NOS/NADPH-DIAFORÁZ POZITÍV NEURONOK ANATÓMIÁJA ÉS FIZIOLÓGIAI TULAJDONSÁGAI GERINCTELEN MODELL-ÁLLATOKBAN

Zsombok Andrea

PhD értekezés tézisei

Pécs, 2002

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi évtized kutatási eredményei alapján általánosan elfogadottá vált, hogy a gerinces és gerinctelen állatok idegrendszerében találhatók olyan idegsejtek, amelyek a szabadgyök-természetű nitrogén-monoxidot (NO) transzmitterként használják. Az ún. NOerg transzmisszió vizsgálata jelentős eredményekkel gazdagította a neuronok működéséről alkotott ismereteinket. Számos kísérleti eredmény bizonyítja, hogy a nitrogén-monoxid szerepet játszik a szinaptikus kapcsolatok fejlődésében és az idegrendszer plaszticitásában, a tanulási- és memóriafolyamatokban, valamint egyes érzőműködésekben. Összehasonlító neuroanatómiai és neurofiziológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a foto- és kemorecepció, a fajok filogenetikai fejlettségétől függetlenül, részben NOerg transzmisszió által meghatározott folyamat.

Az Oligochaeta gyűrűsférgek viszonylag egyszerű felépítésű idegrendszerének kémiai neuroanatómiáját az utóbbi két évtized kutatásai részben feltárták. Részletes, többszörösen megerősített adatok állnak rendelkezésre számos transzmitter, így a szerotonin, dopamin, oktopamin, GABA, FMRF-amid és P-anyag eloszlási mintázatáról.

Ezzel ellentétben a feltehetően NOerg neuronális struktúrák lényegében ismeretlenek, annak ellenére, hogy az Oligochaeta fajok nemcsak az idegrendszer filogenezisét, hanem annak regenerációját kutató vizsgálatoknak is kedvelt objektumai. Ezért célul tűztük ki

- a Lumbricus terrestris NOerg neuronális struktúráinak azonosítását immun- és enzimhisztokémiai módszerekkel;
- a jelölt struktúrák eloszlási mintázatának és funkcionális anatómiájának feltárását a környéki és központi idegrendszerben.

Az NOerg neuronális struktúrák azonosítása gerinces kísérleti állatokban immun- és enzimhisztokémiai módszerrel (NADPH-diaforáz hisztokémiai) egyaránt megoldható, míg

gerinctelen modell-állatok esetében, néhány kivételtől eltekintve, csak az utóbbi módszer alkalmazható. Az egyszerűsége és viszonylagos olcsósága miatt közkedvelt hisztokémiai módszer alkalmazásával nyert eredmények értékelését azonban jelentős mértékben nehezíti az a tény, hogy annak specifikusságát több tanulmány megkérdőjelezi, vagy egyenesen tagadja. Ezért alapvető feladatnak tartottuk a NADPH-diaforáz hisztokémiai reakció specifitásának részletes vizsgálatát, továbbá a NADPH-d aktivitás szubcelluláris lokalizációjának feltárását.

A NO hatásmechanizmusának alaposabb megismeréséhez neurofiziológiai vizsgálatok elvégzését láttuk szükségesnek. Mivel a *Lumbricus terrestris* központi idegrendszere erre a célra a dúcokat határoló vastag burok, az idegsejtek mérete miatt nem ideális objektum, vizsgálatainkat egy könnyebben kezelhető modell-állaton *Helix pomatia*-n végeztük. Vizsgálatainkat a garatalatti dúc NOerg neuroncsoportjai közelében elhelyezkedő, és saját NADPHd-aktivitást is mutató óriásneuronjait használtuk, annak megállapítására, hogy a felszabaduló nitrogén-monoxid

- milyen hatást gyakorol az óriás idegsejtek ingerlékenységére
- a membrán ingerlékenységének megváltozása milyen fiziológiás változásokkal magyarázható.

II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Enzimhisztokémiai, immuncitokémiai, pályajelölési és elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz földigiliszta (Lumbricus terrestris L, Annelida, Oligochaeta), elektrofiziológiai kísérleteinkhez éti csiga (Helix pomatia L. Mollusca, Gastropoda) ivarérett egyedeit használtuk. állatokat természetes élőhelyükről gyűjtöttük, Az vagy állatkereskedésből vásároltuk és a kísérletek kezdetéig standard laboratóriumi körülmények között tartottuk.

1. Immuncitokémiai vizsgálatok

A vizsgálati anyagokat 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal rögzítettük, majd a szokványos permeábilizálási, blokkolási lépések végrehajtása után a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) különböző szakaszai ellen termeltetett antitestekkel (bNOS 1409-1429, bNOS 251-270, Sigma; bNOS Transduction Laboratories) hajtottuk végre az immunfestéseket. Vizualizálásra ExtrAvidin-peroxidáz komplexet használtunk.

2. NADPH-diaforáz hisztokémia

Az enzimaktivitás kimutatására nitro blue tetrazolium (NBT) vagy 2-[2'benzothiazolyl]-5-styryl-3-[4'-phthalhydrazdyl]-tetrazolium klorid (BSPT) és β-NADPH frissen összeállított keverékét (pH 7,4) használtuk, amelyben a különböző módon fixált, illetve enzimgátlókkal előkezelt mintákat standard körülmények (1-2 óra, 37 °C-on, sötétben) között inkubáltuk.

2.1. A NADPH-d fixálás-érzékenységének vizsgálata

A fixálás optimális időtartamának megállapítására rövid (min. 3 óra) és hosszú (24-48 óra) időtartamú 4%-os paraformaldehid, 2,5%-os glutáraldehid, illetve paraformaldehid és glutáraldehid keverékekben történő rögzítéseket alkalmaztunk.

2.2. Specifikus enzim-gátlók és blokkolók alkalmazása

A NOS-tól független NADPH-d aktivitás kiszűrésére a következő enzimgátlókat, illetve blokkoló vegyületeket használtuk:

Dicumarol: a DT-diaforázok és a NADPH-dehidrogenázok kompetitív inhibitora;

Levamisol: az alkalikus foszfatáz nem kompetitív inhibitora;

Miconazol: citokróm P450 kompetitív inhibitora;

Nátrium-azid: mitokondriális légzési enzimek kompetitív inhibitora;

Piruvát: laktát-dehidrogenáz kompetitív inhibitrora;

Miconazol és nátrium-azid keveréke: a mitokondriális és citokróm P450 enzimek együttes blokkolása;

N-etil-maleimid: a szulfhidril csoportok blokkolása;

N-etil-maleimid és piruvát keveréke: az ún. ismeretlen dehidrogenázok működésének gátlása.

2.3. Szubsztrátspecifitás vizsgálata

A neuronális NADPH-diaforáz szubsztrátspecifitását különböző nukleotid koenzimek (α- és β-NADPH, illetve α- és β-NADH) alkalmazásával tanulmányoztuk.

3. Pályajelölés

A szegmentális idegeken át a perifériára projiciáló neuronok, illetve a primér érzékhámsejtek központba futó rostjainak azonosítására extracelluláris lucifer sárga (Lucifer Yellow [LY], Sigma Kft, Bp.) töltést (negatív áram, 1 Hz, 600nA, 500 msec, 1-1,5 óra) alkalmaztunk.

Az extracelluláris töltés után végrehajtott NADPH-d hisztokémiai reakcióval vizualizáltuk az NOerg neuronális struktúrákat. A kettős jelölésű idegelemeket Nikon Optiphot-2 típusú mikroszkóppal azonosítottuk.

4. Dokumentálás

A fénymikroszkópos vizsgálatokra készített preparátumok jelölt struktúráinak

anatómiai pozícióját totálprepatátumok és az azokból készült sorozatmetszetek vizsgálata alapján határoztuk meg.

5. A NADPH-d aktivitás ultrastruktúrális lokalizációja

A NADPH-d aktivitás sejtszintű lokalizációjának megállapításához BSPT és NADPH keverékében inkubált, majd ozmium-tetraoxiddal rögzített mintákat használtunk. Az ultravékony metszeteket kontrasztosítás nélkül, esetenként uranil-acetát és ólom-citrát kontrasztosítás után vizsgáltuk.

6. Elektrofiziológiai vizsgálatok

A NO fiziológiai hatásait éti csiga garatalatti dúcának óriásneuronjaiban, két elektródás voltage-clamp elvezetésekkel tanulmányoztuk. NO-donorként nátrium nitroprussidot (SNP) és S-nitro-N-acetilpenicillamint (SNAP) használtunk. A kontroll kísérletekben SNAP helyett N-acetilpenicillamint (NAP) alkalmaztunk.

III. EREDMÉNYEK

1. Az immuncitokémiai vizsgálatok eredményei

A rendelkezésre álló NOS-antitestekkel specifikus festődést nem értünk el. Emiatt a feltehetően NO-termelő neuronok illetve idegrostok megfestésére a nitrogén-monoxid szintáz hisztokémiai markereként ismert NADPH-diaforáz reakciót alkalmaztuk.

2. A NADPH-d reakció specifitása

Megállapítottuk, hogy a legkedvezőbb specifikus jel – háttér arány 6-12 órás 4%-os

paraformaldehid fixálással érhető el. A fixáló glutáraldehid tartalma még az alkalmazott legalacsonyabb koncentrációban (0.25% glutáraldehid, 4%-os PFA-ban) is gátolta az enzim működését és az aldehidkeverékben rögzített mintákban formazánleválást nem tapasztaltunk.

Enzimgátlók alkalmazásával bizonyítottuk, hogy PFA-fixálás utáni formazán leválás a neuronális NOS aktivitásának tulajdonítható.

Megállapítottuk, hogy modell-állatunk feltehetően NOerg neuronális struktúrái hisztokémiai körülmények között csak a β -NADPH-t képesek a tetrazólium-színezékek formazánná redukálásához felhasználni. Más redukált nukleotid-koenzimek (α -NADPH, β -NADH és α -NADH) alkalmazásával nem értünk el specifikus festődést, azaz a kimutatott enzimre magas fokú szubsztrát specifitás jellemző.

3. A bőrizomtömlő NADPH-d pozitív struktúrái

Erős NADPH-d aktivitást találtunk а bőrizomtömlő hámjának szabad idegvégződéseiben tapintási és nyomásérzékelő (feltételezett receptorok), а kemoreceptorként ismert ún. penetratív uni- és multiciliáris érzéksejtekben, valamint a fotoreceptorokban (ún. faoszómális primér érzékhámsejtekben). Nem jelölődtek a hámban szétszórtan elhelyezkedő ún. nem penetratív multiciliáris érzéksejtek (mechanoreceptorok).

A penetratív uni- és multiciliáris érzéksejtek az érzékszervekben (szenzilla) csoportosultak, amelyek a prosztómium és az első 3-4 szelvény, a nyereg, valamint az utolsó 4-5 kaudális szelvény kivételével azonos mintázatot mutatva helyezkedtek el a test minden szelvényében.

A sertékkel egy vonalban elhelyezkedő nagyobb méretű érzékszervek övszerű alakzatot formáltak. A szelvények elülső és hátsó részében kisebb méretű, szabálytalan elrendeződésű érzékszerveket találtunk, amelyek különösen nagy számban fordultak elő a nefridiális pórusok körül. Ez a jellegzetes mintázat nem alakult ki a nyereg területén, ahol

kevés érzéksejt jelölődött, illetve jelentősen módosult a prosztómiumban és az utolsó kaudális szelvényekben.

A prosztómiumban és az utolsó 5 testszelvényben sűrűn elhelyezkedő érzékszervek között nagy számban találtunk jelölt fotoreceptorokat.

4. Az előbél és a sztomatogasztrikus ganglionok jelölt struktúrái

Erős NADPH-diaforáz aktivitást találtunk a szájüreg dorzális falának érzékszerveiben elhelyezkedő uni- és multiciliáris primér érzékhámsejtekben, továbbá a sztomatogasztrikus ganglionokban. Az első és hatodik pár sztomatogasztikus ganglion 13-16 db, a többi ganglion 6-9 db jelölt sejtet tartalmazott.

5. NADPH-d pozitív szenzoros rostok a központi idegrendszerben

A testszelvények NADPH-diaforáz pozitív primér érzékhámsejtjei centrális nyúlványainak lefutását a hasdúclánc szegmentális idegeiben és a dúcokban is követtük. Jelölt rostokat mind az öt pár szenzoros axonköteg (ún. dorzális- intermedio-mediális, intermedio-laterális, ventromediális és ventrolaterális hosszanti szenzoros axonköteg) tartalmazott, amelyek közül a ventromediális és a ventrális óriásaxonok körül elhelyezkedő ventrolaterális köteg mutatta a legerősebb festődést.

Extracelluláris töltés alkalmazásával kimutattuk, hogy a dúcokba belépő szenzoros rostok T vagy Y alakban elágazva, fokozatosan elvékonyodó leszálló (descendens) és felszálló (ascendens) ágakat képeznek. Az előbbiek egy, az utóbbiak három szelvényen át voltak követhetők. A szenzoros axonkötegek szerveződése arra utal, hogy a *Lumbricus terrestris* idegrendszerében az egy szelvényből befutó érzőimpulzusok legalább 4 dúc idegsejtjeinek működését befolyásolva váltják ki a test összerendezett mozgását biztosító motoros válaszreakciókat.

A garatalatti dúcban és az első négy hasdúcban a már ismertetett öt pár szenzoros axonkötegen kívül két pár, eddig nem ismert, dorzomediális pozíciójú szenzoros rostköteget írtunk le.

Leírtuk az agydúc ún. kommisszúrális rétegének NADPH-diaforáz pozitív rostkötegeit. Megállapítottuk, hogy a prosztómium és a szájüreg dorzális falában elhelyezkedő primér érzékhámsejtek centrális nyúlványai, illetve a hasdúclánc szenzoros axonkötegei a kommisszúrális réteg különböző területein vetülnek. Eredményeink megerősítik azt a korábbi feltételezést, hogy az agydúc kiemelkedő szerepet játszik az érzőműködések integrációjában, illetve az érzőimpulzusok által generált motoros válaszreakciók szervezésében.

Az előzőekben ismertetett szenzoros rostkötegeken kívül azonosítottunk két pár NADPH-diaforáz pozitív rostköteget, amelyek nem lépnek be az agydúc kommisszúrális rétegébe. A prosztómiális ideg mediális részén futó rostköteg lefutását a garatalatti dúcig, míg a garatkonnektívum laterális oldalán futó rostokét a prosztómiális idegig követtük, de a rostok pontos végződését nem sikerült megállapítanunk.

5. A központi idegrendszer jelölt sejtjei

Különböző intenzitással festődő NADPH-diaforáz pozitív neuronokat nagy számban találtunk a központi idegrendszerben, amelyek az ivari ganglionok, a garatalatti dúc és az agydúc kivételével azonos mintázatot mutattak minden ganglionban.

A legerősebben festődő, ventromediális pozíciójú idegsejteket tapintóreceptorként (ún. T-sejtek), míg a 2-3. szegmentális ideg mellett elhelyezkedő neuronok egy részét nyomási receptorként (ún. P-sejtek) azonosítottuk.

Leírtunk egy eddig nem ismert, nagy valószínűséggel centrális érzősejtként funkcionáló neuront, amely közvetlenül az első szegmentális ideg mögött helyezkedik el, nyúlványai pedig a ventrolaterális szenzoros axonkötegben futnak.

A ganglionok ventromediális, laterális és dorzolaterális részén elhelyezkedő kisméretű NADPH-d pozitív sejteket motoneuronként, míg a perifériás nyúlvánnyal nem rendelkező jelölt sejteket NOerg interneuronként azonosítottuk.

A garatalatti dúc és az ivari ganglionok nagyobb sejtszáma az első esetben részben a dúcösszeolvadás következménye lehet, illetve az utóbbi struktúra jelölt sejtjeinek egy része az ivarszervek beidegzésében játszhat szerepet.

Az agydúc nagy számban tartalmazott NADPH-diaforáz pozitív sejteket, amelyeket elhelyezkedésük alapján négy csoportba soroltuk. Az első csoportba tartozó sejtek mediálisan helyezkednek el, az agydúc poszterio- és anteriomediális felszínén. A második csoport sejtjei laterálisan, a harmadik csoporté a garatkonnektívum határán, míg a negyedik csoportba tartozók elszórtan helyezkednek el az agydúc anteriomediális felszínén.

6. NADPH-d aktivitás celluláris lokalizációja

Kimutattuk, hogy a jelölt sejtekben a NADPH-diaforáz aktivitás döntően a citoplazmában lokalizálódik, bár találtunk membránhoz kötött (magmembrán külső lemeze, durva felszínű endoplazmás retikulum) frakciókat is.

A legjellegzetesebb membránkötött enzimaktivitás a primér érzékhámsejtek axonjaiban fordult elő, ahol az a szubmembrán ciszternák membránjához kapcsolódott. Ez a jellegzetes előfordulás felveti az NO fokális felszabadulásának lehetőségét, ami az érző működések finom modulálását biztosíthatja az érzőrostokban.

7. A NO hatása az idegsejtek aktivitására

Két elektródás voltage-clamp kísérletekkel kimutattuk, hogy az NO-donorok csökkentik az akciós potenciálok látenciáját és növelik a tüzelési frekvenciát, tehát a

membrán ingerelhetőségét fokozzák.

Az SNP a beadást követő öt perc után érte el a maximumát, kb. 25%-val csökkentve a kimenő Ca^{2+} - függő K⁺ áramokat. A változást áram/feszültség görbén ábrázolva megállapítottuk, hogy a kimenő Ca^{2+} függő K⁺ áramokra jellemző görbe jellegzetes N-alakja megszűnt. Hasonló eredményt kaptunk SNAP beadását követően, míg a NAP nem befolyásolta a membrán elektromos tulajdonságait.

 Ca^{2+} mentes oldatban az SNP-nek nem volt mérhető szignifikáns hatása. Előzetes vizsgálatok kimutatták, hogy a <u>NOS-inhibítor</u> metilénkék nem blokkolja teljes egészében a kimenő áramokat. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a nitrogén-monoxid két különböző útvonalon, egy direkt (protein foszforiláción) és a egy indirekt (cGMP kaszkád rendszeren) keresztül fejtheti ki a hatását a Ca²⁺ függő K⁺ áramokra.

IV. Publikációk

A: A disszertáció alapjául szolgáló tanulmányok

- **Zsombok, A.**, Molnár, L. (1998): Neuron clusters of segmental nerves of a ventral nerve cord ganglion in *Lumbricus terrestris*. Neurobiol., 6, 455-458.
- **Zsombok, A.**, Schrofner, S., Hermann, A., Kerschbaum, H.H. (2000): Nitric oxide increases excitability by depressing a calcium activated potassium current in snail neurons. Neurosci. Lett., 295, 85-88.
- **Zsombok, A.**, Molnár, L. (2001): Pattern of NADPH-diaphorase containing structures in the subintestinal ganglia of *Lumbricus terrestris*. Neurobiol., 9, 67-69.

B: Előkészületben

- **Zsombok, A.,** Schrofner, S., Hermann, A. and Kerschbaum, H.H.: cGMP increases a high voltage- activated Ca2+ current in identified snail neurons.
- **Zsombok, A.**, Schrofner, S., Ott, S.R. and Kerschbaum, H.H.: Nitric oxide stimulates putative NO producing interneurons in the snail, *Helix pomatia*.
- **Zsombok, A.**, Solt, Zs., Pollák, E. and Molnár, L.: NADPH-diaphorase positive sensory axon bundles and putative sensory cells in the ventral nerve cord ganglia of earthworms.

C: A disszertáció alapjául szolgáló konferencia szereplések

- **Zsombok, A.**, Solt, Zs., Molnár, L. (1998): Identified neurons in some subintestinal ganglia of *Lumbricus terrestris* (Annelida, Oligochaeta) with lucifer yellow retrograde filling. 5th Ann. Meet. Hung. Neurosci. Soc., Debrecen, Abstract: Neurobiol., 6, 269.
- **Zsombok, A.**, Solt, Zs., Molnár, L. (1998): Identification of neuron clusters of segmental ganglia with lucifer yellow filling in *Lumbricus terrestris* (Annelida, Oligochaeta). 26th Neurobiol. Conf., Göttingen, Abstract: Vol. II., 550.

- **Zsombok, A.**, Solt, Zs., Molnár, L. (1999): Putative NOS expressing neurons in lumbricid oligochaetes: NADPH-diaphorase histochemistry. 27th Neurobiol. Conf., Göttingen, Abstract: Vol. II., 613.
- Zsombok, A., Pollák, E. Molnár, L. (2000): Histochemical characterisation of sensory longitudinal axon bundles in the central nervous system of *Lumbricus terrestris*. IBRO-Hung. Neurosci. Soc., Budapest, Abstract: Neurobiol. 8, 420.
- **Zsombok, A.**, Schrofner, S., Hermann, A., Kerschbaum, H.H. (2001): Nitric oxide modulates excitability in identified snail neuron. 28th Neurobiol. Conf., Göttingen, Abstract: Vol II., 779.
- Molnár, L., **Zsombok, A.**, Solt, Zs., Pollák, E. (2001): Functional anatomy of the NADPHdiaphorase positive neural structures in the central nervous system of lumbricid earthworms. 28th Neurobiol. Conf., Göttingen, Abstract: Vol II., 477.
- Solt, Zs., **Zsombok, A.**, Pollák, E., Molnár, L. (2001): Transmitter specific sensory pathway of lumbricid earthworms: a histochemical study with functional correlations. 28th Neurobiol. Conf., Göttingen, Abstract: Vol II., 478.
- **Zsombok, A**., Schrofner, S., Hermann, A., Kerschbaum, H.H. (2001): Nitric oxide modulates phosphorilation of L-type Ca²⁺-channels in identified snail neurons. 7th Meet. Aus. Neurosci. Assoc., Leibnitz, (Abstract).

D: Egyéb tanulmányok

Zsombok, A., Molnár, L., Fischer, E. (1997): Neurotoxicity of paraquat and triphenyltin in the earthworm, *Eisenia fetida* Sav. A histo- and cytopathological study. Acta Biol. Hung., 48, 485-495.

E: Egyéb konferencia szereplések

- **Zsombok, A.**, Molnár, L., Fischer, E. (1997): Morphological investigation of the neurotoxic effects of paraquat in some ganglia of ventral nerve cord of *Eisenia fetida*. 4th Ann. Meet. Hung. Neurosci. Soc., Gödöllő, Abstract: Neurobiol., 5, 231.
- Molnár, L., Zsombok, A., Hunyadi, Zs. (1997): Histopathology of triphenyltin toxication in the ventral nerve cord ganglia of *Eisenia fetida*. 25th Neurobiol. Conf., Göttingen, Abstract: Vol. II., 847.
- Molnár, L., Hunyadi, Zs., Pollák, E., Zsombok, A. (1997): Difference in the neurotoxicity of paraquat in an annelid and a crustacean species. 5th Int. Conf. Invertebrate Neurochem. Neurophysiol., Eilat (Israel), Abstract: 129.
- Molnár, L., Zsombok, A., Pollák, E. (2000): Fine-fibred polysegmental GABAimmunoreactive interneurons in the central nervous system of *Lumbricus terrestris*. IBRO-Hung. Neurosci. Soc., Budapest, Abstract: Neurobiol. 8(3-4), 367-368.
- Pintér, E., Thán, M., Zsombok, A., Kéri, Gy., Szolcsányi, J. (2001): Antiinflammatory effects of sciatic nerve stimulation and heptapeptide somatostatin analoge TT-232.
 "Peptide receptors from gene to therapy". 14th Int. Symp., Montreal, P97.
- Pintér, E., Pórszász, R., Zsombok, A., Szolcsányi, J. (2002): Anti-inflammatory effect of a heptapeptide somatostatin analogue TT-232 in the rat, mouse and rabbit skin. IBRO, Debrecen, P 71.