 °C volt. Mindegyik alkalmazott farmakon szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) meghosszabbította az embrionális fejlődést. **A** 5-HT prekursor triptofán (0,1 mM) négy nappal lelassította a fejlődést. **B** DA prekursor tirozin (0,05 mM) hatására 7 nappal később keltek ki a csigák. **C** Mind az Nsd-1015 (0,01 mM) mind a pCPA (0,01 mM) 7 nappal hosszabbította meg a fejlődést. **D** DA rendszerre ható neurotoxin MPP<sup>+</sup> (0,1 mM) négy nappal, míg az MPTP (0,01 mM) hat nappal tolta el a kikelés idejét a kontrollhoz képest. Minden kezelést legalább négyszer megismételtük ( $n = 100$ ), az értékek a kapott átlagok  $\pm$  SEM.



**17. ábra Prekurzorok, enzim gátlók és idegmérgek hatása az embrió endogén 5-HT és DA szintjére.**

Az embriókat a fejlődés 40%-tól kezdve a 90%-os állapot eléréséig folyamatosan kezeltük, majd megmértük a monoamin tartalmukat HPLC segítségével. A farmakonok hatását a monoamin változás százalékában adtuk meg, ahol a függőleges tengely 0%-os értéke a kontroll egyedek átlagos monoamin tartalmával egyezik meg. 5-HT prekursor triptofán mind az 5-HT (190%) mind a DA (124%) mennyiségét megemelte, ezzel szemben a DA prekursor tirozin csak kis mértékben emelte meg a DA szintet (24%), míg az 5-HT mennyisége nem változott. A triptofán hidroxiláz gátló pCPA nem csak az 5-HT koncentrációt csökkentette (43%) hanem a DA koncentrációt is (65%). A DAerg neurotoxinok közül az MPTP 37%-al míg az MPP<sup>+</sup> jodid 46%-al csökkentette az embrió DA mennyiségét. Az értékek átlag ± SEM vannak kifejezve. n = 25. Csillaggal jelölt oszlopok szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollhoz képest. Minden kezelést legalább négyszer elvégeztünk, n = 100.

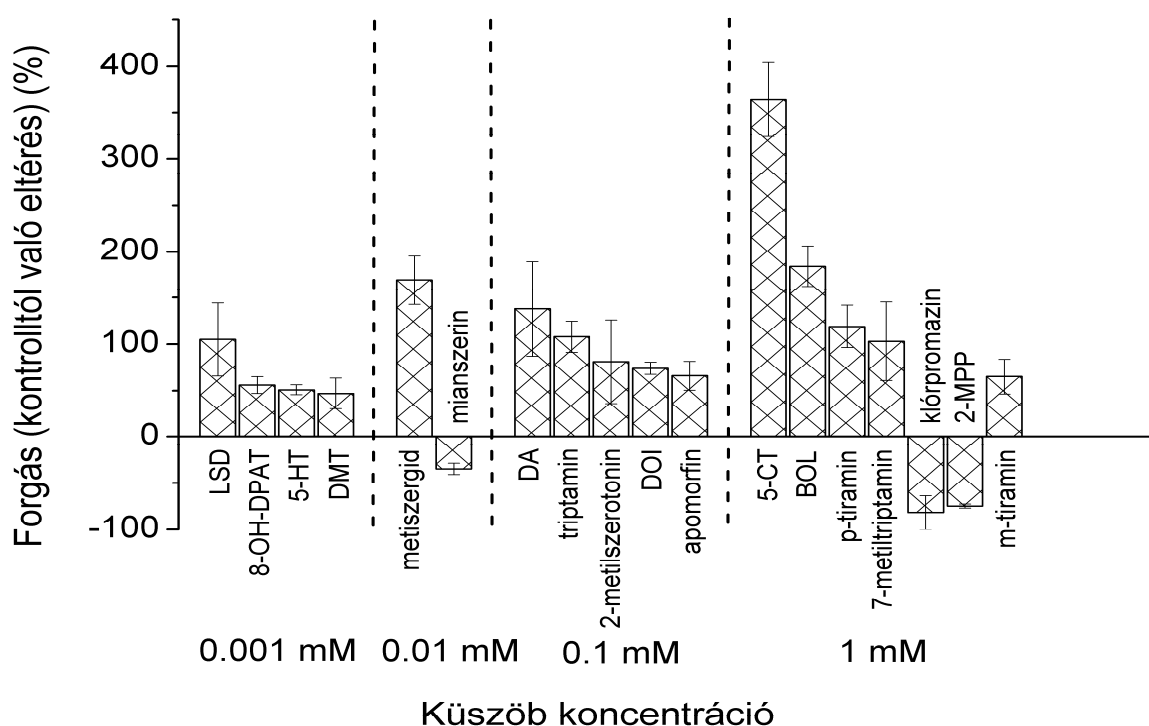


### 4.3. DAerg és 5-HTerg farmakonok hatása a *Lymnaea* embrió különböző viselkedésformáira

#### 4.3.1 Forgó mozgás

A forgó mozgás az első embrionális viselkedési forma, ami már 15%-os fejlettségi állapotban az úgynevezett trochophora lárva stádiumban megjelenik. A mozgást az embrió a testfelszíni csillós hámsejtjeinek közreműködésével valósítja meg, melyek az embrió testének apikális részét, illetve a velum felszínét borítják. Ez a mozgásforma egészen a metamorfózis végéig jellemzi az embriót (Voronezhskaya és mtsai., 1999), amikor kezd áttérni a kapszula belső falán történő felnőttzerű csúszó mozgásra. A forgómozgás farmakológiai vizsgálatához a 35%-os fejlettségi állapotú veligera lárvákat választottuk, mert az embriók teste ekkor kezd megnyúlni mutatva a későbbi állapotokra jellemző aszimmetriát, valamint forgó mozgásuk folyamatosnak mondható, így könnyebb figyelemmel kísérni az alkalmazott farmakonok hatását, szemben a szinte gömbszerű trochophora alakkal. A farmakológiai kezelések során, az 5-HT és DA agonisták, antagonisták befolyásolták a forgást, megváltoztatva annak sebességét. Az alkalmazott farmakonok eltérő koncentrációban voltak hatásosak, az oldatok töménysége 1- 1000  $\mu\text{M}$  tartományon belül mozgott (18. ábra). Az 5-HT agonisták közül az LSD, 5-HT, 8-OH-DPAT és a DMT bizonyult a leghatásosabbnak. Már 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban képesek voltak jelentősen befolyásolni a veligera lárva forgását, közülük is kitűnt az LSD, mely 105%-al növelte meg a lárva sebességét, míg a többiek hatása 40-55% között változott. Más 5-HTerg receptor agonistát töményebb formában, 10-1000  $\mu\text{M}$  koncentrációban kellett alkalmazni, hogy hatást érzünk el velük. Közülük a triptamin emelte meg legjobban a forgássebességet, majd ezt követte a 2-metilszerotonin, DOI, végül 5CT. Ezzel szemben, a 2-MPP agonista (1000  $\mu\text{M}$ ) ellentétes hatást fejtett ki, 75%-al lassította az embriók forgását. Az 5-HTerg antagonisták közül 10  $\mu\text{M}$  koncentrációnál a mianszerin 35%-al csökkentette a forgási sebességet, viszont a metiszergid 169%-al meggyorsította azt. A 7-metiltriptamin is agonistaként viselkedett, de csak 1000  $\mu\text{M}$  töménységű oldatban gyorsította szignifikánsan a lárva mozgását. A ketanszerin nem fejtett ki hatást. A DAerg agonisták is fokozták a veligera lárva forgási sebességét, de hatásuk összességében gyengébbnek

bizonyult a legtöbb használt 5-HTerg agonistához képest. Közülük a DA hatott a legjobban, már 100  $\mu$ M koncentrációban alkalmazva 138%-al gyorsabban forogtak az embriók, melyet az apomorfín követett hasonló koncentrációban 66%-os hatásfokkal. Nagyobb dózisban (1000  $\mu$ M) hatott az m-tiramin és a p-tiramin (65-119%). A bromokriptin és az SKF38393 inaktívnak bizonyult. A klórpromazin, mint DAerg antagonistá csak nagy koncentrációban (1000  $\mu$ M) volt képes csökkenteni a forgást (82%).

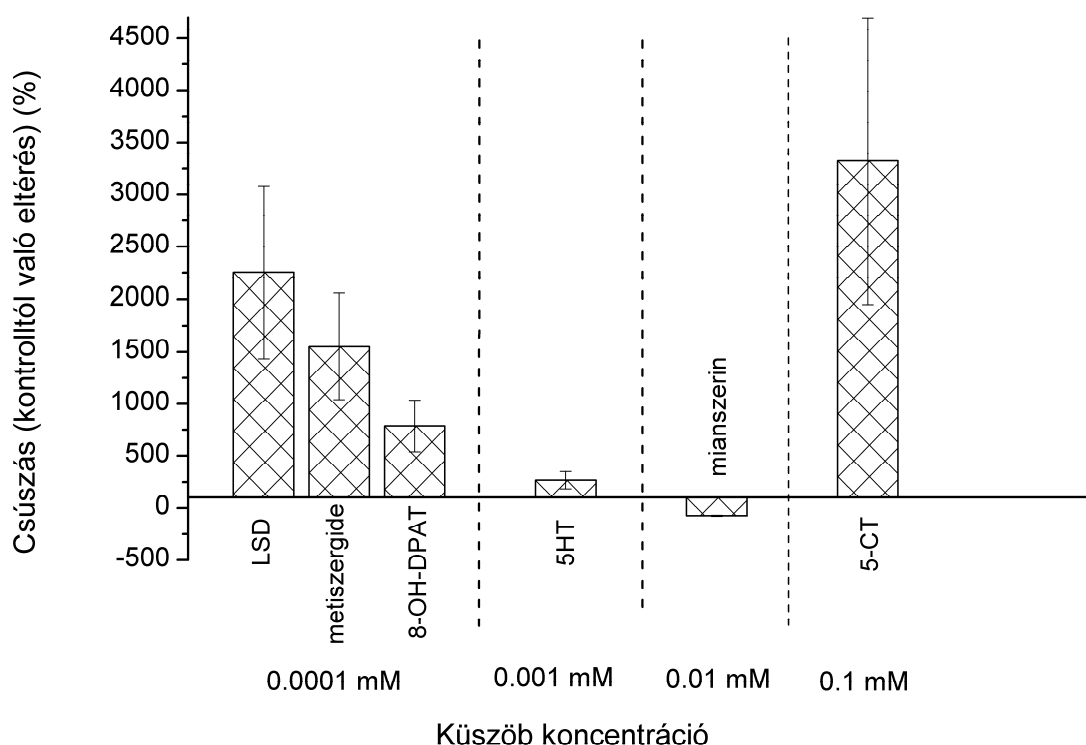


**18. ábra 5-HTerg és DAerg agonisták, antagonisták stimuláló vagy gátló hatása a veligera lárva forgó mozgására.**

Mind az 5-HTerg mind a DAerg farmakonok gyorsították a lárva forgását, kivéve a mianszerint, klórpromazint és 2-MPP-t. Az LSD erősebben hatott, mint az 5-HT, a DAerg farmakonok közül viszont a DA hatása volt a legerősebb. Az értékek átlag  $\pm$  SEM vannak megadva és mindegyik szignifikáns különbséget mutat.

### 4.3.2. Csúszó mozgás

A 85%-os fejlettségi stádiumtól az embrió felnőttszerű mozgást mutat, a petekapszula belső felszínén csúszkál (Voronezhskaya és mtsai., 1999). A mozgástípus farmakológiai manipulációja során, már 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban az LSD 2254%-al, a metiszergid 1550%-al és a 8-OH-DPAT 787,5%-al fokozták a csúszó mozgás intenzitását. Hatásosabbnak bizonyultak, mint az 5-HT (19. ábra), ami csak egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációnál 265%-kal gyorsította az embrió csúszását. Az 5-CT 3323%-os növekedést váltott ki, de csak 1 mM koncentrációnál. A mianszerin mint antagonistá 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban 74%-kal volt képes gátolni az embrió mozgását. A DA hatástalannak bizonyult.

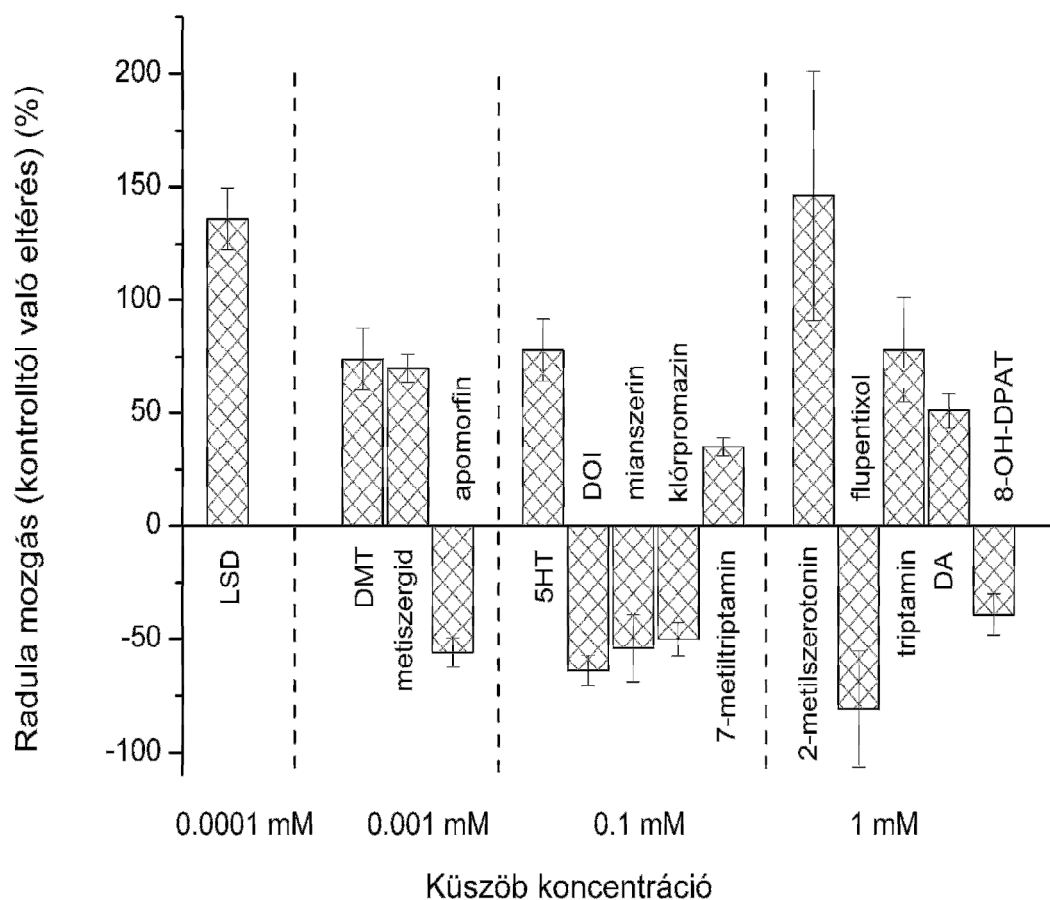


**19. ábra 5-HTerg és DAerg agonisták, antagonisták stimuláló vagy gátló hatása felnőttszerű csúszó mozgásra**

A mianserin kivételével minden alkalmazott 5-HTerg farmakon stimulálta az embrió csúszását, a leghatékonyabbnak ebben az esetben is az LSD bizonyult. Sem a DA sem a DAerg farmakonok nem voltak hatással erre a mozgásformára. Az értékek átlag  $\pm$  SEM vannak megadva és mindegyik szignifikáns különbséget mutat.

### 4.3.3. Táplálkozás (radula mozgás)

A 95%-os fejlettségi stádiumban lévő embriók már ritmikusan kiöltik, majd visszahúzzák a reszelőnyelvüket (radula), ami már a felnőtt szerű táplálkozási viselkedés érését jelzi (Voronezhskaya és mtsai., 1999). Erre a táplálkozási aktivitásra mind az 5-HTerg mind a DAerg farmakonok hatottak (20. ábra). Az 5-HTergek közül itt is az LSD bizonyult a leghatásosabbnak, 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazva a radula mozgás 140%-al élénkebbé vált. A DMT már egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban (10  $\mu\text{M}$ ) volt képes befolyásolni a nyelv mozgását, azt mintegy 74%-al felgyorsítva. Az 5-HT még ennél is töményebb mennyiségben, 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban 78%-os hatásfokkal gyorsított. Magas koncentrációban (1 mM) a triptamin és a 2-metilszerotonin is képes volt 77-145% hatásfokkal felgyorsítani a radula aktivitását. A várttól eltérően, a DOI és a 8-OH-DPAT eltérő hatást értek el, lelassították a reszelőnyelv mozgását. A DOI 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban 64%-al, míg a 8-OH-DPAT 1 mM dózisban és 35%-al csökkentette az mozgás aktivitását. Az alkalmazott 5-HTerg antagonisták közül csak a mianszerin (100  $\mu\text{M}$ ) gátolta a nyelvmozgást (54%), a metiszergiddel (10  $\mu\text{M}$ ) és a 7-metiltriptaminnal (100  $\mu\text{M}$ ) épp ellenkező, serkentő hatást értünk el a vizsgálatok során (70, ill. 35%). Az 5-HT-hoz hasonlóan, 1 mM koncentrációban a DA is serkentette mintegy 50%-al az embrió radula mozgását. A  $D_2$  receptor agonista apomorfin, a  $D_2$  receptor antagonistá klórpromazin és a  $D_{2,1}$  receptorokat antagonizáló flupentixol eltérő koncentrációban (10-1000  $\mu\text{M}$ ) de gátló hatást fejtett ki (50-80%).



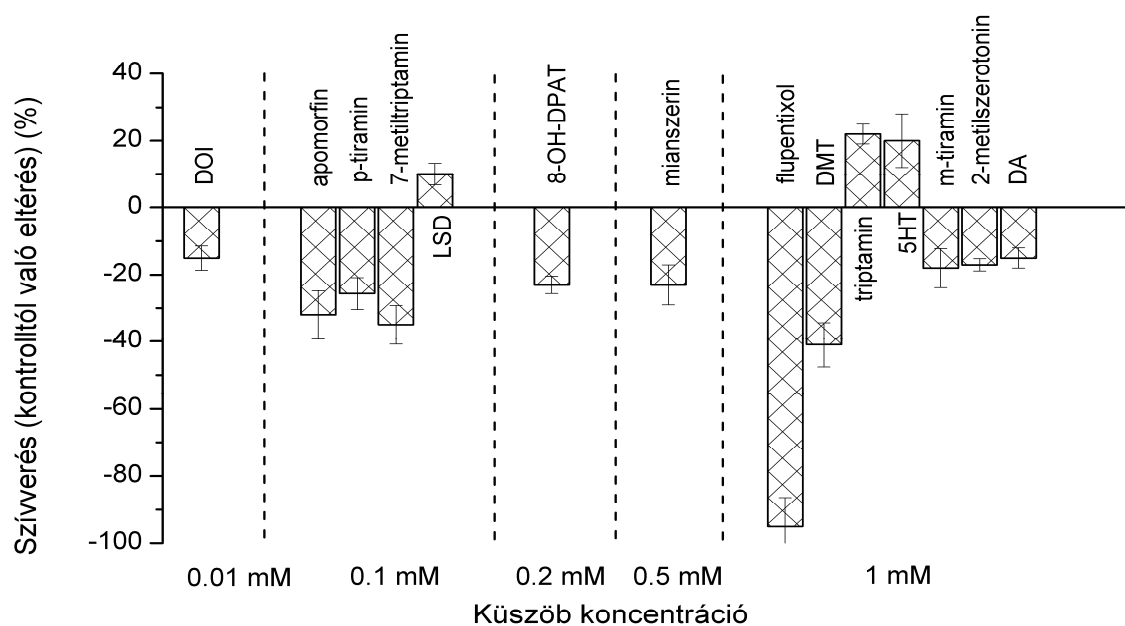
#### 20. ábra 5-HTerg és DAerg agonisták, antagonisták stimuláló vagy gátló hatása embrionális radula mozgásra

Az 5-HTerg farmakonok majdnem mindegyike stimuláló hatást fejtett ki a radula mozgásra, kivételt csak a DOI, mianszerin és a 8-OH-DPAT jelentett, melyek gátló hatásúnak bizonyultak. A DAerg farmakonok egy része stimulált, míg másik része gátolt. Figyelemre méltó, hogy közülük a DA bizonyult a legkevésbé hatásosnak. Az értékek átlag  $\pm$  SEM vannak megadva és mindegyik szignifikáns különbséget mutat.

#### 4.3.4. Szívverés

Az 5-HT és DA lehetséges szerepét a szív működés szabályozásában a szívverés ütemének változásában mértük 75%-os fejlettségű embriókban. Az LSD, triptamin és 5-HT kivételével az alkalmazott anyagok mind gátolták az embrió szívverését (21. ábra). Az LSD-t az előző farmakológiai kísérletekben mutatott

hatásosságához képest most nagyobb koncentrációban kellett használni (100  $\mu$ M), hogy az embrió szíve szaporábban (10%) verjen. Az 5-HT és a triptamin közel egyformán serkentette a szív működést, mindkettő 1 mM koncentrációban 20%-os hatásfokot ért el. A gátló hatású 5-HTerg farmakonok közül a DOI bizonyult a leghatásosabbnak, 10  $\mu$ M mennyiségben 15%-al csökkentette a szívverés frekvenciáját. A gátlás mértékét tekintve a következő sorrend alakult ki a többi 5-HTerg farmakon között: 7-metiltriptamin (100  $\mu$ M,  $25 \pm 6\%$ ) > 8-OH-DPAT (200  $\mu$ M,  $23 \pm 3\%$ ) > mianszerin (500  $\mu$ M,  $24 \pm 6\%$ ) > DMT (1 mM,  $41 \pm 6\%$ ) > 2-metil-5-HT (1 mM,  $16 \pm 2\%$ ). A metiszergidnek és a ketanszerinnek nem volt hatása a szívverésre. A DA agonisták közül csak a p-tiramin, m-tiramin és a DA bizonyult gátló hatásúnak (15-32%) 100-1000  $\mu$ M koncentrációban, míg a bromokriptin és az SKF-38393 hatástalanok bizonyult. A DAerg antagonisták mint a klórpromazin, SCH-23390 és szulpirid szintén hatástalanok voltak, de a flupentixol 1 mM mennyiségben 95%-al csökkentette a szív frekvenciáját.

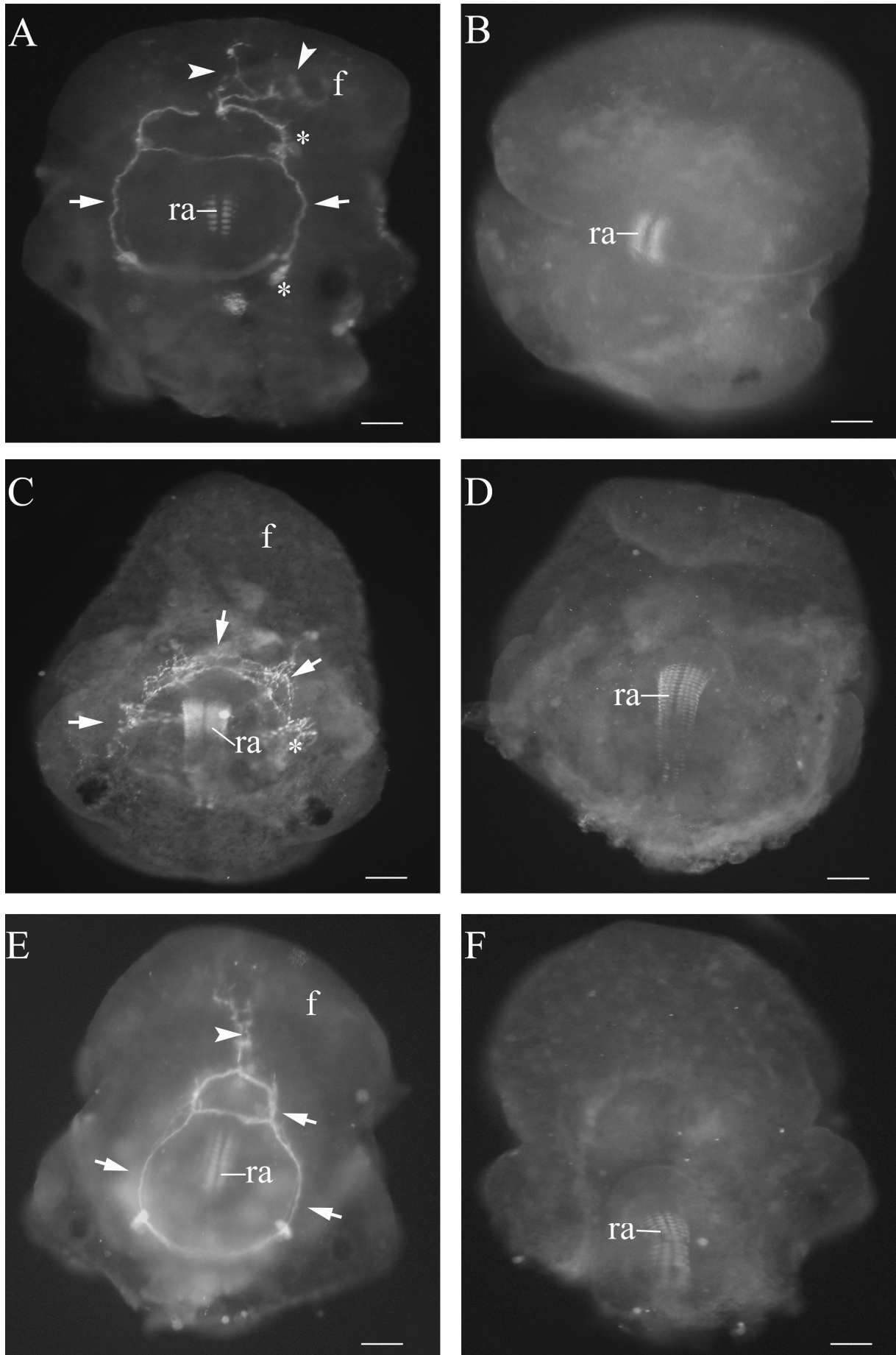


### 21. ábra 5-HTerg és DAerg agonisták, antagonisták stimuláló vagy gátló hatása metamorfózisban lévő embrió szívverésére

Az 5-HTerg farmakonok közül itt most nem az LSD befolyásolta a legjobban a szív működést, hanem a DOI, igaz a várttal ellenkező hatást fejtve ki. Az 5-HT az egyik leggyengébbnek bizonyult a vizsgálat során. A DA is a leggyengébb az alkalmazott DAerg farmakonok közül. Az értékek átlag  $\pm$  SEM vannak megadva és mindegyik szignifikáns különbséget mutat.

#### **4.4. Farmakológiai kezelések hatása az 5-HT-IR elemek megjelenésére a fejlődő embrióban**

Kezeletlen 60-85%-os fejlettségű embriókban a közvetett immunfluoreszcens festés után a fejlődő központi és periférikus idegrendszerben jól kivehetőek voltak az 5-HT tartalmú elemek. A kapott jelölődés mintázata megegyezett a Marois és Croll (1992) valamint Voronezhskaya és Elekes (1993) által már korábban leírtakkal. Így posztmetamorfotikus, felnőtthez hasonló embriókban jól láthatóak voltak a főleg fej-, és lábdúcokban elhelyezkedő 5-HT-IR idegsejtek. A cerebrális és pedális kommisszúrákban, valamint a cerebro-pedális konnektívumokban futó 5-HT-IR nyúlványok pedig jól kirajzolták, ahogy a fejlődő idegdúcok a garatkörüli-ideggyűrűbe csoportosulnak (22 A,C és E ábrák). Az 5-HT-IR axonok varikózus arborizációi is megfigyelhetők voltak már a központi idegdúcokban (22 C ábra), valamint a láb felé futó perifériás nyúlványok mentén (22 A,C ábrák). Ezzel szemben 0,01 mM pCPA vagy 0,1 mM Nsd-1015 kezelt embriókban sem központi, sem perifériás szinten immunreaktív elem nem volt látható (22 B,D és F ábrák).



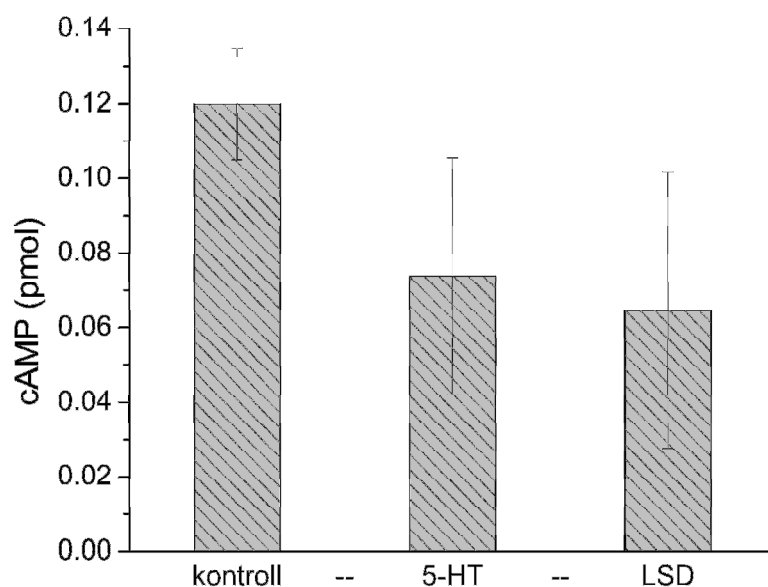


**22. ábra Triptofán és dekarboxiláz gátlók hatása *Lymnaea* fejlődő idegrendszerének 5-HT immunreaktív elemeire** (totálpreparátumok, TRITC-immunfluoreszcens jelölés)

**A, C, E** – 60%, 85% és 75%-os fejlettségi állapotban lévő kontroll preparátumok. A nyilak a központi idegrendszerben, míg a nyílhegyek a talpban található 5-HT-IR elemeket mutatják. Csillag jelöli a központi idegrendszerben látható 5-HT tartalmú idegsejteket. **B, D** - pCPA kezelt 60% és 85%-os állapotban lévő embriók. **F** – Nsd-1015 kezelt 75%-os állapotban lévő embrió. A farmakológiailag kezelt egyedeket az anti-5-HT immunjelölés teljes hiánya jellemzi. ra – radula, f – láb. Aránymérték: 30  $\mu$ m.

#### 4.5. 5-HT és LSD hatása a *Lymnaea* embrió cAMP koncentrációjára

A kontroll 90%-os állapotú embriókban mért cAMP szint 0,12 pmol/embrió volt. Farmakológiai kezelés után, 0,1 mM 5-HT hatására a cAMP koncentráció 62,7%-ra csökkent a kontroll értékhez képest, míg 0,1 mM LSD 54,4%-ra csökkentette (23. ábra).



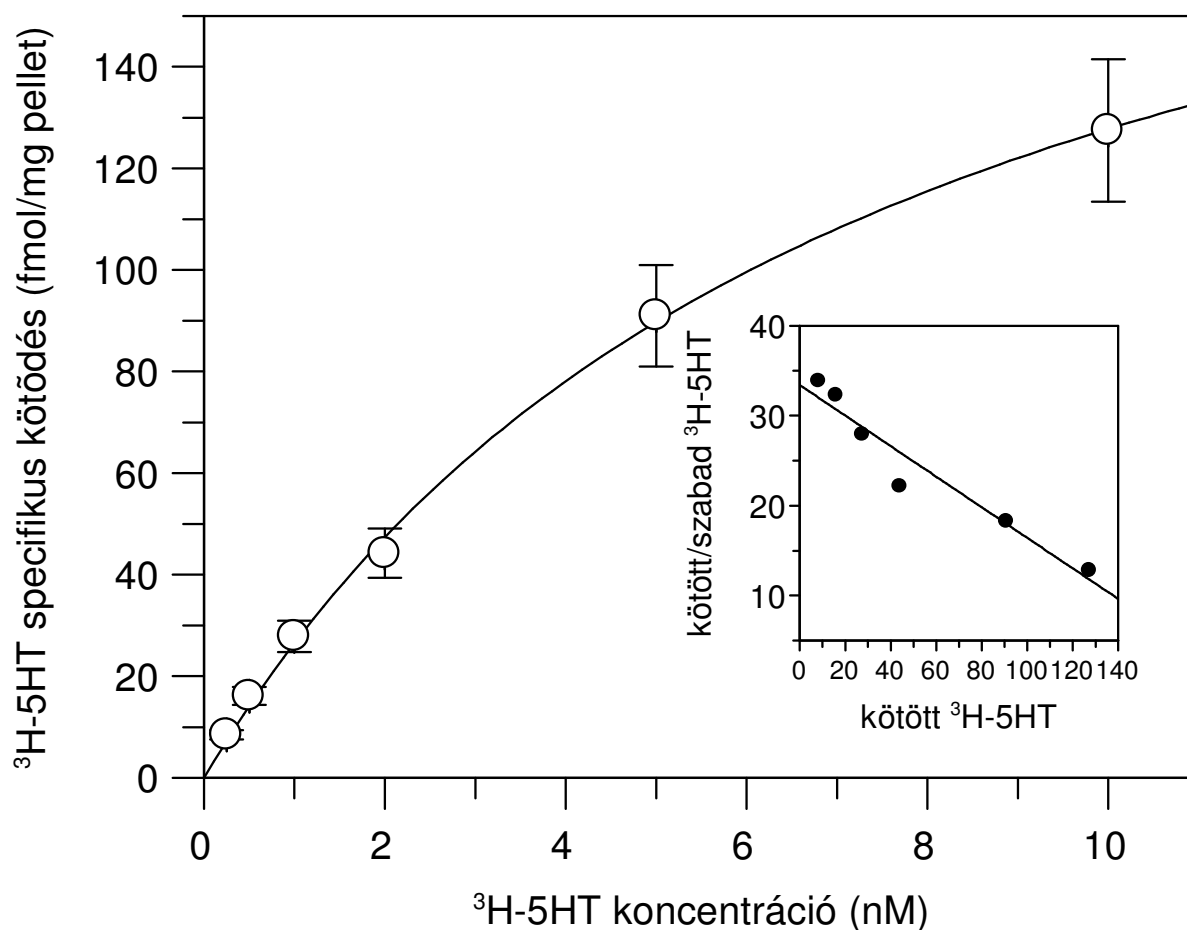
#### 23. ábra 5-HT és LSD hatása az adenilát-cikláz enzim működésére

Az adenilát-cikláz aktivitását az 5-HT 37,3%-kal, míg az LSD 45,6%-kal csökkentette.

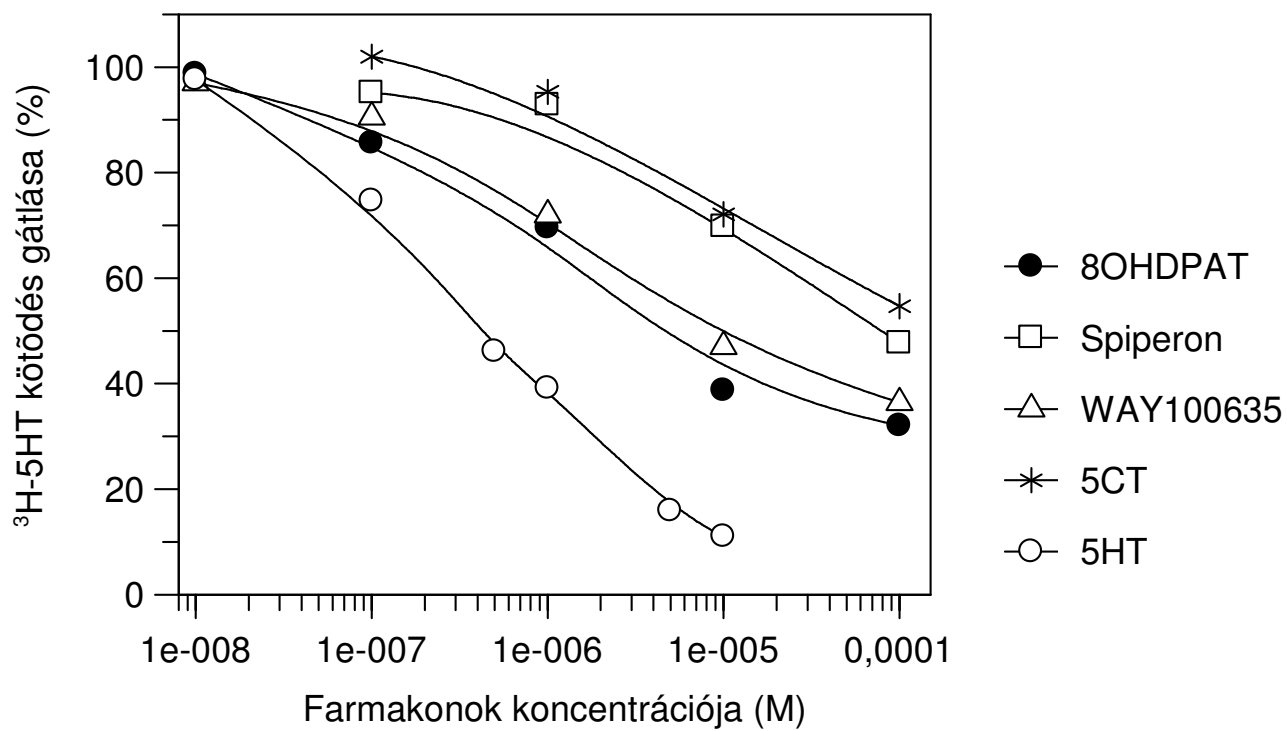
#### 4.6. A <sup>3</sup>H-5-HT kötődés vizsgálata

Eredményeink szerint a jelzett ligand specifikusan kötődik az embrionális membrán preparátumhoz. A nem specifikus kötődés 34,2 %-ka a teljes kötődésnek. A teljes és a nem specifikus kötődés különbségeként mért specifikus kötődés a koncentráció függvényében telítési görbével jellemezhető. A telítési görbe és az abból számolt és szerkesztett Scatchard görbe a 24. ábrán látható. A jelzett 5-HT kötődése nagy affinitású,  $K_d$  értéke 7,36 nM, míg a maximális kötőhelyek száma,  $B_{max}$  221 fmol/mg pellet. A jelzett ligand kötődését leghatásosabban az 5-HT gátolta. Ettől kisebb mértékben gátolt a szelektív agonista 8-OH-DPAT és az ugyancsak

szelektív antagonistá WAY100635. A nem szelektív 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> és 5-HT<sub>7</sub> receptorokon agonista hatást kifejtő 5-CT-nek az affinitása kisebb volt. Az 5-CT-hez hasonló affinitású volt az 5-HT<sub>1A</sub> receptort gátló, de az 5-HT<sub>1B</sub> receptoron hatástalan spiperon (25. ábra).



**24. ábra A <sup>3</sup>H-5-HT embrionális membrán pellethez való kötődésének telítési görbéje.** Az ábra három párhuzam átlagértékeit  $\pm$ SEM mutatja. **Beillesztett ábra:** A telítési görbéből számolt és szerkesztett Scatchard görbe. Az 5-HT kötődésének affinitása ( $K_d$ ) 7,36 nM, a maximális kötőhelyek száma ( $B_{max}$ ) 221 fmol/mg pellet.



**25. ábra 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonisták (5-HT, 8-OH-DPAT, 5-CT) és antagonisták (WAY100635, spiperon) gátló hatása a <sup>3</sup>H-5HT kötődésére.**

Az ábra értékei három párhuzamos mérés átlagértékei. A SEM nem haladta meg a  $\pm 11\%$ -ot.

## 5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### 5.1. 5-HT és DA a fejlődő *Lymnaea* embrióban

Biokémiai (HPLC) méréseink szerint az 5-HT és DA jelenlétét először az embriók 12%-os fejlettségi állapotában lehet kimutatni. Ezzel szemben fluoreszcens immunhisztokémiai eljárással az első 5-HT és DA tartalmú idegsejteket csak 32-38%-os fejlettségű embriókban tudták detektálni (Voronezhskaya és mtsai., 1999; Marois és Croll, 1992). A két vizsgálati eredmény azonban arra utal, hogy a *Lymnaea* embrió fejlődésének már igen korai szakaszában mind az 5-HT mind a DA jelen van, noha annak detektálása eltérő az alkalmazott technikáktól függően. Méréseink során a két monoamin koncentráció értékei eltértek egymástól, azonban koncentrációjuk hasonló módon alakult az embriógenézis folyamán. A kezdeti, 12%-os állapotra jellemző, hogy az 5-HT szint magasabb volt, mint a DA szint, majd egészen a metamorfózisig az 5-HT mennyisége jelentősen nem változott, állandó szinten maradt, ezzel szemben a DA koncentráció fokozatosan növekedett, így a kezdeti 5-HT/DA arány a DA javára megfordult. A metamorfózis alatt és után, a 80%-os fejlettségi állapot eléréséig, a két monoamin mennyiségében jelentős változást nem mértünk, majd a kikelésig hátralévő két nap alatt az 5-HT és DA koncentrációja drámaian megemelkedett (300%, illetve 200% -kal), miközben az embriók mérete is látványos mértékben megnőtt. Az embriógenézis végére ismét az 5-HT koncentráció értéke volt a magasabb, így a fejlődés kezdetére jellemző 5-HT/DA arány visszaállt. Összevetve megfigyeléseinket más puhatestű fajokon kapott, az embriógenézis során bekövetkező monoamin szintek változásával kapcsolatos eredményekkel mind hasonlóságot, mind eltérést megállapíthatunk. A *Phestilla sibogae* embriójában a DA koncentráció a metamorfózis alatt szintén nem változott (Pires és mtsai., 1997), míg egy tengeri kagyló, a *Pecten maximus* lárvájában a metamorfózishoz közeli állapotban a DA és 5-HT tartalom jelentős növekedést mutatott, majd ezt követően egy éles csökkenés jellemezte a posztlárvális életszakaszt (Cann-Moisan és mtsai., 2002). Ugyanakkor a *Crassostrea gigas* osztrigafaj lárvális élete során a DA tartalom nem változik (Coon és mtsai., 1985). A tapasztalható különbségek háttérében mindenekelőtt az eltérő életkörülmények állhatnak. A tengeri puhatestűek

embriógenézise eltérő az édesvízi fajoktól, mivel már a veligera lárvák is szabadúszó életmódot folytatnak.

Vizsgálataink során sikerült az aminerg rendszer szintézisében résztvevő tirozin és triptofán hidroxilázok, továbbá a DOPA/5-HTP dekarboxiláz jelenlétét is kimutatni a *Lymnaea* embriógenézis korai szakaszában (35%). A specifikus enzim gátlók, prekursorok hatása a monoamin szintekre ugyancsak bizonyítja az enzimek jelenlétét. Triptofán hidroxiláz esetében, az enzim aktivitást az embriók homogenizátumában nem tudtuk kimutatni. Ennek oka a HPLC módszerben keresendő, mivel az 5-HTP csúcs közvetlen közelében egy nagy kofaktor csúcs jelentkezett, ami elmaszkírozta a kapott eredményt. Azonban a triptofán prekursor és a specifikus enzim gátló pCPA hatására bekövetkező 5-HT koncentráció változás tisztán jelzi az 5-HT szintézisének sebességét meghatározó enzim jelenlétét az embrióban. A gerincesekben alkalmazott dekarboxiláz gátló, Nsd-1015 mind a DOPA mind az 5-HTP szubsztrát átalakulását gátolta, valamint a két szubsztrátra vizsgált dekarboxiláz enzim aktivitás az embrió fejlődése során gyakorlatilag egymással párhuzamosan változott. Ezek alapján megállapítható, hogy az embrióban egy dekarboxiláz enzim található, ami mind a DOPA, mind az 5-HTP szubsztrátról képes egy karboxil csoportot lehasítani. Más fajokban is kimutatták, hogy ugyanaz a dekarboxiláz enzim vesz részt mindkét szubsztrát átalakításában. A kinetikai paraméterek alapján az is megállapítható, hogy ez a dekarboxiláz enzim hasonlít a felnőtt *Lymnaeában* (Hiripi, 1970), valamint gerincesekben (Lovenberg és mtsai., 1962) azonosított dekarboxiláz enzimekhez, mivel erősebb affinitást mutat az 5-HTP szubsztrát felé, mint a DOPA szubsztrát felé, és a DOPA dekarboxilációjának mértéke nagyobb, mint az 5-HTP átalakulása. Az embriókban a DOPA és 5-HTP dekarboxilációjának aránya 8.8 volt, ami közel megegyezik a felnőtt csiga központi idegrendszerében (8.3, Hiripi, 1970) és a gerincesek szövetében mért aránnyal (Lovenberg és mtsai., 1962). Gerincesekben alkalmazott dekarboxiláz gátlók az embrióban lévő dekarboxiláz enzimet is képesek voltak gátolni. Az eredményekből arra következtetünk, hogy a monoaminok metabolizmusa hasonlóan mehet végbe a *Lymnaea* embrióban, mint a felnőtt csigában és a gerincesekben, jelezve a monoaminok szintézisének ontogenikus és evolúciós konzerválódását. A DOPA/5-HTP dekarboxiláz aktivitása hasonló módon változott az embrió fejlődése során, mint ahogy az 5-HT és DA koncentrációja. Ezért feltételezzük, hogy a monoaminok szintjének növekedését biztosíthatja egyrészt a szintézisükben résztvevő enzimek

fokozódó aktivitása, másrészt az 5-HT vagy DA tartalmú sejtek számának növekedése az embriogenezis során (Marois és Croll, 1992; Voronezhskaya és mtsai., 1999).

## 5.2. Az 5-HT és DA szerepe az embrionális fejlődésben

Voronezhskaya és mtsai (2004) megfigyelései szerint *Lymnaea stagnalis* és *Helisoma trivolvis* embriogenezise az apikális szerv érző monoamin (5-HT, ill. DA) tartalmú idegsejtjeinek folyamatos, kismértékű gátló hatása alatt áll. Ezek az érző sejtek *Lymnaea* esetében DA-t, míg *Helisoma* esetében 5-HT-t tartalmaznak. Kedvezőtlen környezeti körülmények között a lárva apikális szerve aktivizálódik, ennek hatására több monoamin szabadul fel a sejtekből, ami végül is az embrió fejlődésének a késleltetéséhez vezet. Más közlemények a DA lehetséges szerepéről számoltak be különböző csiga fajok embrióinak, így a *Lymnaea* metamorfózisának a kiváltásában (Voronezhskaya és mtsai., 1992; Pires és mtsai., 2000; Pechenik és mtsai., 2002). Couper és Leise (1996) megfigyelései szerint viszont a külsőleg applikált vagy injektált 5-HT vált ki metamorfózist a caenogastropoda *Ilyanassa obsoleta* lárvaiban.

Saját kísérleteinkben triptofán kezelés hatására a 90%-os stádiumban lévő *Lymnaea* embrió 5-HT szintje megemelkedett (57%), valamint a kezelt embriók fejlődése négy nappal lassabban fejeződött be mint a kontroll egyedeké. Ezzel szemben a pCPA kezelés lecsökkentette az 5-HT koncentrációt több mint 50%-kal, mégis az embriók kikelése később következett be, ebben az esetben hét nappal mint a kezeletlen csoportban. Hasonló eredményeket kaptunk a DA szintézisének farmakológiai módszerrel történő megzavarása során. Tirozin kezelés hatására megemelkedett DA koncentráció és az Nsd-1015 kezelés hatására lecsökkent DA koncentráció következménye szintén az intrakapszuláris élet meghosszabbodása volt. Nsd-1015 és pCPA kezelés hatására bekövetkezett 5-HT szint csökkenést nem csak HPLC módszerrel tudtuk detektálni, hanem immunhisztokémiai festéssel is ki lehetett mutatni. Saját eredményeink jól korellálnak Voronezhskaya és munkatársainak korábbi megfigyeléseivel (2004), amennyiben L-DOPA vagy 5-HTP kezelés hatására a *Helisoma* és *Lymnaea trochophora* lárva fejlődése is elhúzódott. *Lymnaea* embrióban mind az MPTP mind az MPP<sup>+</sup> jodid lecsökkentette a DA szintjét,

az embrió fejlődése hat, ill négy nappal lett hosszabb. A DA rendszerre ható neurotoxinok, az MPTP vagy annak aktív metabolitja az MPP<sup>+</sup> jodid szelektív degenerációt okoznak humán DA tartalmú idegsejtekben (Langston és mtsai., 1983), ezért alkalmazzák ezeket Parkinson kór tanulmányozásában.

Saját megfigyeléseink és az irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy puhatestűek esetében az 5-HT-nak és a DA-nak szerepe van az embriógenézis menetének szabályozásában. Farmakológiai eredményeink nyilvánvalóvá tették, hogy mind a monoamin szintek csökkenése, mind növekedése az embriógenézis késleltetését eredményezi. Feltételezzük, hogy bármilyen irányú változás lép fel az embrió endogén 5-HT vagy DA szintjében, az kedvezőtlenül hat az embrió fejlődésére. Továbbá úgy tűnik, hogy az aktuális 5-HT koncentráció befolyásolja a DA szintet. Mind a triptofán, mind a pCPA kezelés is ezt bizonyítja, amennyiben a kezelés kiváltotta megemelkedett, illetve lecsökkent 5-HT szint maga után vont a DA szint emelkedését, illetve csökkenését. Következésképpen, nemcsak az endogén monoamin tartalom fontos az embrió normális fejlődése szempontjából, hanem egy optimális 5-HT/DA arány is kell hozzá. A felnőtt *Lymnaea* táplálkozásának szabályozásával kapcsolatban hasonló megfigyelésről számoltak be Hernádi és mtsai. (2004) és arra a következtetésre jutottak, hogy a táplálkozási „arousal” kialakításában az 5-HT/DA arálynak jelentős szerep jut. Vizsgálataikból az is kiderül, hogy az egyes „arousal” (izgalmi) állapotok speciális 5-HT/DA aránnyal jellemezhetőek, és a táplálkozás különböző fázisaiban felszabadult DA és 5-HT mennyiségek kölcsönösen határozzák meg a táplálkozás egyik szabályozó neuronjának a központi óriás neuronnak a tüzelési mintázatát.

### **5.3. Az 5-HT és DA szerepe az embrionális viselkedések szabályozásában**

Megfigyeléseink alapján megállapítható, hogy mind az 5-HT, mind a DA szabályozza a *Lymnaea veligera* lárvák forgó mozgását, arra stimuláló hatást fejtenek ki. Azonban különbség mutatkozott a két transzmitter rendszer hatásának erősségében: a DA és DAerg farmakonokra jellemző volt, hogy hatásukat 100-1000-szer nagyobb koncentrációban fejtették ki, mint az 5-HT. Ezzel szemben más puhatestű fajokban a DA ettől eltérő módon befolyásolta a csillók mozgását. *Mytilus* csillós epitéliumának aktivitását a DA gátolta (Catapane, 1979), míg a *Helisoma*



veligera lárvájának forgási sebességére nem volt hatással (Diefenbach és mtsai., 1991). Voronezhskaya és mtsai. (1999) immunhisztokémiai vizsgálataiból kitűnik, hogy veligera állapotban csak két katekolamin tartalmú sejt található az embrióban, melyek az apikális régióban, dorzolaterálisan a száj két oldalán szimmetrikusan helyezkednek el. Ez a két sejt csak az embrionális szakasz alatt látható, a kikelés előtt eltűnnek, ezért átmeneti apikális katekolaminerg (ÁAK) sejteknek nevezték el őket. Mivel ekkor más DA tartalmú sejt még nem jelenik meg a lárvában, feltételezzük, hogy ez a két ÁAK sejt biztosíthatja a DA-t a *Lymnaea* lárvá forgásának szabályozásához. Mindkét sejt mediálisan egy vagy két hosszú axont bocsát ki. Ezek az axonok többször elágazódnak és varikózus rostok hálózatát alakítják ki a csillókkal borított apikális rész alatt. Ezen kívül mindkét sejt még egy vastag axont is kibocsát, mely áthalad az epitéliumon és az embrió apikális és kefalikus régiójának határán lévő csillók közelében végződik. Feltételezhető, hogy a DA ezeken az idegnyúlványokon keresztül is eljuthat a csillós hámsejtekhez. Az apikális sejtek szabályozó szerepét más csigafajok embrióinak forgásában is feltételezték, bár az *Aplysia* (Marois és Carew, 1997a) és a *Helisoma* (Diefenbach és mtsai., 1998) embriókban DA helyett 5-HT található az átmeneti apikális sejtekben. Mivel *Lymnaea*ban az apikális sejtek katekolamin tartalmúak a vizsgálatainkban biokémiaileg detektált 5-HT jelenléte más sejtekhez köthető. Marois és Croll (1992) vizsgálatai szerint az első 5-HT-IR sejtek a *Lymnaea* veligera stádiumában jelennek meg. Ez a C4 elnevezésű páros sejt a később kialakuló cerebrális ganglion területén lokalizálódik. Axonjaik a cerebrális-pedális konnektívumon keresztül a fejlődő láb felé futnak. Még a veligera stádiumra jellemző, hogy közvetlenül a C4 sejtek megjelenése után a kialakuló pedális ganglion területén is detektálható egy pár 5-HT-IR sejt (Epe1 neuronok). A pedális idegen keresztül ezek a sejtek szintén beidegzik a lábat. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a C4 és az Epe1 sejtek lehetnek a felelősek a veligera lárvá mozgásának 5-HT szabályozásáért. A vizsgálataink eredménye szerint az 5-HT hatásosabban stimulálta a forgást, mint a DA. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy *Lymnaea* embrióban az 5-HT receptorok a csillós hámsejtek felszínén helyezkednek el, ahogy azt a *Helisoma* embriókban már bebizonyították (Goldberg és mtsai., 1994). Így akár kevesebb 5-HT molekula már hatékonyan képes befolyásolni a forgás sebességét, míg DA esetében valószínűsítjük, hogy a DA receptorok nem a csillók felszínén helyezkednek el, hanem mélyebben a szövetekben, ezért a DA hatása közvetett lehet.

A metamorfózis utáni felnőttzerű csiga csúszó mozgását vizsgálva megállapítottuk, hogy a DA nem befolyásolta ezt a viselkedésformát. Ugyanakkor az 5-HT stimulálta a csúszó mozgást, még ha nem is olyan hatékonyan, mint ahogy a veligera lárva forgását. Kemenes és mtsai. (1989) a felnőtt *Lymnaea* pedális ganglionjában HPLC módszerrel igen magas koncentrációban mérték az 5-HT jelenlétét, mellyel párhuzamosan gazdag 5-HT-IR beidegzést is kimutattak. Hetherington és mtsai. (1994) a *Lymnaea* lábban detektáltak intenzív 5-HT-IR innervációt, mely a központi idegrendszerből ered. Ezeken az idegnyúlványokon keresztül az 5-HT képes ingerelni a csillós hámot, ami a láb elülső talpi részét beborítja (Syed és mtsai., 1988, McKenzie és mtsai., 1998). Ezek az eredmények jelzik, hogy a felnőtt csiga mozgásának szabályozásában az 5-HT kulcsszerepet tölt be. Azonban a pedális ganglion gazdag 5-HT-IR neuron állománya és a láb intenzív 5-HT-IR ideghálózata már a felnőttzerű, posztmetamorfotikus embrióra is jellemző (Marois és Croll, 1992). A kikelés utáni posztembrionális (juvenilis) korban további 5-HT-IR sejtek jelennek meg a pedális ganglionban (Croll és Chiasson, 1989), de az embrió immunhisztokémiai (Marois és Croll, 1992) és saját farmakológiai vizsgálataink alapján, az 5-HT fontos szabályozó szerepe már az embrió csillók hajtotta forgó és csúszó mozgásánál egyértelműnek tűnik. Egyes az opisthobranchiák közé tartozó csigákon (*Aplysia*, *Tritona*, *Clione*) végzett kísérletek alátámasztják az 5-HT-nak a mozgást szabályozó fontos szerepét (Sakharov és mtsai., 1989; Satterlie, 1991; McClellan és mtsai., 1994). Megemlítendő, a piócák csillós mozgásának ugyancsak fontos stimuláló neurotranszmitterre az 5-HT (Sakharov és mtsai., 1988).

Ami a reszelőnyelv (radula) rendszeres mozgását illeti, mely az embriógenesiz vége felé jelenik meg az embriónál, eredményeink alapján egyértelmű, hogy azt mind az 5-HT, mind a DA befolyásolja. Mindkét monoamin stimuláló hatású; 5-HT esetében a hatás már alacsonyabb koncentrációnál (0.1 mM) megfigyelhető, míg a DA csak 1 mM koncentrációban volt képes meggyorsítani a radula kiöltését. Számos vizsgálat bizonyította már, hogy a felnőtt *Lymnaea* táplálkozás szabályozásának az 5-HT és a DA az egyik fontos neurotranszmittere vagy neuromodulátora. Mivel *Lymnaeában* a táplálkozási mintázatgenerátor DA elemeit még nem ismerjük, így főleg csak az *Aplysián* és a *Helisomán* kapott eredményekre támaszkodhatunk. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy mind a DA mind az azonosított DAerg neuron parancs (command) szereppel bírnak. Képes beindítani, ill. fenntartani a központi

mintázatgenerátor ritmikus aktivitását, emellett növeli a fiktív táplálkozás intenzitását és/vagy frekvenciáját, míg az 5-HT minden szinten modulálja a táplálkozási rendszert (Yeoman és mtsai., 1996; Kemenes, 1997; Quinlan és mtsai., 1997; Elliott és Vehovszky, 2000; Kabotyanski és mtsai., 2000; Murphy, 2001; Patel és mtsai., 2004). A metamorfózis után a *Lymnaea* embrióban mindkét cerebrális ganglionban jelenlévő egy-egy óriás 5-HT tartalmú sejt, a CGC sejtek nyúlványrendszere fokozatosan kiteljesedik és az embriógeneszis végére beidegzik mindkét bukkális (pofa) gangliont, illetve a pofaizomzatot (Marois és Croll, 1992, Balog és Elekes, 2008). A 95%-os fejlettségi stádium elérésekor, amikor vizsgáltuk a radula mozgást, már megjelennek az első katekolamin tartalmú sejtek is a bukkális ganglionokban (Voronezhskaya és mtsai., 1999). Az eredményekből arra következtetünk, hogy a felnőtt szerű embrió "fiktív" táplálkozását a két monoamin már hasonló módon szabályozza, mint a szabadon mozgó és aktívan táplálkozó felnőtt, ill. juvenilis csiga esetében. Az embrió táplálkozási viselkedésének érése igen jól párhuzamba állítható a HPLC méréseink során tapasztalt monoamin szint erőteljes növekedésével és korábbi kutatásokból (Marois és Croll, 1992; Voronezhskaya és mtsai., 1999; Balog és Elekes, 2008) már megismert az 5-HT és katekolamin tartalmú neuronok fokozódó megjelenésével a bukkális és cerebrális ganglionokban, ami erre az embrionális fejlődési szakaszra jellemző.

Vizsgálataink szerint az embrió szívverésére mind az 5-HT mind a DA azonos koncentrációban hatott (1mM), de míg az 5-HT serkentette, addig a DA gátolta a szívverést. Korábbi kutatások már felvetették mindkét monoamin lehetséges hírvivő szerepét puhatestűek szívének szabályozásában, kiváltképpen erős bizonyítékok támasztják alá az 5-HT szerepét (Hill és Welsh, 1966; Kiss és S.-Rózsa, 1977). Buckett és mtsai. (1990a) HPLC módszerrel detektálták a DA és az 5-HT jelenlétét felnőtt *Lymnaea* szívében. Az 5-HT bizonyult az elsődleges monoaminnak, nagy mennyiségben fordult elő a szívben, míg a DA csak alacsony koncentrációban volt jelen. Továbbá izolált szívpreparátumon végzett farmakológiai vizsgálataikkal igazolták, hogy mindkét monoamin serkentőleg hat a szív működésre, és hatásuk jellege alapján mindketten neurotransmitterként vesznek részt a szabályozásban. Ezeknek az eredményeknek részben ellentmond saját farmakológiai vizsgálataink eredményei, melyek szerint a DA az embrió szívverésére inhibitoriként hatott. Buckett és mtsai. (1990b) kardiovaszkuláris motoros neuronokat írtak le *Lymnaea* viscerális és pedális ganglionjaiban, és ezek közül a motoros neuronok közül kettő,  $H_{he}$  és  $S_{he}$

bizonyítottan 5-HT-t használ hírvivő anyagként. Abban a fejlődési szakaszban (75%), amikor vizsgáltuk a két monoamin hatását a szívműködésre, az első 5-HT-IR sejtek már jelen vannak a fejlődő abdominális ganglion gyűrűben, melyből később a parietális és viscerális ganglionok differenciálódnak (Marois és Croll, 1992). Az hogy ezek a sejtek közül valamelyik megegyezik a felnőtt  $H_{he}$  vagy  $S_{he}$  sejtekkel nem tudni, de ha a felnőtt csiga szívműködésében részvevő 5-HT tartalmú sejtek egy része a viscerális ganglionban helyezkedik el, akkor feltételezhető, hogy az embriónak a fejlődő abdominális gyűrűben elhelyezkedő 5-HT-IR sejtjei közül valamelyik részt vesz az embrionális szívverés szabályozásában. DA serkentőleg hat a felnőtt *Lymnaea* szívműködésére, azonban élettani szerepe nem egészen ismert még (Chase, 2002), mivel eddig nem azonosítottak még olyan kardioaktív neuront, melyből DA szabadulna fel. Ugyanakkor Buckett és mtsai. (1990b) szerint a légzési mintázat generátor hálózat egyik interneuron tagja, a pedális DA tartalmú RPeD1 sejt hatással van a szívverésre. Minden valószínűség szerint a RPeD1 DAerg neuron úgy befolyásolhatja a szívműködést, hogy a légzési neuronhálózat átfedésben van a keringést szabályozó hálózattal. A 75% stádiumban lévő embrióban ez a sejt már jelen van, így valószínű, hogy ez a neuron a DAerg regulátora az embrionális szívműködésnek.

#### 5.4. Aminerg receptorok a fejlődő csigában

A gerincesekhez képest, ahol terjedelmes irodalom áll a kutató rendelkezésére a monoamin receptorokról, a puhatestűek esetében, de lényegében az egész gerinctelen állatvilágot nézve, nagyon kevés adattal rendelkezünk. Az elmúlt évtizedek kutatásai sorra fedezték fel a gerincesek 5-HT és DA receptor családjainak újabb és újabb tagjait, ami szükségessé tette osztályozásukat. Noha a gerinctelenek monoamin receptorainak fiziológiai és farmakológiai vizsgálata ugyan párhuzamosan folyik a gerinces kutatásokkal, a mai napig nem létezik egy jól definiált osztályozási rendszer a gerinctelen receptorokra vonatkozóan. Ezért az azonosított receptorokat az emlősökben felállított kategóriák alapján igyekeznek a kutatók osztályozni, noha a legtöbb esetben a gerinctelen receptorok farmakológiai jellemzői nem egyeznek meg a gerincesekéivel. Így a kísérleteink során kapott eredmények alapján mi is megpróbáltuk a gerinceseken felállított receptor osztályok szerint beazonosítani a

veligera lárva forgómozgásának, majd a fejlettebb állapotban lévő embriók csúszó és radula mozgásának valamint, szívműködésének szabályozásában szerepet játszó monoaminok receptorait. A farmakológiai és a ligand kötési kísérletek eredménye alapján azonban egyértelműen csak a forgómozgás szabályozásában részt vevő 5-HT receptorát sikerült 5-HT<sub>1A</sub> receptorként azonosítani. Eredményeinkkel először mutattuk ki, hogy a puhatestűekben ez a gerincesekben leírt és azzal azonos 5-HT receptor típus megtalálható.

Walcourt-Ambakederma és Winlow (1994a, b; 1995) három endogén 5-HT receptortípust, az 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> és 5-HT<sub>3</sub>-t azonosítottak sejt kultúrában nevelt azonosított *Lymnaea* neuronokon. Azonban csak kisszámú és nem szelektív agonistákat, antagonistákat használtak, valamint a hatásos koncentrációk (mM) túl magasak voltak ahhoz, hogy a hatásukat specifikusnak tekinthessük. *Helix* (Drummond és mtsai., 1980) és *Aplysia* központi idegrendszerében (Kadan és Hartig, 1988) nem tudták kimutatni az 5-HT nagy affinitású kötődését. Laboratóriumunkban biokémiai vizsgálatai azt mutatták, hogy a felnőtt *Lymnaea* idegrendszerében sem az 5-HT sem az ismert 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub> receptor ligandok nem kötődnek nagy affinitással (Hiripi és Elekes, nem publikált). Mindhárom faj központi idegrendszerében csak az <sup>3</sup>H-LSD mutatott nagy affinitású kötődést és a kötődés farmakológiai tulajdonsága is hasonló volt. Nehezíti a receptor jellemzését az a tény is, hogy <sup>3</sup>H-LSD nemcsak az 5-HT, hanem a DA receptorhoz is kötődik a puhatestűek idegrendszerében és az LSD kötődés gátlását akár az 5-HT, akár a DA receptorhoz hatásosan csak ergot alkaloidák és neuroleptikumok gátolják, a receptor altípusok szelektív agonistái vagy antagonistái nem, így szinte lehetetlen a receptor osztályozása. A *Lymnaea* idegrendszerében eddig két 5-HT receptort klónoztak. Sugamori és kollegái (1993) az egyik klónozott receptort az 5-HT<sub>1</sub> receptorhoz hasonlónak írták le és 5-HT<sub>1Lym</sub> receptornak nevezték el. Az 5-HT<sub>1</sub> receptorhoz való hasonlóságot azonban csak a receptor gén strukturális hasonlósága támasztja alá. Az expresszált receptor farmakológiai tulajdonsága már kevésbé bizonyítja az 5-HT<sub>1</sub> receptorral való azonosságot. A felnőtt *Lymnaea*-ban vizsgált endogén (Hiripi és Elekes, nem publikált) és a klónozott receptor tulajdonsága között a hasonlóság az, hogy mindkét receptor nagy affinitással köti az <sup>3</sup>H-LSD-t, valamint az 5-HT<sub>1</sub> receptorra szelektív 5-HT, 5-CT, 8-OH-DPAT affinitása mindkét receptorhoz alacsony. Azonban az endogén receptor vizsgálataink szerint pozitívan kapcsolódik az adenil-cikláz rendszerhez, míg a klónozott receptorról

feltételezik, hogy az negatívan kapcsolt (Sugamori és mtsai, 1993; Tierney, 2001). A másik receptort Gerhard és munkatársai (1996) klónozták és a tulajdonságai alapján a gerinces 5-HT<sub>2</sub> típusú receptorként jellemezték, ezért 5-HT<sub>2Lym</sub> receptornak nevezték el. Ez utóbbi receptor esetében azonban hibridizációs vizsgálatok kimutatták, hogy csak nagyon kevés idegsejten expresszálódik, ami szemben áll a ganglionok gazdag 5-HTerg innervációjával (Kemenes és mtsai., 1989).

Fiziológiai és farmakológiai eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a *Lymnaea* embrió forgómozgását szabályozó 5-HT receptor azonos a gerincesek 5-HT<sub>1A</sub> típusú receptorával. Az 5-HT<sub>1A</sub> receptor szelektív agonistája, a 8-OH-DPAT az 5-HT-hez és az LSD-hez hasonlóan igen alacsony koncentrációban jelentős mértékben stimulálja a forgómozgást. A gerinces 5-HT<sub>1A</sub> receptorhoz hasonlóan a receptor negatívan kapcsolt az adenil-cikláz rendszerhez, mert mind az 5-HT, mind az LSD kezelés csökkenti az embrió cAMP szintjét. <sup>3</sup>H-5HT-t használva ligandként igazoltuk, hogy az embrionális membrán pellet nagy affinitással nM-os tartományban köti az 5-HT-t ( $K_d = 7,36$  nM). A Scatchard analízis azt mutatta, hogy egyetlen kötőhely létezik és a pellet mg-ra számított kötőhelyeinek száma 221 fmol. Továbbá a farmakológiai vizsgálatok szerint, hogy a kötődést leghatásosabban az 5-HT, ettől kisebb hatásossággal a szelektív agonista 8-OH-DPAT és az ugyancsak szelektív antagonistá WAY100635 gátolta. Nagyobb koncentrációban gátolta a kötődést az 5-CT és az 5-HT<sub>1A</sub> receptoron hatásos, de az 5-HT<sub>1B</sub> receptoron hatástalan spiperon is.

Goldberg és mtsai. (1994) *Helisoma* embrióban az 5-HT<sub>1</sub> típusú receptor jelenlétét feltételezték, azonban kísérleti eredményeik nem támasztják alá ezt. Ugyanis a 8-OH-DPAT serkentő hatása csak mérsékelt volt a forgómozgásra másrészt kapcsolatot az 5-HT receptor és a második hírvivő rendszer között nem találtak.

*Aplysia* perifériás szövetéből klónoztak egy 5-HT<sub>1</sub> receptor típusú 5-HT<sub>ap1</sub> receptort (Angers és mtsai., 1988). Igazolták, hogy az expresszált receptor negatívan kapcsolt a második hírvivő rendszerhez. A ligand kötés vizsgálatok során azonban csak <sup>3</sup>H-LSD-t használták ligandként, és a leszorításos vizsgálatok azt mutatták, hogy a 8-OH-DPAT affinitása mérsékelt, míg az 5-CT affinitása nagy. Arra, hogy a receptor nem teljes mértékben egyezik a gerinces 5-HT<sub>1</sub> receptorral az 5-HT<sub>ap1</sub> elnevezéssel is utaltak.

Bár a 8-OH-DPAT az embrionális csúszó mozgást is jelentősen stimulálta, azonban mozgás szabályozásában szerepet játszó 5-HT receptor pontos azonosításához nincs elég adatunk. A radula mozgás és a szívműködés esetében csak az LSD bizonyult hatásos agonistának, a többi alkalmazott farmakon csak olyan magas koncentrációban volt képes kifejteni gátló vagy stimuláló hatását, ami megkérdőjelezi specifitásukat. Ezért, a kapott eredményekből ebben a két esetben sem lehet tisztázni, milyen 5-HT receptor vesz részt szabályozásukban.

Az egyes viselkedési formák, a csúszás kivételével, és a szívműködés DAerg farmakológiai vizsgálatai alapján is csak annyit lehet megállapítani, hogy a DA részt vesz a szabályozásukban. Minthogy azonban a DAerg agonisták, antagonisták csak magas koncentrációban bizonyultak hatásosnak, a DA receptor típus azonosítása nem volt lehetséges.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az 5-HT és a DA igen fontos szerepet töltenek be a puhatestűek idegi szabályozási folyamataiban, ahol neurotranszmitterként, neuromodulátorként vagy neurohormonként viselkedhetnek. Széles körben vizsgálták hatásukat mind az élettani folyamatokra mind az állat viselkedésére, de az embriógenézisben betöltött szerepük még messzemenően nem tisztázott. Hiánypótló munkánk során néhány ilyen tisztázatlan kérdésre kerestük a választ biokémiai és farmakológiai kísérleteink során, melyeket nagy mocsárcsiga (*Lymnaea stagnalis*) embriókon végeztünk.

Eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Mind az 5-HT mind a DA a fejlődés korai szakaszában (12%) már jelen van az embrióban, a DA mennyisége fokozatosan emelkedik a metamorfózisig, míg az 5-HT tartalom viszonylag nem változik. A metamorfózis alatt egyik monoamin esetében sem tapasztalható jelentős változás, azonban a fejlődés utolsó két napjában mind kettő szintje drasztikusan megemelkedik.
2. A *Lymnaea* embrió szervezetében kimutatható a monoaminok szintézisében szerepet játszó enzimek jelenléte, így a tirozin és triptofán hidroxiláz és az 5-HTP/L-DOPA dekarboxiláz. Az utóbbi esetében megállapítást nyert, hogy egy enzimről van szó, mely mindkét monoamin szintézisében részt vesz. A gerincesek dekarboxiláz enzim gátlója az Nsd-1015 mind az 5-HTP mind az L-DOPA átalakulását gátolja. A két szubsztrátra mért aktivitása párhuzamosan változik az embriógenézis során, mely szintén alátámasztja azon feltételezést, hogy egy enzimről van szó. Az enzim aktivitása továbbá követi a monoamin mennyiségek változását is
3. Farmakológiai vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az endogén monoamin szint megváltoztatása, akár megemelése vagy lecsökkentése kedvezőtlenül hatott az embrió fejlődésére, lelassítva annak menetét. Az embrió 5-HT tartalmának megváltozása hatással volt a DA tartalomra is, amiből arra a következtetésre jutottunk, hogy egy optimális 5-HT/DA arány biztosítja az embrió normális fejlődését.
4. A monoaminok nem csak az embrió fejlődésére voltak hatással, hanem az embrió egyes viselkedéseire és szív működésére is. A forgó mozgást mind



az 5-HT mind a DA serkentette, míg a csúszó mozgást csak az 5-HT gyorsította meg, a DA nem volt rá hatással. A radula mozgásra szintén serkentőleg hatott a két monoamin. A forgás és radula mozgás esetében mindig az 5-HT volt a hatásosabb a DA-nal szemben. A szív működésre egyforma koncentrációnál fejtette ki hatását a két monoamin, de míg az 5-HT serkentette a szívverést, addig a DA lassította azt.

5. Az embrió monoamin receptorainak azonosítása csak a forgó mozgás esetében sikerült. A veligera lárva mozgásánál a kapott eredmények alapján a gerincesek 5-HT<sub>1A</sub> receptor altípusához hasonló receptor szerepét feltételezzük. A fejlettebb embrió csúszómozgásánál a fiziológiai eredményeink alapján szintén 5-HT<sub>1</sub> receptor meglétét feltételezzük, de biokémiai vizsgálatok hiányában megerősíteni nem tudjuk még ezt az eredményt. A többi viselkedési formánál, ill. szív működésnél az alkalmazott farmakonok olyan nagy koncentráció tartományban hatottak csak, hogy ez megkérdőjelezi specifitásukat, ill. specifikus receptorok jelenlétét.
6. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy mind az 5-HT mind a DA alapvető szerepet játszik a *Lymnaea stagnalis* korai és felnőttkori magatartás formáinak szabályozásában illetve érésében.

## 7. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Filla A, Hiripi L, Elekes K (2004) Serotonergic and dopaminergic influence of the duration of embryogenesis and intracapsular locomotion of *Lymnaea stagnalis* L. *Acta Biol. Hung.* 55: 315-321; Impakt faktor: 0.447

Filla A, Hiripi L, Elekes K (2009) Role of aminergic (serotonin and dopamine) systems in the embryogenesis and different embryonic behaviors of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 149: 73-82; Impakt faktor: 2.345

### A disszertáció témájához kapcsolódó konferencia előadások, poszterek, előadás kivonatok

Filla A, Hiripi L, Elekes K: Aminerg rendszerek farmakológiai manipulációjának hatása a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis*, embriogenezisére. *MITT IX. Konferenciája Balatonfüred, 2003. jan. 22-25. (Clinical Neuroscience/ Ideggyógyászati Szemle 56, 2. különszám: 26).*

Filla A, Hiripi L, Elekes K: Effect of pharmacological manipulation of the aminergic system on the embryogenesis of the snail *Lymnaea stagnalis*. *10<sup>th</sup> Symposium on Invertebrate Neurobiology, Hungary, Tihany, 2003 júl. 5-9*

Filla A, Hiripi L, Elekes K: Role of serotonin and dopamine in the regulation of embryonic locomotion of *Lymnaea stagnalis*. *IBRO International Workshop Budapest, 2004. jan. 29-31. (Clinical Neuroscience/ Ideggyógyászati Szemle 57, 1. különszám: 19-20).*

Filla A, Hiripi L, Elekes K: Role of aminergic systems in the regulation of feeding activity and heartbeat in embryos of *Lymnaea stagnalis*. *XI. MITT kongresszus Pécs, 2005. jan. 25-29. (Clinical Neuroscience/ Ideggyógyászati Szemle 58, 1 különszám: 30)*

- Filla A, Hiripi L, Elekes K: Possible role of aminergic systems in the development and behavior of embryos of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *ISN.ESN 20<sup>th</sup> biennial meeting*, Austria, Innsbruck 2005. aug. 21-26 *J.Neurochem.* 94: 172.
- Filla A, Hiripi L, Elekes K: Role of aminergic systems in the embryonic development of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *XIII. MITT kongresszus Szeged*, 2007. jan. 24-27. (*Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle* 60, 1 különszám: 19-20)
- Filla A, Balog G, Hiripi L, Elekes K.: Biochemical and immunohistochemical characterization of the 5-HTergic system in the buccal mass of the developing and adult pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *IBRO International Workshop Debrecen*, 2008. jan. 23-26. (*Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle* 61, 1. különszám: 27)
- Balog G, Filla A, Hiripi L, Elekes K: 5-HT is a transmitter candidate in the peripheral feeding system of an invertebrate, *Lymnaea*. Chemical-neuroanatomical and biochemical evidences. *6<sup>th</sup> FENS Forum Genf*, 2008. júl. 12-16. (*absztrakt szám: 180.3*)

## 8. IDÉZETT IRODALOM

- Aghajanian GK és Sanders-Bush E (2002). Serotonin. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (eds) *Neuropsychopharmacology. The fifth generation of progress*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 15–34
- Albertson DG és Thomson JN (1976). The Pharynx of *Caenorhabditis elegans* *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 275: 299-325
- Amin AH, Crawford TBB és Gaddum JH (1954). The distribution of Substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J. Physiol.* 125: 596–618
- Ando H és Kuwasawa K (2004). Neuronal and neurohormonal control of the heart in the stomatopod crustacean, *Squilla oratoria*. *J. Exp. Biol.* 207: 4663-4667
- Andretic R, van Swinderen B és RJ (2005). Greenspan, Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr Biol* 15: 1165–1175
- Angers A, Storozhuk MV, Duchaîne T, Castellucci VF, DesGroseillers L (1998). Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J. Neurosci.* 18: 5586-5593
- Audesirk G, McCaman RE és Willows AOD (1979). The role of serotonin in the control of pedal ciliary activity by identified neurons in *Tritonia diomedea*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 62: 87-91
- Baines RA, Tyrer NM és Mason JM (1989). The innervation of *Locust* salivary glands. I. Innervation and analysis of transmitters. *J. Comp. Physiol. A* 165: 395-405
- Baines RA és Tyrer NM (1989). The innervation of *Locust* salivary glands. II. Physiology of excitation and modulation. *J. Comp. Physiol. A* 165: 407-413
- Balog G és Elekes K (2008). Functional neuroanatomy of the 5-HTergic system in the developing and adult buccal complex of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Acta Biol. Hung.* 59: (Suppl) 55-59

- Barnes S, Syed NI, Bulloch AGM és Lukowiak K (1994). Modulation of ionic currents by dopamine in an interneuron of the respiratory central pattern generator of *Lymnaea*. *J. Exp. Biol.* 189: 37-54
- Baumel S (1998). Serotonin: How to Naturally Harness the Power Behind Prozac and Phen/Fen. McGraw-Hill Professional
- Baxter DA és Byrne JH (2006). Feeding behavior of *Aplysia*: A model system for comparing cellular mechanisms of classical and operant conditioning. *LEARNING & MEMORY* 13: 669-680
- Benjamin PR (1983). Gastropod feeding: behavioural and neural analysis of a complex multicomponent system. In *Neural Origin of Rhythmic Movements*. Roberts A, Roberts B (eds.), Cambridge University Press, Cambridge UK pp. 159-193
- Beltz SB és Kravitz EA (1983) Mapping of serotonin-like immunoreactivity in the lobster nervous system. *J. Neurosci.* 3: 585-602
- Berridge KC és Robinson TE (1998). What is role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews* 28: 309-369
- Berry MS és Cottrell GA (1975). Excitatory, inhibitory and biphasic synaptic potentials mediated by an identified dopamine containing neurone. *J. Physiol.* 244: 589–612
- Birkmeyer W és Riederer P (1989). Understanding the Neurotransmitters: Key to the Workings of the Brain. Translated by Karl Blau. New York: Springer-Verlag Wien
- von Bohlen und Halbach O és Dermietzel R (2006). Neurotransmitters and neuromodulators. Wiley, VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Buckett KJ, Dockray GJ, Osborne NN és Benjamin PR (1990). Pharmacology of the myogenic heart of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 63: 1403-1425

- Buckett KJ, Peters M és Benjamin PR (1990b). Excitation and inhibition of the heart of the snail, *Lymnaea*, by non-FMRFamidergic motoneurons. *J. Neurophysiol.* 63: 1436-1447
- Bullock TH és Horridge GA (1965). Structure and function in the nervous system of invertebrates. Freeman and Co., San Francisco
- Byrne JH, Baxter DA, Buonomano DV, Cleary LJ, Eskin A, Goldsmith JR, McClendon E, Nazif FA, Noel F és Scholz KP (1991). Neural and molecular bases of nonassociative and associative learning in *Aplysia*. *Annu. NY Acad. Sci.* 627: 124-149
- Cann-Moisán C, Nicolas L és Robert R (2002). Ontogenic changes in the contents of dopamine, norepinephrine and serotonin in larvae and postlarvae of the bivalve *Pecten maximus*. *Aquat. Living Resour.* 15: 313–318
- Carew TJ és Sahley CL (1986). Invertebrate learning and memory: from behavior to molecules. *Annu. Rev. Neurosci.* 9: 435-487
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T és Waldeck B (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127: 471
- Carretta M (1988). The Retzius cells in the leech: a review of their properties and synaptic connections. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A: 405-413
- Castellanos FX és Tannock R (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorders: the search for endophenotypes. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 617-28
- Catapane EJ (1979). Neurophysiological correlates of the dopaminergic cilio-inhibitory mechanism of *Mytilus edulis*. *J. Exp. Biol* 83: 315-323
- Chase DL és Koelle MR (2007). Biogenic amine neurotransmitter in *C. elegans*. *Wormbook* 1-15
- Chase R (2002). Behavior and its neuronal control in Gastropod Molluscs Oxford University Press, Oxford

- Chudasama Y és Robbins TW (2006). Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biol. Psychol.* 73: 19-38
- Civelli O (2000). Molecular biology of the dopamine receptor subtypes. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress, Part I. Preclinical Section, American College of Neuropsychopharmacology*
- Colbert HA és Bargmann CI (1995). Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 14: 803–812
- Cottrell GA, Greenberg MJ és Price DA (1983). Differential effects of the molluscan neuropeptide FMRFamide and related met-enkephalin derivative YGGFMRFamide on the *Helix* tentacle retractor muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C:373-5
- Cook IM (1966). The sites of action of pericardial organ extract and 5-hydroxytryptamine in the decapods crustacean heart. *Am. Zool.* 6: 107-121
- Coon SL, Bonar DB és Weiner RM (1985). Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94: 211–221
- Couper, JM és Leise EM (1996). Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Biol. Bull.* 191: 2178-2186
- Croll RP (1987). Distribution of monoamines in the central nervous system of the nudibranch *Hermisenda crassicornis*. *Brain Res.* 405: 337-347
- Croll RP, Voronezhskaya EE, Hiripi L, Elekes K (1999). Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: II. postembryonic development of central and peripheral cells. *J. Comp. Neurol.* 404: 297-309
- Crossman AR (2000). Functional anatomy of movement disorders. *J Anat.* 196: 519-25

- Cuttle MF, Hevers W, Langhlin SB és Hardie RC (1995) Diurnal modulation of photoreceptor potassium conductance in the locust. *J. Comp. Physiol. A* 176: 307-316
- Dahlström A és Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 232: 1–55
- David JC és Coulon JF (1985). Octopamine in invertebrates and vertebrates *Prog. Neurobiol.*, 24: 141-185
- Diefenbach TJ, Koehncke NK és Goldberg JI (1991). Characterization and development of rotational behavior in *Helisoma* embryos: role of endogenous serotonin. *J. Neurobiol.* 22: 922-934
- Diefenbach TJ, Solely BD és Goldberg JI (1995). Neurite branch development of an identified serotonergic neuron from embryonic *Helisoma*: evidence for autoregulation by serotonin. *Dev. Biol.* 167: 282-293
- Diefenbach TJ, Koss R és Goldberg JI (1998). Early development of an identified serotonergic neuron in *Helisoma trivolvis* embryos serotonin expression, de-expression, and uptake. *J. Neurobiol.* 34: 361-376
- Dobson KS, Dmetrichuk JM és Spencer GE (2006). Different receptors mediate the electrophysiological and growth cone responses of an identified neuron to applied dopamine. *Neuroscience* 141: 1801-1810
- Doran SA, Koss R, Tran CH, Christopher KJ, Gallin WJ és Goldberg JI (2004). Effect of serotonin on ciliary beating and intracellular calcium concentration in identified populations of embryonic ciliary cells *J. Exp. Biol.* 207, 1415-1429
- Drummond HA, Bucher F és Levitan IB (1980). d-[3H]Lysergic acid diethylamide binding to serotonin receptors in the molluscan nervous system *J. Biol. Chem.*, 255: 6679-6686
- Ehringer H és Hornykiewicz O (1960). Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.*, 38: 1236–1239.



- Elekes K, Huster R és Gettard M (1987). Serotonin-immunoreactive and dopamine-immunoreactive neurones in the terminal ganglion of the cricket, *Acheta domestica*: Light- and electron-microscopic immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* 250: 167-180
- Elekes K és Hustert R (1988). The efferent innervation of the genital chamber by an identified serotonergic neuron in the female cricket *Acheta domestica*. *Cell Tissue Res.* 252: 449-457
- Elekes K. (1991). Serotonin-immunoreactive varicosities in the cell body region and neural sheath of the snail, *Helix pomatia*, ganglia: an electron microscopic immunocytochemical study. *Neurosci.* 42: 583-591
- Elekes K, Kemenes G, Hiripi L, Geffard M és Benjamin PR (1991). Dopamine-immunoreactive neurones in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Neurol.* 307: 214-224
- Elliott CJH és Vehovszky A (2000). Comparative pharmacology of feeding in molluscs. *Acta Biol. Hun.* 51: 153-163
- Erspamer V és Asero B (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169: 800–801
- Frazer A és Hensler JG (1999). Understanding the neuroanatomical organization of serotonergic cells in the brain provides insight into the functions of this neurotransmitter. *Basic Neurochemistry* (Sixth ed.) Lippincott Williams and Wilkins
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A és Nagy G (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80: 1523–1631
- Fuchs E, Dustmann JH, Stadler H és Schürmann FW (1989) Neuroactive compounds in the brain of the honeybee during imaginal life. *Comp. Biochem. Physiol. C* 92: 337-342
- Fuxe K, Dahlström A, Höistad M, Marcellino D, Jansson A, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Jacobsen K, Tinner-Staines B, Hagman B, Leo G, Staines W, Guidolin D, Kehr J, Genedani S, Belluardo N és Agnati LF (2007). From the Golgi-Cajal mapping to

- the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission. *Brain Res Rev.* 55: 17-54
- Gaddum JH és Hameed KA (1954). Drugs which antagonise 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.* 9: 240–248.
- Gardner CR és Walker RJ (1982). The roles of putative neurotransmitters and neuromodulators in annelids and related invertebrates. *Prog. Neurobiol.* 18: 81-120
- Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E és Van Heerikhuizen H (1996). Functional characterization of a 5-HT<sub>2</sub> receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Eur. J. Pharmacol.* 311: 249-258
- Gerschenfeld HM (1973). Chemical transmission in invertebrate central nervous system and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 53: 1-119
- Gillette R és Davis WJ (1977). The role of the metacerebral giant neurone in the feeding behaviour of *Pleurobranchaea*. *J. Comp. Physiol.* 116: 129-159
- Gillette R és Jing J (2001). The role of the escape swim motor network in the organization of behavioral hierarchy and arousal in *Pleurobranchaea*. *Am. Zool.* 41: 983–92
- Gillette R Moroz LL, Fuller R és Sweedler JV (1997). 5-HT and NO co-localized in neurons of feeding and locomotor networks may interact to regulate hunger state in *Pleurobranchaea*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23: 978
- Giuliano F és Allard J (2001). Dopamine and sexual function *Int J Impot Res.* 3: 18-28
- Glennon RA, Dukat M és Westkaemper RB (2000). Serotonin receptor subtypes and ligands. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*
- Glusman S és Kravitz EA (1982). The action of serotonin on excitatory nerve terminals in lobster nerve-muscle preparations. *J. Physiol.* 325: 223-241

- Goldberg JI, Koehncke NK, Christopher KJ., Neumann C és Diefenbach TJ (1994). Pharmacological characterization of a serotonin receptor involved in an early embryonic behavior of *Helisoma trivolvis*. *J. Neurobiol.* 25: 1545-1557
- Goldstein R, Kistler HB, Steinbuch HW és Schwartz JH (1984). Distribution of serotonin-immunoreactivity in juvenile *Aplysia*. *Neuroscience* 11: 535-547
- Granzow B és Kater SB (1977). Identified higher-order neurons controlling the feeding motor program of *Helisoma*. *Neurosci.* 2:1049-1063
- Granzow B és Rowell CHF (1981). Further observations on the serotonergic cerebral neurones of *Helisoma* (Mollusca, Gastropoda): the case for homology with the metacerebral giant cells. *J. Exp. Biol.* 90: 283-305
- Hamasaka Y és Nässel DR (2006). Mapping of serotonin, dopamine, and histamine in relation to different clock neurons in the brain of *Drosophila*, *J Comp Neurol* 494: 314–330
- Haque Z, Lee TKM, Inoue T, Luk C, Hasan SU, Lukowiak K és Syed NI (2006). An identified central pattern-generating neuron coordinates sensory-motor components of respiratory behavior in *Lymnaea*. *Eur. J. Neurosci.*, 23: 94-104
- Hernádi L, Elekes K és S-Rózsa K (1989). Distribution of serotonin-containing neurons in the central neuron system of the snail *Helix pomatia*. Comparison of immunocytochemical and 5,6-dihydroxytryptamine labelling. *Cell Tissue Res.*, 257: 313-323
- Hernádi L, Juhos S és Elekes K (1993). Distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive and dopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res.* 3: 503-513
- Hernádi L, Erdélyi L, Hiripi L, Elekes K (1998). The organization of serotonin, dopamine, and FMRFamideergic containing elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail, *Helix pomatia*. *J. Neurocytol.* 27:761-775
- Hernádi L és Elekes K (1999). Topographic organization of serotonergic and dopaminergic neurons in the cerebral ganglia and their peripheral projection

- patterns in the head areas of the snail *Helix pomatia* J. Comp. Neurol. 411: 274-287
- Hernádi L, Hiripi L, Dyakonova V, Győri J és Vehovszky Á (2004). The effect of food intake on the central monoaminergic system in the snail, *Lymnaea stagnalis*, Acta Biol. Hung. 55 185-194
- Hernádi L, Vehovszky Á, Győri J, Hiripi L (2008). Neuronal background of activation of estivated snails, with special attention to the monoaminergic system: a biochemical, physiological, and neuroanatomical study. Cell Tissue Res. 331:539-553
- Hetherington MS, McKenzie JD, Dean HG és Winlow W (1994). A quantitative analysis of the biogenic amines in the central ganglia of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L). Comp. Biochem. Physiol. 107 C: 83-93
- Hill RB és Welsh JH (1966). Heart, circulation and blood cells. In: *Physiology of Mollusca*, Eds. K. M. Wilbur and C. M. Yonge. New York: Academic Press II. 4: 125-174
- Hills T, Brockie PJ és Maricq AV (2004). Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. J. Neurosci. 24, 1217–1225
- Hiripi L (1970). Examination of monoamine synthesis and break down in the nervous system and other tissues of *Lymnaea stagnalis* L. Annal. Biol. Tihany 37: 33-41
- Hiripi L, Salánki J, Zs.-Nagy I és Muskó I (1973). Subcellular distribution of biogenic monoamines in the central nervous system of *Anodonta cygnea* L. as revealed by density gradient centrifugation. J. Neurochem. 21: 791-797
- Hiripi L és S-Rózsa K (1987). Alteration of the serotonin level in the central nervous system of *Locusta migratoria* during larval-adult transformation. Acta Biol. Hung. 38: 195-202
- Hochberg R (2007). Serotonin-like immunoreactivity in the central and peripheral neurons systems of the interstitial Acochlidae *Aspersina* sp. (Opsithobranchia). Biol. Bull. 213: 43-54

- Homberg U (1994) Distribution of neurotransmitters in the insect brain. Progress in Zoology Stuttgart: Fisher Verlag 40
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston JE és Evans PD (1982). Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science 216, 1012–1014.
- Hoyer D, Hannon JP és Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol, Biochem. Behav. 71: 533-554
- Hustert R és Topel U (1986). Location and major postembryonic changes of identified 5-HT immunoreactive neurons in the terminal ganglion of the cricket (*Acheta domesticus*). Cell Tissues Res. 245: 615-621
- Inone T, Haque Z, Lukowiak K és Syed NI (2001). Hypoxia-induced respiratory patterned activity in *Lymnaea* originates in the periphery. J. Neurophysiol. 86: 156-163
- Jiang J, Moroz LL és Gillette R (1998) Serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the marine molluscs *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*. J. Comp. Neurol. 395: 466-480
- Jing J és Gillette R (1999). Central pattern generator for escape swimming in the notaspid sea slug *Pleurobranchaea californica*. J. Neurophysiol. 81: 654-667
- Jing J és Gillette R (2000). Escape swim network interneurons have diverse roles in behavioral switching and putative arousal in *Pleurobranchaea*. J Neurophysiol 83:1346–55.
- Jing J és Gillette R (2003). Directional avoidance turns encoded by single neurons and sustained by multifunctional serotonergic cells. J Neurosci 23:3039–51.
- Jones HD (1983). The circulatory systems of gastropods and bivalves. In: *The Mollusca*, edited by Saleuddin ASM és Wilbur KM New York: Academic, 5: 189-238
- Kabotyanski EA, Baxter DA, Cushman SJ és Byrne JH (2000). Modulation of fictive feeding by dopamine and serotonin in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 83: 374-392

- Kadan MJ és Hartig PR (1988). Autoradiographic localization and characterization of [125I]lysergic acid diethylamide binding to serotonin receptors in *Aplysia* Neuroscience, 24: 1089-1102
- Katz PS, Getting PA és Frost WN (1994). Dynamic neuromodulation of synaptic strength intrinsic to a central pattern generator circuit. *Nature* 367: 729-731
- Kebabian JW, Petzold GL és Greengard P (1972). Dopamine-sensitive anenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain and its similarity to the dopamine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69: 2145–2149.;
- Kemenes Gy (1997). *In Vivo* neuropharmacological and *in vitro* laser ablation techniques as tools in the analysis of neuronal circuits underlying behavior in a molluscan model system. Gen. Pharmac. 29: 7-15
- Kemenes Gy, Elekes K, Hiripi L, Benjamin PR (1989). A comparison of four techniques for mapping of serotonin and serotonin-containing neurons in fixed and living ganglia of the snail, *Lymnaea*. J. Neurocytol. 18: 193-208
- Kemenes Gy és Benjamin PR (1989). Appetitive learning in snails shows characteristics of conditioning in vertebrates Brain Res. 489: 163-166
- Kerkut GA és Cottrell GA (1963). Acetylcholine and 5-hydroxytryptamine in the snail brain. Comp. Biochem. Physiol. 8: 53–63.
- Kiehn L, Saleuddin S és Lange A (2001). Dopaminergic neurons in the brain and dopaminergic innervation of the albumen gland in mated and virgin *Helisoma duryi* (mollusca: pulmonata). BMC Physiology 1: 9
- Kiss T és S.-Rózsa K (1977). Pharmacological properties of 5-HT-receptors of the *Helix pomatia* L. (Gastropoda) heart muscle cells. Comp. Biochem. Physiol. 61C: 41-46
- Klemm N (1985). The distribution of biogenic monoamines in invertebrates. In Neurobiology: Comparative Aspects of Aminergic Neurons, pp. 280-96, (ed. Gilles, R. & Balthazer, J.). Berlin: Springer
- Kloppenburg P és Erber J. (1995) The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honeybee (*Apis mellifera* L.) II.

- Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula. *J. Comp. Physiol. A* 176: 119-129
- Koert CE, Spencer GE, Minnen J, Li KW, Geraerts WPM, Syed NI, Smit AB és Kesteren RE (2001). Functional implications of neurotransmitter expression during axonal regeneration: serotonin, but not peptides, auto-regulate axon growth of an identified central neuron. *J. Neurosci.*, 21: 5597-5606
- Koob GF és Swerdlow NR (1988). The functional output of the mesolimbic dopamine system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 537: 216–227
- Koss R, Diefenbach TJ, Kuang S, Doran SA és Goldberg JI (2003) Coordinated development of identified serotonergic neurons and their target ciliary cells in *Helisoma trivolvis* embryos. *J. Comp. Neurol.*, 457: 313-325
- Kristan WB, Calabrese RL, Friesen WO (2005). Neural control of leech behavior. *Prog Neurobiol* 76: 279-327
- Kuang S és Goldberg JI (2001). Laser ablation reveals regulation of ciliary activity by serotonergic neurons in molluscan embryos. *J. Neurobiol.* 47: 1-15
- Kumashiro M, Iwano M és Sakai M (2008) Genitalic autogrooming in the male cricket, *Gryllus Bimaculatus* degeer. *Acta Biol. Hung.*, 59 (Suppl.): 137-148
- Kume K, Kume S, Park SK, Hirsh J és Jackson FR (2005). Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly, *J Neurosci* 25: 7377-7384
- Kupfermann I és Weiss KR (1981). The role of serotonin in arousal of feeding behavior of *Aplysia*. In: *Serotonin Neurotransmission and Behavior*, edited by B. E. Jacobs, and A. Gelperin. Cambridge: MIT, 255-287
- Longley RD és Longley AJ (1986) Serotonin immunoreactivity in the gastropod *Aplysia californica*. *J. Neurobiol.* 17: 339-358
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* 219: 979-980
- Lehman HK és Greenberg MJ (1987). The actions of FMRFamide-like peptides on visceral and somatic muscles of the snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* 131: 55-68

- Leise EM, Thavaradhara K, Durham NR és Bryan ET (2001). Serotonin and nitric oxide regulate metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*. *Amer. Zool.*, 41: 258–267
- Lent CM, Zundel D, Freedman E és Groome JR (1991). Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioral effects. *J. Comp. Physiol. A* 168: 191-200
- Levenson J, Byrne JH és Eskin A (1999). Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training. *J. Neurosci.* 19: 8094-8103
- Lovenberg W, Weissbach H és Udenfried S (1962). Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 237: 89-93
- Lutz EM és Tyrer NM (1988). Immunohistochemical localization of serotonin and choline acetyltransferase in sensory neurons of the locust. *J. Comp. Neurol.* 267: 335-42
- Mackey SL, Kandel ER és Hawkins RD (1989). Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of *Aplysia* produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons. *J Neurosci* 9:4227–35
- Maddrell SHP és Phillis JE (1975). Secretion of hypo-osmotic fluid by the lower Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 62:671-3
- Magoski NS, Bauce LG, Syed NI és Bulloch AGM (1995). Dopaminergic transmission between identified neurons from the mollusk, *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol* 74: 1287-1300
- Malyshev AY, Norekian TP és Willows AO (1999). Differential effects of serotonergic and peptidergic cardioexcitatory neurons on the heart activity in the pteropod mollusc, *Clione limacina*. *J. Comp. Physiol. A* 185: 551-560
- Marois R (1989). Embryonic development of *Lymnaea stagnalis*: General, neuronal and behavioral aspects. M.Sc. thesis, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia



- Marois R és Croll RP (1992). Development of serotoninlike immunoreactivity in the embryonic nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Neurol.*, 322: 255-265
- Marois R és Carew TJ (1997a). Fine structure of the apical ganglion and its serotonergic cells in the larvae of *Aplysia californica*. *Biol. Bull.* 192: 388-398
- Matsutani T és Nomura T (1986). Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopekten yessoensis*. *Cell Tissue Res.* 244: 515-517
- Maynard DM, Welsh JH.(1959). Neuronhormones of the pericardiacal organs of brachyuran crustacea. *J. Physiol.* 149: 215–227.
- McCaman MW, Ono KJ és McCaman RE (1979). Dopamine measurements in molluscan ganglia and neurons using a new, sensitive assay. *J. Neurochem.* 32: 1111-1113
- McClellan AD, Brown GD, Getting PA (1994). Modulation of swimming in *Tritonia* excitatory and inhibitory effects of serotonin. *J. Comp. Physiol. A* 174: 257-266
- McCrohan CR és Audesirk TE (1987). Initiation, maintenance and modification of patterned buccal motor output by the cerebral giant cells of *Lymnaea stagnalis* *Comp. Biochem. and Physiol. Part A: Physiol.* 87: 969-977
- McKenzie JD, Counce M, Hetherington MS és Winlow W (1998). Serotonergic innervation of the foot of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *J. Neurocytol.* 27: 459-470
- McPherson DR és Blankenship JE (1991). Neural control of swimming in *Aplysia brasiliiana*. III. Serotonergic modulatory neurons. *J. Neurophysiol.* 66: 1366-1379
- Mescheriakov VN (1990). The common pond snail *Lymnaea stagnalis*. In: Detlaf D. A, Vassetzky SG, Eds. *Animal Species for Developmental Studies*. New York: Plenum Press. pp. 69-132
- Messenger JB (1996). Neurotransmitters of cephalopods *Invert. Neurosci.* 2: 95-114

- Mitchell JB, Gratton A (1994). Involvement of mesolimbic dopamine neurons in sexual behaviors: implications for the neurobiology of motivation. *Rev Neurosci.* 5: 317-29
- Morrill JB (1982). Development of the pulmonate gastropod, *Lymnaea*. In: Harrison F W, Cowden RR editors. *Developmental Biology of the Freshwater Invertebrates*. New York: Alan R. Liss. pp. 399-483
- Moroz LL, Sudlow LC, Jing J, Gillette R (1997). Serotonin-immunoreactivity in peripheral tissues of the opisthobranch mollusc *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*. *J. Comp. Neurol.* 382: 176-188
- Murphy Don A (2001). The neuronal basis of feeding in the snail, *Helisoma*, with comparisons to selected gastropods. *Prog. Neurobiol.* 63, 383-408
- Nässel DR (1988). Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects *Prog. Neurobiol.*, 30: 1-85
- Nässel DR, Mayer EP és Klemm N (1985). Mapping and ultrastructure of serotonin-immunoreactive neurons in the optic lobes of three insect species. *J. Comp. Neurol.* 232: 190-204
- Nässel DR és Elekes K (1992). Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res.* 267: 147-167
- Nelson TJ és Alkon DL (1997). Biochemistry of molluscan learning and memory. *Bioassays* 19:1045-1053
- Niacaris T és Avery L (2003). Serotonin regulates depolarization of the *C. elegans* pharyngeal muscle. *J. Exp. Biol.* 206: 223–231
- Palovcik RA, Basberg BA és Ram JL (1982). Behavioral state changes induced in *Pleurobranchaea* and *Aplysia* by serotonin. *Behav. Neural Biol.* 35: 383-394,
- Parent A (1984). Functional anatomy and evolution of monoaminergic systems. *Amer. Zool.* 24: 783-790

- Patel BA, Arundell M, Parker KH, O'Hare D és Yeoman MS (2005). Decreases in the serotonin content of a pair of identified neurones can explain the effects of p-chlorophenylalanine on the feeding behavior of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Bioanaly. Syst.* 21: 53-58
- Pauwels PJ (2003). 5-HT receptors and their ligands. *Tocris Reviews No. 25*, Tocris Cookson, Bristol, UK
- Pavlova GA és Bakeeva LE (1993). Locomotor activity of denervated foot in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 23: 516–523 (in Russian)
- Pechenik JA, Li W és Cochrane DE (2002). Timing is everything: the effects of putative dopamine antagonists on metamorphosis vary with larval age and experimental duration in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *Biol. Bull.* 202: 137–147
- Pentreath VW, Berry MS és Osborne NN (1982). The serotonergic cerebral cells in gastropods. *Biology of serotonergic transmission*. Chichester: John Wiley and Sons. pp. 457-513
- Pires A, Croll RP és Hadfield MG (2000). Catecholamines modulate metamorphosis in the opisthobranch gastropod *Phestilla sibogae* *Biol. Bull.* 198: 319-331
- Prator BC (2006). Serotonin syndrome. *J. Neurosci. Nurs.* 38: 102-105
- Quinlan EM, Arnett BC és Murphy AD (1997). Feeding stimulants activate an identified dopaminergic interneuron that induces the feeding motor program in *Helisoma* *J. Neurophysiol.* 78: 812-824
- Randy JN (2006). *Biology of aggression*. Oxford University Press, USA
- Rapport MM (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin). V. The presence of creatinine in the complex: a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.*, 180: 961–969
- Raven CP (1958). *Morphogenesis: the analysis of molluscan development*. Eds.: Harris J. E. and Yemm E. W. Pergamon Press London, New York, Paris, Los Angeles

- Rogers CM, Franks CJ, Walker RJ, Burke JF és Holden-Dye L (2001). Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine, and FMRFamide-like neuropeptides. *J. Neurobiol.* 49: 235–244.;
- Rosen SC, Susswein EC, Cropper EC, Weiss KR és Kupfermann I (1989). Selective modulation of spike duration by serotonin and the neuropeptide FMRFamide, SCP, buccalin and myomodulin in different classes of mechanoafferent neurones in the cerebral ganglion of *Aplysia*. *J. Neuroscience.* 9:390-402
- Ruben P és Lukowiak K (1983). Modulation of the *Aplysia* gill withdrawal reflex by dopamine. *J. Neurobiol.* 14: 271-284
- S.-Rózsa K (1984). The pharmacology of molluscan neurons. *Prog. Neurobiol* 23: 79-150
- Saifullah ASM és Tomioka K (2002) Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between the optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* 205: 1305-1314
- Sakharov DA, Golubev AI, Malyutina LV, Kabotyanski EA, Nezlin LP (1988). Serotonergic control of ciliary locomotion in a turbellarian flatworm. *Symposia Biologica Hungarica* 36: 479-491
- Sakharov DA, Milosevic I, Salimova N (1989). Drug-induced locomotor stereotypes in *Aplysia*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C, 161-166
- Sakharov DA (1990). Integrative functions of serotonin common to distant related invertebrate animals. In: *The Early Brain*, edited by Gustafsson MKS és Reuter M Abo: Abo Akademy, pp. 73-88.
- Sanyal S, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P, Bigras E, Merz DC, Hebert TE, van der Kooy D, Schafer WR, Culotti JG és Van Tol HH (2004). Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 23: 473–482
- Satterlie RA (1991). Neural control of speed changes in an opisthobranch locomotory system. *Biol. Bull.* 180: 228-233

- Satterlie RA, Norekian TP, Jordan S és Kazilek CJ (1995). Serotonergic modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limanica* I. Serotonin immunoreactivity in the central neurons system and wings. *J. Exp. Biol.* 198: 895-904
- Satterlie RA és Norekian TP (1996). Modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limacina*: role of a compartmental serotonergic system. *Invert. Neurosci.* 2: 157-165
- Sawin ER, Ranganathan R és Horvitz HR (2000). *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron* 26: 619–631
- Schürmann FW, Elekes K és Geffard M (1989). Dopamine-like immunoreactivity in the bee brain. *Cell Tissue Res.* 256: 399-410
- Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S és Heisenberg M (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*, *J Neurosci* 23: 10495–10502
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M és Wong K (1976). Antipsychotic drug doses and neuroleptics/dopamine receptors. *Nature*, 261: 717–719
- Siegelbaum SA, Kandel ER (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Op. Neurobiol.* 1: 113-120
- Skelton M, Alevizos A és Koestr J (1992). Control of the cardiovascular system of *Aplysia* by identified neurones. *Experientia* 48: 809-817
- Smeets WJAJ és Reiner A (Eds.) (1994). Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. Cambridge University Press, Cambridge
- Sourkes TL (1989). Disorders of the basal ganglia In.: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P. (eds.) *Basic Neurochemistry*. Raven Press: New York, pp 233-251.

- Spencer GE, Klumperman J és Syed NI (1998). Neurotransmitters and neurodevelopment. Role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation. *Persp. Dev. Neurobiol.* 5: 451-467
- Stefano BG, Zhao X, Bailey D, Metlay M és Leung MK (1989). High affinity dopamine binding to mouse thymocytes and *Mytilus edulis* (bivalvia) hemocytes. *J. Neuroimmunol.* 21: 76-74
- Strange PG (1991). Interesting times for dopamine receptors. *Trends Neurosci.*, 14: 43–45.
- Sugamori KM, Sunahara RK, Guan HC, Bulloch AGM, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB és Van Tol HH (1993). Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11-15
- Swann JW, Pierson MG és Dahlström A (1982). Dopaminergic innervation of *Aplysia* gill muscle. *Cell. Mol. Neurobiol.* 4: 325-331
- Syed NI, Harrison D és Winlow W (1988). Locomotion in *Lymnaea* – role of serotonergic motorneurons controlling the pedal cilia. *Symposia Biologica Hungarica* 36: 387-402
- Syed NI, Bulloch AGM és Lukowiak K (1990). In vitro reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science* 250: 282-285
- Syed NI és Winlow W (1991). Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I. Behavioral analysis and relevant motor neurons. *J. Comp. Physiol.* 169: 541-555
- Takeda N. (1997). A phylogenetic analysis of biogenic monoamines in the central nervous systems of various organisms and application to the fields of medical biochemistry. *Progress in HPLC-HPCE*, 6: 169-211
- Tierney A. J. (2001) Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128: 791-804
- Treseder SA, Jackson M és Jenner P (2000). The effects of central aromatic amino acid DOPA decarboxylase inhibition on the motor actions of L-DOPA and dopamine agonists in MPTP-treated primates. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1355-1363

- Tsyganov VV és Sakharov DA (1999). Locomotor rhythms in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: site of origin and neurotransmitter requirements. *Acta Biol. Hung.*, 51: 189-195
- Twarog BM, Page IH (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175: 157-161
- Twarog BM (1954). Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J. Cell Comp Physiol* 44: 141-163
- Uemura T, Yamashita T, Haga C, Miyazaki N, Kondo H és Matsushita M (1987). Localization of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of *Octopus vulgaris* by immunohistochemistry. *Brain Res.* 406: 73-86
- Uretsky NJ és Iversen LL (1970). Effects of 6-hydroxy-dopamine on catecholamine containing neurones in the rat brain. *J. Neurochem.* 17: 269-278
- Vallés AM és White K (2004) Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: Development and distribution. *J. Comp. Neurol.* 268: 414-428
- Vieillermaringe J, Duris P, Geffard M, Le Moal M, Delaage M, Bensch C és Girardie J (1984). Immunohistochemical localization of dopamine in the brain of the insect *Locusta migratoria migratorioides* in comparison with the catecholamine distribution determined by the histofluorescence technique. *Cell Tissue Res.* 237: 391-394
- Voronezhskaya EE, Pavlova és Sakharov DA (1992). Possible control of molluscan embryogenesis by neuronal catecholamines *Ontogenesis*, 23: 295 (in Russian)
- Voronezhskaya EE és Elekes K (1993). Distribution of serotonin-like immunoreactive neurones in the embryonic nervous system of lymnaeid and planorbid snails. *Neurobiol.* 1: 371-383
- Voronezhskaya EE, Hiripi L, Elekes K és Croll R (1999). Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors. *J Comp Neurol* 404: 285-296

- Voronezhskaya EE, Khabarova MYu és Nezlin LP (2004). Apical sensory neurones mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails. *Development*, 131: 3671-3680
- Walcourt-Ambakedermo A és Winlow W (1994a). 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Comp. Biochem. Physiol.* 107: 129-141
- Walcourt-Ambakedermo A és Winlow W (1994b). 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>2</sub> receptors *Gen. Pharmacol.* 25: 1079-1092
- Walcourt-Ambakedermo A és Winlow W (1995). 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors *Gen. Pharmacol.* 26: 553-561
- Walker RJ és Kerkut GA (1978). The first family (adrenaline, noradrenaline, dopamine, octopamine, tyramine, phenylethanolamine and phenylethylamine). *Comp. Biochem. Physiol.* 61C: 261-266
- Walker RJ, Hedges A és Woodruff GN (1986). The pharmacology of the neurones of the *Helix aspersa*. *Symp. Zool. Soc. London* 22:33-74
- Walker RJ és Holden-Dye L (1991). Evolutionary aspects of transmitter molecules, their receptors and channels. *Parasitology.* 102: S7-S29
- Walker RJ, Brooks HL és Holden-Dye L (1996). Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors. *Parasitology.* 113: S3-S33
- Walters ET (1991). A functional, cellular and evolutionary model of nociceptive plasticity in *Aplysia*. *Biol. Bull.* 160: 241-251
- Weiger WA (1996). Serotonergic modulation of behavior: a phylogenetic overview. *Biol. Rev.* 72: 61-95
- Weinshenker D, Garriga G és Thomas JH (1995). Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *J. Neurosci.* 15, 6975–6985



- Weiss KR, Cohen JL és Kupfermann I (1978). Modulatory control of buccal musculature by serotonergic neuron (metacerebral cell) in *Aplysia*. J. Neurophysiol. 41:181-203
- Wise RA, Rompre P-P (1989). Brain dopamine and reward, Annu. Rev. Psychol. 40: 191-225.
- Zhang ZS, Fang B, Byrne DW és Clearly LJ (1991). Serotonergic varicosities make synaptic contacts with pleural sensory neurons of *Aplysia*. J. Comp. Neurol. 311: 259-270
- Yamanaka M, Hatakeyama D, Sadamoto H, Kimura T és Ito E (2000). Development of key neurons for learning stimulates learning ability in *Lymnaea stagnalis* Neurosci Lett. 278: 113-116
- Yeoman MS, Vehovszky A, Kemenes G, Elliott CJH és Benjamin PR (1995). A novel interneuron having hybrid modulatory-central pattern generator properties in the feeding system of the snail, *Lymnaea*. J. Neurophysiol. 73: 112-124
- Yeoman MS, Brierley MJ és Benjamin PR (1996). Central pattern generator interneurons are targets for the modulatory serotonergic cerebral giant cells in the feeding system of *Lymnaea*. J. Neurophysiol. 75: 11-25

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az egyetemi diploma megszerzése után kutatói pályafutásomat Tihanyban a Magyar Tudományos Akadémia Balatoni Limnológiai Intézetében sikerült elindítanom, ahol nem csak, mint tudományos segédmunkatárs dolgozhattam, hanem PhD tanulmányaimat is megkezdhetem a Pécsi Egyetem Biológiai Doktori iskolájának levelező hallgatójaként. Doktori munkámat a tihanyi intézet Kísérletes Állattani Osztályán végeztem két témavezetőm Prof. Elekes Károly tudományos igazgató helyettes és Dr. Hiripi László vezetésével.

Ezúton szeretnék mindkettőjüknek köszönetet mondani segítségükért, mely nélkülözhetetlen volt a kutatás megtervezésétől kezdve az eredmények közzétételéig bezáróan, beleértve a szakmai vezetést, a felmerülő problémák leküzdését. Külön köszönettel tartozók támogatásukért, hogy mind hazai mind nemzetközi konferenciákon megmérhettem magam, új tudományos ismeretekre és ismerősökre tehettem szert.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani azon asszisztenseknek, akik lelkesen és türelmesen segítettek a laboratóriumi munkák kivitelezésében. Itt szeretném megemlíteni, a biokémiai labor lelkes dolgozóit, Karácsonyi Évát és Steinbachné Mészáros Ildikót, akik időközben már elmentek, de segítségük számomra felejthetetlen és Erőssné Ihász Katalint, aki doktori munkám utolsó éveiben mindig szívesen állt rendelkezésemre a biokémiai mérések elvégzésében. Nagyné Fekete Zsuzsának nagyon köszönöm az immunhisztokémiai módszer elsajátításában, technikai kivitelezésében nyújtott segítségét.

Külön köszönet illeti azon kollégákat, akik szakmai problémáimat készségesen meghallgatták és tudásuktól telhetően szakmai tanácsokkal igyekeztek a segítségemre. A számítógépes programok használata terén jelentkező hiányosságaimat pótolgatták, eredményeim statisztikai kiértékelésekor időt és energiát nem spórolva mentő övet dobtak.

Nem szeretnék megfeledkezni Kiss Rózsa, intézetünk könyvtárosáról sem, aki lehetetlent nem ismerve a kért irodalmat a föld alól is előkerítette számomra.