

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

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

PhD értekezés

Filla Adrienn

Témavezetők:

Dr. Elekes Károly
a biológia tudomány doktora

Dr. Hiripi László
a biológiai tudományok kandidátusa

Pécs-Tihany, 2008

1. BEVEZETÉS

A szerotonint (5-HT) a 19. század közepén fedezték fel. Szerepének valódi kutatása az 1930-as években kezdődött és 1951-en szintetikus úton elő is állították. A dopamint (DA) korábban, 1910-en szintetizálták, de csak az 1950-es évektől kezdték felismerni fiziológiai hatásának fontosságát. Mindkét monoamin igen ősi és széles körben elterjedt molekula. Szinte valamennyi gerinces és gerinctelen fajban kimutatták jelenlétüket. 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. Szerkezetük és keletkezésük alapján mindkettő a biogén aminok közé tartozik. Az 5-HT rövid metabolizációs folyamat révén a triptofánból alakul ki, a triptofán hidroxiláz és az aminosav dekarboxiláz közreműködésével, míg a DA tirozinból szintetizálódik, és a folyamatban résztvevő enzimek a tirozin hidroxiláz és az előbb említett aminosav-dekarboxiláz. A monoaminok sokféle fiziológias hatásukat membrán-kötött receptoraikon keresztül fejtik ki. Jelenleg 14 5-HT receptort különböztetnek meg, melyeket hét osztályba sorolnak. A DA receptoroknak 5 típusa ismert eddig és két osztályba sorolják ezeket. Mindegyik DA és 5-HT receptor típus, kivéve az 5-HT₃-t, G-fehérje kapcsolt.

A gerincesek központi idegrendszerében az 5-HT tartalmú idegsejtek főleg az agytörzs Raphe magjaiban csoportosulnak, nyúlványaik az előagy különböző területeit idegzik be, illetve leszálló axonjaik szinapsziszokat képeznek a gerincvelő érző és mozgató neuronjain. Az idegvégződésekből felszabaduló 5-HT főleg más neurotranszmitter hatását modulálja, így számos élettani folyamat és viselkedés szabályozásában vesz részt, mint pl. testhőmérséklet, alvás, hangulat, étvágy, agresszió, memória, tanulás. A DA a gerinces agy számos területén szintetizálódik. A DAerg neuronok axonjai négy fő útvonalon idegzik be az agy fő területeit. Szerepe van különböző motoros és kognitív funkciók szabályozásában, a motivációban, érzelmi válaszok kialakításában.

A fejlettebb gerinctelenekben, eltérően a gerincesekétől az 5-HT tartalmú idegsejtek szétszórtnak, a különböző ganglionokban találhatóak, és axonjaik sűrűn beidegzik az egész központi idegrendszert. Csigákban főleg serkentő neuromodulátorként működik, és alapvető szerepet tölt be az idegi és viselkedésbeli izgalmi állapot kialakításában. Szerepe van a táplálkozás, a mozgás szabályozásában, a napi ritmus és memória kialakításában, a tanulásban, de funkciói közé sorolhatók a szinaptikus plaszticitás és szinaptikus növekedés szabályozása is. A DA tartalmú sejtek szintén szétszórtnak helyezkednek el a gerinctelenek központi idegrendszerében, melyek többsége interneuron. Nyúlványaik sűrűn beidegzik a ganglionokat, onnan kilépve a periférián is megtalálhatóak. A DAerg rendszer részt vesz a táplálkozás, mozgás és légzés szabályozásában, valamint a tanulás folyamatában.

A *Lymnaea stagnalis* az összehasonlító neurobiológia egyik kiemelkedő modell állata. Az 5-HT és DA tartalmú idegsejtjeinek elhelyezkedése, azok

nyúlványrendszerének mintázata igen részletesen feltérképezett és jellemzett, valamint ezen idegsejtek embriogenezisét is leírták. Számos viselkedés és élettani folyamat (légzés, keringés, mozgás, táplálkozás) szabályozásában tárták fel a két monoamin rendszer szerepét. Egyes 5-HT és DA tartalmú interneuron, viselkedések neuronhálózatainak belső elemeként fontos feladatot tölt be azok szabályozásában. Ilyen interneuron például a DAerg RPeD1 sejt, a légzést szabályozó neuronhálózatban, és az 5-HTerg óriás cerebrális sejt pár a táplálkozást szabályozó neuronhálózatban. A perifériára kimenő axonjaik révén ezek a sejtek közvetlenül is részt vesznek a viselkedések szabályozásában. Ezzel szemben a két rendszer szerepéről a *Lymnaea* embrionális fejlődésében nem sok ismeretanyag áll rendelkezésre, noha eloszlásukról, neuronális fejlődésükről (immunhisztokémiai vizsgálatok) sokat tudunk. Más puhatestű fajokon végzett kísérletek felvetették szerepüket az embriogenezisben és egyes embrionális viselkedések szabályozásában, de az ilyen irányú kísérletek száma kevés.

A *Lymnaea* embrió fejlődése egy átlátszó, szikanyaggal telt kapszulán belül történik (25 °C-on kb. 8 nap). Ez lehetővé teszi egész fejlődésének nyomon követését. A kikelt állat testfelépítésben a felnőtt egyed kicsinyített változata, de szaporodásra még nem képes. Az embriók fejlődési állapota morfológiai, morfometriai és viselkedésszerű tulajdonságok specifikus összerendeződése alapján megállapítható. A fejlődési állapotokat a teljes embrionális fejlődés százalékában fejezik ki, az első sejtosztódás a 0%-ak felel meg, míg a kikelés a 100%-ak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Bár a felnőtt *Lymnaea* 5-HTerg és DAerg idegrendszeréről, valamint betöltött szerepükről az élettani folyamatok és viselkedések szabályozásában igen nagyszámú ismeretanyag gyűlt össze, de keveset tudunk működésükről az embrió fejlődése során. Ezért munkánkban részletes biokémiai és farmakológiai vizsgálatokat végeztünk, hogy pontosabban megvilágítsuk az 5-HT és DA rendszer funkcióját a *Lymnaea* embriogenezisben, valamint az embrionális viselkedések szabályozásában. Célunk a következő volt:

- biokémiai módszerekkel nyomon követni a fejlődő embrió 5-HT és DA szintjének változását az egyedfejlődés során;
- meghatározni az 5-HT és DA szintézis menetét az embrióban, a szintézisben résztvevő enzimeket jellemezni;
- meghatározni az 5-HT és DA szerepét a fejlődés szabályozásában;
- megállapítani, szerepüket egyes embrionális viselkedésekben, mint a forgómozgás, csúszás a kapszula belső felszínén, vagy a radula mozgatása, továbbá egyes fiziológiás folyamatokra, mint a szívverés;
- farmakológiailag jellemezni az 5-HTerg és DAerg szabályozásban résztvevő receptorokat;

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok tartása

A nagy mocsári csigák (*Lymnaea stagnalis*) felnőtt egyedeit a Kis-Balaton csatornáiból gyűjtöttük, majd laboratóriumi akváriumokban tartottuk és neveltük tovább. A munkánkhoz szükséges petezsák mennyiséget az így fenntartott állomány biztosította. Az embriók fejlődési állapotát morfológiai, morfometriai és viselkedésbeli tulajdonságaik alapján állapítottuk meg.

3.2. HPLC analízis

3.2.1. Monoamin szint mérése

A petezsákból véletlenszerűen 25 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 homogenizáltuk és centrifugáltuk, majd közvetlenül injektáltuk a HPLC rendszerbe és mértük az endogén 5-HT és DA szintet. A monoaminok detektálásához Waters 460 típusú elektrokémiai detektort (+ 0,65 V feszültségen) használtunk. A Waters HPLC rendszer (Milford, USA) egy pumpából (1500 modell), egy injektorból (717 plus Auto sampler) és egy kolonna fűtőből (Waters) állt és ezt mind egy 4-s verziószámú Millennium szoftver vezérelte.

3.2.2. Tirozin hidroxiláz aktivitás mérése

Hetven darab 90%-os fejlettségű embriót elhomogenizáltunk *Lymnaea* fiziológiás sóoldatban (40 mM NaCl, 1,7 mM KCl, 1,5 mM Mg²⁺, 4 mM Ca²⁺ és 10mM Tris-HCl; pH 7,4). Későbbiekben ezt a homogenizátumot használtuk enzim forrásként. Az enzim kinetikai paramétereinek megállapításához állandó enzimkoncentráció jelenlétében változtattuk a szubsztrát koncentrációját és mértük a keletkezett termék mennyiségét. Az inkubációs elegy 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 L-tirozint (0,15-4 mM) tartalmazott. A reakciót belső standardot tartalmazó perklórsavval állítottuk le. A HPLC-s analízis előtt alumínium-oxidos szelektív adszorpciós tisztítást alkalmaztunk.

3.2.3. Dekarboxiláz enzim aktivitás mérése

Dekarboxiláz enzim aktivitását 35%-os állapotból kiindulva folyamatosan mértük a kikelés előtti 95%-os állapotig. A fejlődés során a petezsákokból kiszedett embriókat elhomogenizáltuk 0,1 M foszfát pufferben (pH 7). A homogenizátum szolgált enzim forrásként. Mivel irodalmi adatok szerint ez az enzim mind az 5-HT mind a DA szintézisében részt vesz, kísérleteinkben mind L-DOPA mind 5-HTP szubsztrátot használtunk. Az 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 szövet homogenizátumot. A kinetikai elemzések során az L-DOPA és az 5-HTP koncentrációját 0,0025-0,1 mM között változtattuk. HPLC-s analízis előtt folyékony ioncserés tisztítást alkalmaztunk. Hasonló módon jártunk el, amikor az enzim aktivitását *in vitro* kísérletben karbidopával (0,0001-100 μ M), NSD-1015-el (0,001-200 μ M) és α -metil-DOPA-al (0,001-1000 μ M) 20 percig gátoltuk.

3.3. Farmakológiai kezelések

3.3.1. Az embrionális fejlődés nyomon követése

Kísérleti edényenként 20-25 db veligera lárvát vettünk ki a petezsákokból és helyeztünk átszűrt Balaton vízbe. Monoamin prekursorok (triptofán és tirozin), triptofán-hidroxiláz gátló (p-klórfenilalanin [pCPA]), aromás-L-aminosav dekarboxiláz gátló (3-hidroxi-benzilhidrazin [Nsd-1015]), tirozin-hidroxiláz gátló (α -metil-p-tirozin [α MPT] és neurotoxinok (5,7-dihidroxitriptamin [5,7-DHT], 6-hidroxi-dopamin [6-OH-DA], N,metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin [MPTP] és 1-metil-4-fenilpiridinium jodid [MPP⁺ jodid]) 0,001-1 mM koncentrációjú oldatainak hosszú távú hatásait vizsgáltuk az embriók fejlődésére. A kezelés a kikelés állapotáig tartott, az oldatokat naponta cseréltük. Küszöb koncentrációjú oldatokkal történő kezeléskor közvetlenül kikelés előtt HPLC módszerrel mértük a monoamin szint változását. 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.

3.3.2. Embrionális viselkedések elemzése

5-HT, DA, 5-HTerg agonisták (5-karboxiamidotriptamin [5-CT], 2,5-dimetoxi-4-jodoamfetamin [DOI], N,N-dimetiltriptamin [DMT], 8-hidroxidipropilaminotetralin [8-OH-DPAT], D-lizergsav dietilamid [LSD], 1-(2-metoxifenil) piperazin [2-MPP], 2-metilszerotonin és triptamin), 5-HTerg antagonisták (ketanszerin, 7-metiltriptamin, metiszergid, mianszerin és bromlizergsav dietilamid [BOL]), DAerg agonisták (apomorfin, bromokriptin, m-tiramin, p-tiramin és SKF-38393) és DAerg antagonisták (flupentixol, klórpromazin, SCH-23390 és szulpirid) hatását vizsgáltuk a forgó mozgás és csúszó mozgás intenzitására, a reszelő nyelv (radula) mozgás üteme alapján a táplálkozási aktivitásra, valamint a szívverés frekvenciájára. Kísérletekben a petezsákból véletlenszerűen 5 embriót választottunk ki és élettani jellegzetességeiket, viselkedésüket néhány perces időközökkel 4-szer elemeztük. Minden kezelés esetében a vizsgálat átlag értéke legalább 20 embrió elemzéséből adódik.

3.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Veligera lárvákat 0,01 mM pCPA vagy 0,1 mM Nsd-1015 oldattal kezeltünk. A pCPA esetében az 5-HT tartalom változását 60%-os és 85%-os, míg

Nsd-1015-nél 75%-os fejlettségi állapotot elért embriókban vizsgáltuk. Az embriókat körülvevő burkot és a külső csigahéjat eltávolítottuk, majd 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk. Az 5-HT kimutatásához a preparátumokat inkubáltuk monoklonális (egér) anti-5-HT elsődleges antitesttel (1:500). Az immunreakciót fluoreszcens izotiocianáttal (FITC, Dako) kapcsolt egér ellen termeltetett másodlagos antitesttel (1:50) történő inkubálással tettük láthatóvá.

3.5. Ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) analízis

Ötven 90%-os fejlettségű embriót inkubáltunk fiziológiás oldatban, ami tartalmazott 0,5 mM izobutilmetilxantint (IBMX), 0,1 mM guanozin-5-trifoszfátot (GTP), 0,1 mM 5-HT vagy LSD és 0,5 mM adenzin-5-trifoszfát (ATP). Centrifugálás majd folyadék eltávolítás után az embriókat elhomogenizáltuk savas etanolban. A homogenizátumot lecentrifugáltuk, a felülúszót liofilizáltuk. Újraszuszpendálás után cAMP koncentráció mérését az Amersham cég előre összeállított készletét használva végeztük.

3.6. ³H-5-HT kötődés vizsgálata

Metamorfózis előtti embriókból membrán pelletet készítettünk 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH 7,4) történő homogenizálással, többszöri centrifugálással és reszuszpendálással. Az ³H-ligand kötődésének vizsgálatakor a pelletet inkubáltunk 1 ml Tris-HCl pufferben (pH 7,4), mely 0,25-10 nM koncentrációjú ³H-5HT-t tartalmazott. A leszorításos kísérletekben 5 nM ³H-5HT mellett a következő farmakonokat alkalmaztuk: 5-CT, spiperon, WAY100635, 8-OH-DPAT. Az inkubálást GF/C üvegszálas szűrőn át történő gyors vákuumszűrővel fejeztük be és mértük a pellet radioaktivitását. A nem specifikus kötődést 10 nM hideg 5-HT jelenlétében mértük.

3.7. Statisztikai kiértékelés

Az enzimek kinetikai paramétereit és a gátlás IC₅₀ értékeit GraFit számítógépes program segítségével számoltuk, míg a farmakológiai adatok elemzésére és grafikus megjelenítésére Origin programot használtunk. Az eredményeket átlag ± S.E.M adtuk meg. A szignifikáns eltéréseket t-tesztel vizsgáltuk, illetve a viselkedések vizsgálatánál ANOVA és Dunnet tesztet alkalmaztunk Statistica programot használva.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

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

Biokémiai (HPLC) módszerrel sikerült a monoaminok jelenlétét a *Lymnaea* embrió igen korai állapotában (12%) kimutatni. Az endogén 5-HT tartalom 47 fmol/embrió, a DA szint mindössze 15 fmol/embrió volt. Míg az 5-HT mennyisége lényegében nem változott a 75%-os állapot eléréséig, a DA-né fokozatosan

emelkedett a metamorfózis kezdetéig (40%), majd a metamorfózis alatt és után egészen a 80%-os állapotig viszonylag állandó szinten maradt (150 fmol/embrió). A metamorfózis alatt a kezdeti 5-HT/DA arány megfordult. A fejlődés utolsó két napjában (80-100%) ugrásszerűen megnőtt mindkét monoamin szintje, kikeléskor az 5-HT mennyisége elérte a 490 fmol/embrió értéket, a DA koncentráció pedig 400 fmol/embrió volt. Az 5-HT koncentráció értéke ismét magasabb volt, visszaállt a kezdeti állapotra jellemző 5-HT/DA arány.

Kimutattuk a tirozin hidroxiláz, triptofán hidroxiláz és az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz jelenlétét *Lymnaea* embrióban. Az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz enzim aktivitása 35-85%-os fejlettségi állapotok között, mint egy a háromszorosára növekedett, majd a fejlődés utolsó két napján (80-100%) 100-150%-al nőtt meg a 80%-os állapothoz képest. A monoaminok szintje és az enzimaktivitások hasonló módon változtak az embrió fejlődése során. Az enzimaktivitások fokozódása biztosíthatja a monoaminok szintjének növekedését.

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. 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, míg DOPA-ra $V_{\max} = 3,52 \pm 0,32$ pmol/embrió/perc, $K_M = 1,98 \pm 0,3$ mM. A dekarboxiláz erősebb affinitást mutat az 5-HTP felé, viszont a DOPA dekarboxilációjának mértéke nagyobb.

A dekarboxiláz gátlók közül *in vitro* a karbidopa gátolta a leghatásosabban ($IC_{50} = 0,2 \mu M$) az 5-HTP/DOPA dekarboxiláz működését. Az Nsd-1015 IC_{50} értéke $41,6 \mu M$ az α -metil-DOPA $630 \mu M$ volt. Nsd-1015 IC_{50} értéke 5-HTP szubsztrát jelenlétében $2,9 \mu M$ volt. A gátlások hatásossága további bizonyítékot nyújt a dekarboxiláz jelenlétére. Az Nsd-1015 mindkét szubsztrát átalakulására kifejtett gátló hatása, valamint a dekarboxiláz enzimaktivitások párhuzamos változása a fejlődés során egy dekarboxiláz enzim jelenlétét bizonyítja.

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

Az L-triptofán ($100 \mu M$) szignifikánsan megváltoztatta az embriogenezis idejét; a kezelt embriók fejlődése kb. négy nappal (57%) megnyúlt. Hatására az 5-HT mennyisége $189,5 \pm 40,6\%$ -al, míg a DA tartalom $123,6 \pm 49,4\%$ -al emelkedett meg. Az $50 \mu M$ tirozinnal kezelt embriók hét nappal (78%) később keltek ki, noha a DA szintjük csak mérsékelten (24%) volt nagyobb, mint a kontroll embrióké. Mindkét prekursor nagyobb dózisban torzulást vagy halált okozott. Az embriók kifejlődése $10 \mu M$ pCPA-ban történő inkubációjuk esetében kb. hét nappal (78%) tovább tartott. Ez alatt az 5-HT szintje $65,5 \pm 19\%$ -al, a DA szintje $43,45 \pm 14\%$ -al csökkent. Az α MPT $300 \mu M$ koncentrációban nem befolyásolta az intrakapszuláris élet hosszát, nagyobb koncentrációban morfológiai torzulásokat, majd pusztulást okozott. Az Nsd-1015 ($10 \mu M$) lelassította a fejlődést, a kikelés itt is hét nappal később következett be a kontroll egyedekhez képest. MPTP ($10 \mu M$) hatására az

embriók fejlődési ideje kb. hat nappal (67%) nyúlt meg, a DA mennyisége $46 \pm 5\%$ -al csökkent. MPP⁺ (100 μ M) esetében kb. négy nappal (44%) később keltek ki az embriók, a DA szint $37 \pm 6\%$ -al csökkent. Eredményeink nyilvánvalóvá tették, hogy mind a monoamin szintek csökkenése, mind növekedése az embriogenezis késleltetését eredményezi. Valamint az aktuális 5-HT koncentráció befolyásolta a DA szintet, következésképpen, optimális 5-HT/DA arány is fontos a fejlődéshez.

4.3. DAerg és 5-HTerg farmakonok hatása a *Lymnaea* embrió különböző viselkedési formáira

4.3.1 Forgó mozgás

Az alkalmazott farmakonok eltérő koncentrációban hatottak a veligera lárvák (35%) forgására, az oldatok töménysége 1- 1000 μ M tartományon belül mozgott. Az 5-HT agonisták közül az LSD (105%), 5-HT (50,5%), 8-OH-DPAT (56%) és a DMT (40%) már 1 μ M koncentrációban jelentősen serkentették forgást. Más 5-HTerg receptor agonistát töményebb (10-1000 μ M) koncentrációban kellett alkalmazni, hogy hatást érijünk 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 μ M) ellentétes hatást fejtett ki, 75%-al lassította az embriók forgását. Az 5-HTerg antagonisták közül 10 μ M koncentrációnál a mianszerin 35%-al csökkentette a forgási sebességet, viszont a metiszergid 169%-al meggyorsította azt. A 7-metiltriptamin (1000 μ M) is agonistaként viselkedett. A ketanszerin nem fejtett ki hatást. A DAerg agonisták is fokozták a veligera lárvák forgási sebességét, de hatásuk összességében gyengébbnek bizonyult a legtöbb használt 5-HTerg agonistához képest. Közülük a DA (138%) hatott a legjobban, ezt követte a 100 μ M apomorfin (66%). Nagyobb dózisban (1000 μ M) hatott az m-tiramin és a p-tiramin (65-119%). A bromokriptin és az SKF38393 inaktívnak bizonyult. A klórpromazin, mint DAerg antagonistá (1000 μ M) csökkentette a forgást (82%). Megfigyeléseink alapján megállapítható, hogy mind az 5-HT, mind a DA szabályozzák a *Lymnaea* veligera lárvák forgó mozgását, arra stimuláló hatást fejtettek ki. A két transzmitter rendszer hatásának erősségében különbség mutatkozott, az 5-HT rendszer hatásosabban volt képes stimulálni a forgást.

4.3.2. Csúszó mozgás

A 85%-os fejlettségi stádiumtól az embrió felnőttzerű mozgást mutat, a petekapszula belső felszínén csúszkál. A mozgástípus farmakológiai manipulációja során, már 1 μ M koncentrációban az LSD 2254%-al, a metiszergid 1550%-al és a 8-OH-DPAT 787,5%-al fokozták a csúszó mozgás intenzitását. Az 5-HT (10 μ M) 265%-kal gyorsította az embrió csúszását. Az 5-CT (1 mM) 3323%-os növekedést váltott ki. A mianszerin (100 μ M) mint antagonistá 74%-kal gátolta az embrió mozgását. A DA hatástalannak bizonyult.

4.3.3. Táplálkozás (radula mozgatás)

A 95%-os fejlettségű embriók táplálkozási aktivitásra az 5-HTerg farmakonok közül itt is az LSD bizonyult a leghatásosabbnak, 1 μM koncentrációban alkalmazva a radula mozgás 140%-al élénkebbé vált. A DMT (10 μM) 74%-al felgyorsítva a nyelv mozgását. Az 5-HT csak 100 μM koncentrációban tudta 78%-os hatásfokkal gyorsítani. 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 μM koncentrációban 64%-al, míg a 8-OH-DPAT 1 mM dózisban és 35%-al csökkentette a mozgás aktivitását. Az alkalmazott 5-HTerg antagonisták közül csak a mianszerin (100 μM) gátolta a nyelvmozgást (54%), a metiszergiddel (10 μM) és a 7-metiltriptaminnal (100 μM) 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 mozgást. A D_2 receptor agonista apomorfín, a D_2 receptor antagonisták klórpromazin és a $D_{2,1}$ receptorokat antagonizáló flupentixol eltérő koncentrációban (10-1000 μM) de gátló hatást fejtett ki (50-80%). Eredményeink alapján egyértelmű, hogy mind az 5-HT, mind a DA serkentőleg hatott a nyelv mozgására, az 5-HT hatása erősebbnek bizonyult a DA-nál.

4.3.4. Szívverés

Az LSD, triptamin és 5-HT kivételével az alkalmazott anyagok mind gátolták az embrió szívverését. Az LSD-t (100 μM), 10%-al, míg az 5-HT (1 mM) és a triptamin (1 mM) közel egyformán 20%-al serkentette a szív működést. A gátlás mértékét tekintve a következő sorrend alakult ki a többi 5-HTerg farmakon között: DOI (10 μM , 15%) > 7-metiltriptamin (100 μM , 25%) > 8-OH-DPAT (200 μM , 23%) > mianszerin (500 μM , 246%) > DMT (1 mM, 41%) > 2-metil-5-HT (1 mM, 16%). 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 μM koncentrációban, míg a bromokriptin és az SKF-38393 hatástalanak 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. Vizsgálataink szerint az embrió szívverésére az 5-HT serkentőleg, míg a DA gátlólag hatott.

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. 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. Az 5-HT-IR axonok

varikózus arborizációi is megfigyelhetők voltak már a központi idegdúcokban, valamint a láb felé futó perifériás nyúlványok mentén. Ezzel szemben 0,01 mM pCPA vagy 0,1 mM NSD-1015 kezelt embriókban sem központi, sem perifériás szinten immunreaktív elem nem volt látható. Immunhisztokémiai módszerrel is sikerült az Nsd-1015 és pCPA kezelés hatására bekövetkezett 5-HT szint csökkenést detektálni, megerősítve a triptofán-hidroxiláz és dekarboxiláz jelenlétét az embrióban.

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.

4.6. A ^3H -5-HT kötődés vizsgálata

Eredményeink szerint a jelzett ligand specifikusan kötődik az embrionális membrán preparátumhoz. A specifikus kötődés a koncentráció függvényében telítési görbével jellemezhető. A jelzett 5-HT kötődése nagy affinitású (K_d 7,36 nM, B_{max} 221 fmol/mg pellet). A Scatchard analízis azt mutatta, hogy egyetlen kötőhely létezik. A jelzett ligand kötődését az alábbi sorrendben gátolták az alkalmazott farmakonok: 5-HT > 8-OH-DPAT > WAY100635 > 5-CT = spiperon.

A forgó mozgás, a cAMP koncentráció és a jelzett 5-HT kötődés farmakológiai vizsgálatából arra következtetünk, hogy a *Lymnaea* embrió forgómozgását szabályozó 5-HT receptor azonos a gerincesek 5-HT_{1A} típusú receptorával. A többi viselkedés esetében nem sikerült megállapítani milyen 5-HT vagy DA receptor típus vesz részt a szabályozásukban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* embrióiban vizsgáltuk az 5-HTerg és a DAerg rendszer szerepét a fejlődés, egyes embrionális viselkedések (forgó és csúszó mozgás, radula mozgatása) és a szív működés szabályozásában. A kísérletek során biokémiai, farmakológiai és immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk. 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 változatlan marad. 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 feltételezést alátámasztja, hogy a gerincesek dekarboxiláz enzim gátlója az Nsd-1015 mind az 5-HTP mind az L-DOPA átalakulását gátolja, valamint a két szubsztrátra mért aktivitása párhuzamosan változik az embriógenezis során. Az enzim aktivitása követi a monoamin mennyiségek változását is
3. Farmakológiai vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az endogén monoamin szint akár megemlése akár 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 szívműködésére 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 szívműködésre 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_{1A} receptor altípusához hasonló receptor szerepét feltételezzük. A fejlettebb embrió csúszómozgásánál a fiziológiai eredményeink alapján szintén 5-HT₁ receptor meglétét feltételezzük, de biokémiai vizsgálatok hiányában megerősíteni nem tudjuk még ezt az eredményt. A radula mozgásánál, ill. szívműködésnél 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* érésében, illetve korai és felnőttkori magatartás formáinak szabályozásában.

6. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

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; IF: 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; IF: 2.435

A disszertáció témájához kapcsolódó konferencia előadások, posztterek

- Filla A, Hiripi L, Elekes K: Aminerg rendszerek farmakológiai manipulációjának hatása a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis*, embriógenézisére. *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*. *10th 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 és 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 és behavior of embryos of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *ISN.ESN 20th 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. 6th FENS Forum Genf, 2008.
júl. 12-16. (*absztrakt szám: 180.3*)