

OLIGOCHAETA FAJOK IDEGRENSZERÉNEK IMMUNHISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Dr. Lubics Andrea

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet**

Pécs, 2002

Témavezető:

Dr. Lengvári István egyetemi docens

TARTALOM

I. Bevezetés	3
II. Módszerek	15
II/1. Kísérleti állatok	15
II/2. Kísérleti módszerek	16
II/2.1. Immunhisztológia	16
II/2.2. Számítógépes feldolgozás	18
II/2.3. Az idegrendszer regenerációjának vizsgálata	20
III. Eredmények	21
III/1. Központi idegrendszer	22
III/1.1. Cerebralis ganglion	22
III/1.2. Subesophagealis ganglion	25
III/1.3. Ventralis ganglionok	28
III/2. Perifériás idegrendszer	31
III/2.1. Szegmentális idegek	31
III/2.2. Bőrizomtömlő	31
III/2.3. Bélidegrendszer	32
III/3. A cerebralis ganglion regenerációja	34
IV. Megbeszélés	36
IV/1. Az idegrendszer neurokémiai feltérképezése	36
IV/2. A cerebralis ganglion regenerációja	48
V. Irodalomjegyzék	50
VI. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	59
VII. Előadáskivonatok, poszterek	60
VIII. Egyéb saját közlemények	61
IX. Köszönetnyilvánítás	62
X. Dokumentáció	63

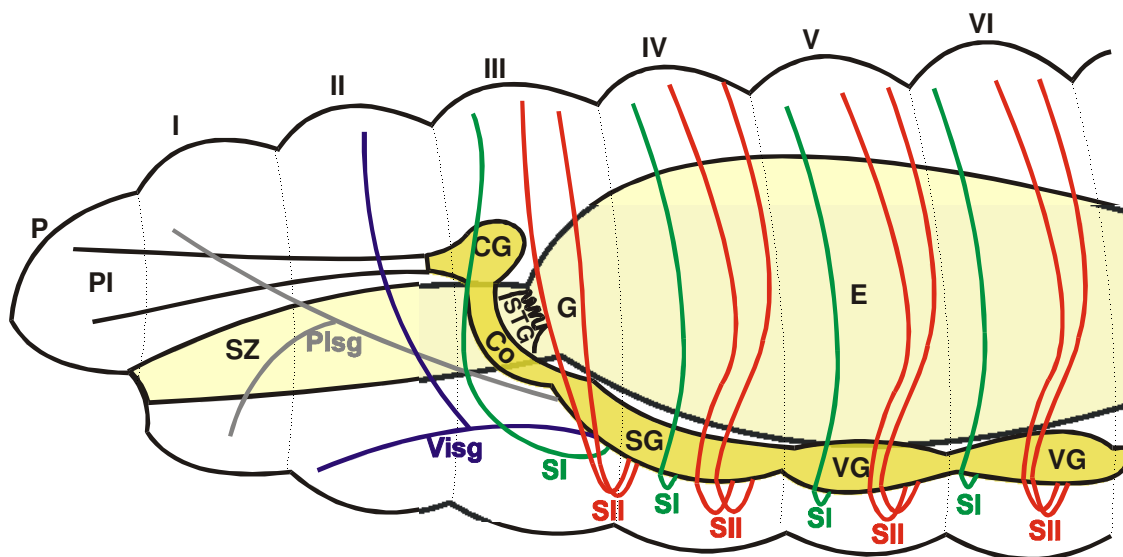
I. BEVEZETÉS

Alacsonyabbrendű állatok idegrendszerének vizsgálata már a XIX. század végén közkedvelt volt. A klasszikus neurohisztológia erre az időszakra tehető hőskorában számos kutató tanulmányozta a relatíve egyszerű felépítésű gerinctelen állatokat, különösen a gyűrűsférgék törzséhez tartozó fajokat (Friedländer, 1888; Lenhossék, 1892; Retzius, 1892; Krawany, 1905; Haller, 1889; 1910). Ezen klasszikus leírásokból vált ismertté a földigiliszta idegrendszerének fénymikroszkópos szerkezete. A gyűrűsférgék regenerációs képességét is számos, ma már klasszikusnak tekinthető vizsgálatban tanulmányozták (Iwanow, 1903; Kreckler, 1923; Bailey, 1930). Jól ismert ugyanis az a tény, hogy ez az állattörzs a test elülső vagy hátsó szegmentumainak elvesztésekor az amputáció helyétől és mértékétől függően igen nagyfokú regenerációra képes, beleértve az idegrendszert is. Ezek a korábbi vizsgálatok azonban a regeneráció tényszerű leírásán kívül nem foglalkoztak érdemben az idegrendszer regenerációjával annak ellenére, hogy a közlemények jelentős része komoly szerepet tulajdonít ennek a szervrendszernek a regeneráció folyamatában (Aros és Vigh, 1962; Herlant-Meewis, 1964; Koritsánszky, 1974).

A gyűrűsférgék több szempontból is rendkívül alkalmasak alapvető neurohisztológiai vizsgálatokra, valamint az idegrendszer regenerációjának tanulmányozására. Egyrészt a gyűrűsférgékben jelenik meg a filogenezis során először a mesoderma, mint önálló csíralemez, és ezzel összefüggésben a szelvényezettség, ami az idegrendszer szegmentálódását is kialakítja. Másrészt már megvalósul az idegrendszer egy elég jelentős centralizációja. További előny a vizsgálatok szempontjából, hogy az idegelemek száma alacsony, fajtól függően az agydúcban megközelítően 2000, a szegmentális dúcokban pedig 900-1500 idegsejt található szelvényenként, ami lehetővé teszi a dúcok viszonylag komplett leírását (Ogawa, 1928; 1930). Több előnnyel is jár, hogy a mintegy 100-150 testszelvény, és így a ganglionok felépítése is néhány kivételtől eltekintve egyforma. Egyrészt egy átlagos szelvény vizsgálata is elegendő a hasdúclánc neuronjainak, azok kapcsolatainak majdnem teljes jellemzéséhez, másrészt összehasonlítható egy átlagostól eltérő szelvénnel, ami további hasznos információkkal szolgálhat. Különbözik a többitől például az ivarszerveket, ill. az ivarzás idején átmenetileg

kifejlődő páros szervet (clitellum vagy nyereg) tartalmazó szelvények felépítése. A belső szervek közül a bélcsatorna tagoltságot mutat, ami szintén módosíthatja az idegdúcok felépítését.

Az említett klasszikus leírások alapján a földigiliszta idegrendszere a következőképpen vázolható (1. ábra).



1. ábra: A földigiliszta idegrendszerének felépítése sémásan

I-VI: 1-6. szelvények; **P:** prostomium; **SZ:** szájüreg. **G:** garat; **E:** előbél; **PI:** prostomialis idegek; **Plsg:** a subesophagealis ganglionból eredő prostomialis ideg az 1. szelvényhez; **Visg:** a subesophagealis ganglionból eredő ventralis ideg a 2. szelvényhez; **SI:** első szegmentális ideg; **SII:** hátsó szegmentális ideg (páros ideg); **CG:** cerebralis ganglion; **Co:** garatconnectivum; **SG:** subesophagealis ganglion; **VG:** ventralis ganglion.

Az idegrendszer központi részét képezi az agy (suprpharyngealis vagy cerebralis ganglion), a hasdúcclánc (garatalatti dúc és ventralis dúcok), és a kettőt összekötő garatgyűrűk (garatconnectivumok vagy circumpharyngealis connectivumok).

A cerebralis ganglion a 3-4. testszelvényben dorsalisán, a szájüreg, illetve a garat felett helyezkedik el. Egy középvonali bevágás által két, bilateralisan szimmetrikus félre osztott. Elülső széléből mindkét oldalon 1-1 idegnyaláb ered (prostomialis idegek), melyek az állat feji részének beidegzését végzik.

A hasdúcclánc ventralisan, a bőrízomtömlő és a bélcsatorna között a középvonalban húzódik az 5. szelvénytől a test egész hosszában. Minden szegmentumban az idegsejtek tömörülése dúcszerű megvastagodást hoz létre (ventralis ganglion). Az eredetileg kötélhágcsószerűen elhelyezkedő dúcok, ill. az

azokat egymással összekötő connectivumok a földigilisztában összeolvadtak, és csak a rájuk merőleges kötőszövetes szeptumok választják el őket egymástól. Minden egyes dúcból általában 3-3 oldalideg lép ki (szegmentális idegek), melyek közül a két caudalis helyzetű egymás mellett található, ezért ezeket páros idegeknek is hívják, míg a rostralis helyzetű idegek magánosak.

A garatalatti dúcot (subpharyngealis vagy subesophagealis ganglion) az első 2-3, legjobban fejlett ganglion összeolvadása alkotja. Funkcionális szempontból két részre osztható: rostralis része szegmentális funkciói mellett ágakat ad az agy, a prostomium, a stomodeum (garatidegeken keresztül) felé, így elsősorban az aggyal kommunikál. Caudalis része a megfelelő szegmentum érző és motoros beidegzését végzi (Nevmyvaka, 1967; Spörhase-Eichmann és mts., 1987b).

A garatconnectivumok masszív idegrostkötegek, melyek az agy oldalsó-elülső részén erednek, majd a garatot kétoldalról körülfogva lefelé és kicsit hátrafelé haladva lépnek be kétoldalról a subesophagealis dúcba. A circumpharyngealis connectivumokhoz mindkét oldalon hat kis dúc kapcsolódik, ezek az ún. stomatogastricus ganglionok, melyeket idegek kötnek egyik oldalukon a garatgyűrűhöz, másik oldalukon az emésztőrendszerhez, ahol kialakul a bélfonat. A 6 pár dúc, az ezeket a connectivumokhoz kötő idegek, valamint a bélcsatornához futó, és a bélfonadék kialakításában résztvevő idegek együttesen alkotják a bélidegrendszert, ami már a perifériás idegrendszer része. A stomatogastricus rendszer a gerincesek vegetatív idegrendszerének felel meg (Hartenstein, 1997), mely a bélperisztaltika, a bélcsatorna enzimszekréciójának, továbbá víz- és iontranszportjának szabályozásában vesz részt.

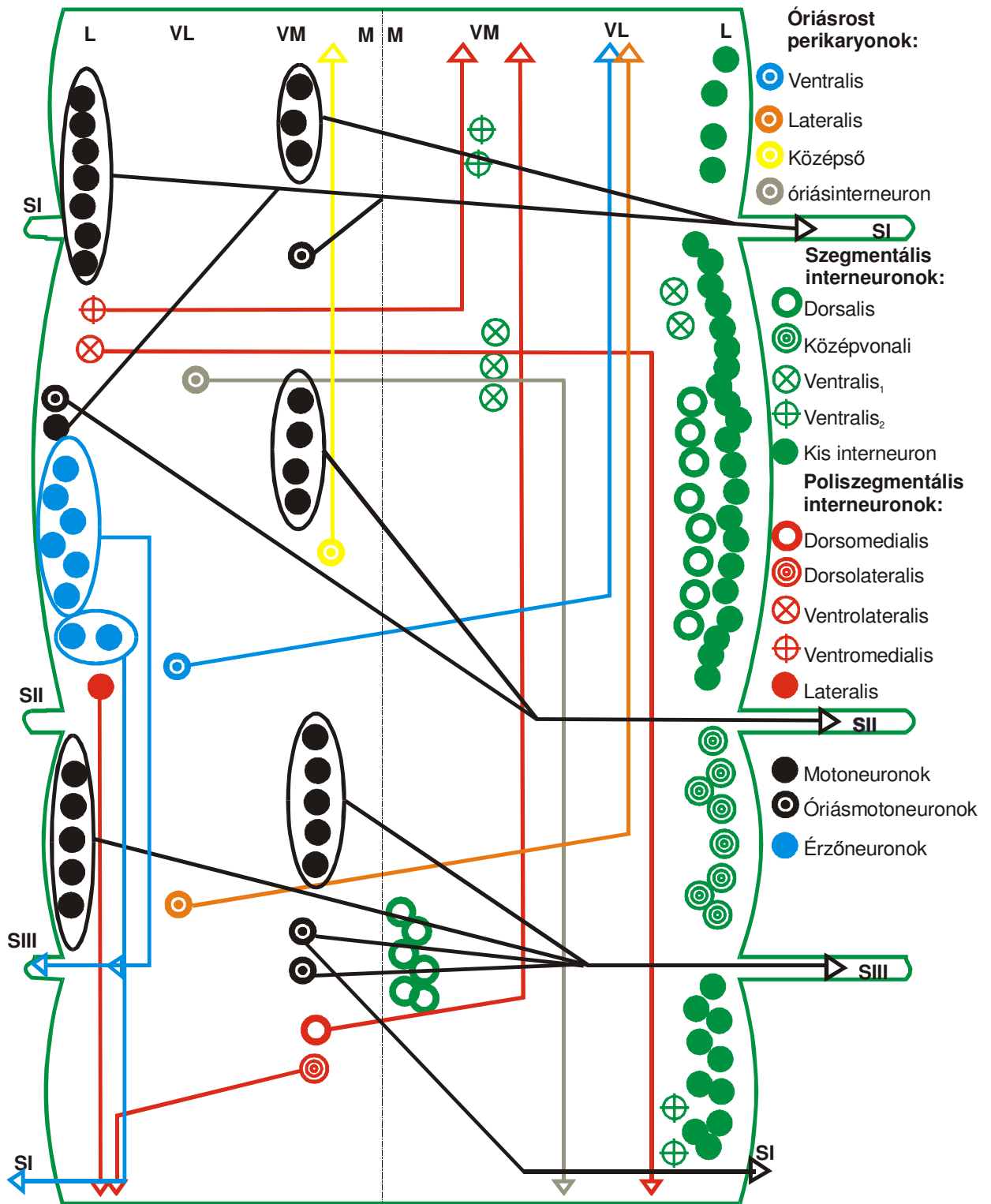
Minden dúcot hármastok határol. A külső tok celomasejtekből áll, a belső kötőszövetes. A középső tokot ún. helikális simaizom alkotja, melynek a hasdúclánrendszer összehajtogatásában van szerepe, ami az állat megrövidülésekor fontos. A tok alatt található a kéreg, ami az agyban dorsalis, a szegmentális dúcokban ventralis lokalizációjú. Itt helyezkednek el a többnyire monopoláris idegsejtek perikaryonjai, valamint glia- és differenciálatlan sejtek.

A cerebrális ganglionban a neuronok perikaryonjainak nagy része a dorsalis sejtköpenyben található, ahol medialis, dorsomedialis, dorsolateralis és laterális sejtcsoportok különíthetők el. Az agy centrális és ventralis részén is vannak idegsejtek, ezek azonban nem rendeződnek meghatározott csoportokba. Az agy középső részét a neuropil tölti ki, melynek elülső, középső, és hátsó részét

különböztetjük meg. A neuronok négyfélék (Bullock és Horridge, 1965): az Ogawa féle jellemző sejtek (1) száma a legnagyobb, melyek a dorsalis sejtkepenyben rétegesen helyezkednek el, többségük a lateralis sejtcsoportban. Kisméretű, általában multipoláris sejtek, melyek rövid, varikózus nyúlványaikat a centrális neuropilbe küldik. Az agydúcot a garatalatti dúccal összekötő interneuronoknak tekinthetők, mivel rajtuk végződik a circumpharyngealis connectivumból felszálló rostok nagy része. A motoneuronok (2) szintén a dorsalis sejtzónában találhatóak. Méretük változó, nyúlványuk a prostomialis idegeket célozza meg. A kis (3) és nagy (4) interneuronok általában monopolárisak, axonjuk ipsi- vagy contralateralisan a centrális neuropilbe (lokális interneuron), vagy a connectivumokba (projekciós interneuron) projiciál. Az interneuronok különböző lokalizációkban fordulnak elő. A dorsalis sejtcsoportok neuronjainak nyúlványai általában leszállnak a connectivumba, míg a ventralis és centrális sejtek axonjai a dorsomedialis csoport neuronjaihoz futnak.

A hasdúclánc finom szerkezete Günther alapján (Günther, 1971) a következőképpen írható le (2.a. és 2.b. ábra):

A perikaryonok (2.a. ábra) a ganglionokban ventralisan és lateralisán helyezkednek el, koszorúszerűen körbefogva a dúc centrális, idegrostokkal átszőtt részét. Interneuronok, motoneuronok, valamint mechanoceptív szenzoros neuronok különböztethetők meg (1. táblázat).



2.a. ábra: A neuronok és az idegrostok elhelyezkedése a hasdúcláncban (Günther nyomán).

Bal oldalon a meghatározott számú neuronoknak megfelelő pontok láthatók, számuk azonos a tényleges sejtszámmal. Jobb oldalon a változó számú neuronokat jelző pontok láthatók, számuk a tényleges sejtszám kb.10%-a. **SI-III**: szegmentális idegek.

Sejttípus	méret (µm)	alak	lokalizáció	szám/dúc	X	axon lefutása
óriásrostok perikaryonjai						
ventralis	20-25	monopoláris, körte alakú	SII szintjén VL	1+1	X	rostralisán, ventralis óriásrost
középső	60	monopoláris, kerek	SI-II között VM	1	-	rostralisán, középső óriásrost
lateralis	50-70	kerek-ovális, 2 dendrit	SIII szintjén VL	1+1	X	rostralisán, lateralis óriásrost
óriásinterneuron			SI-II között VL	1+1	X	caudalisán
Polisegmentális interneuronok						
Dorsomedialis (DM)	30	monopoláris, körte alakú	caudalisán VM	1+1	X	rostralisán, DM rostköteg
Dorsolateralis (DL)	40	+ dendritek	caudalisán VM	1+1	-	caudalisán, DL rostköteg
Ventromedialis (VM)	30-40		SI-II között, L	1+1	X	rostralisán, VM rostköteg
Ventrolateralis (VL)	30-40		SI-II között, L	1+1	X	caudalisán, VL rostköteg
Lateralis (L)	25		SII szintjén, L	1+1	-	caudalisán, L rostköteg
Monosegmentális interneuronok						
kis interneuronok	15-25	monopoláris, körte alakú				rostralisán vagy caudalisán
D nagy szegmentális interneuronok	20-30		SII-III előtt és mögött, főleg L	400-1600	-	neuropil
V1. nagy szegmentális interneuronok	20-30		SI-II között VM, L	50	X / -	ventralis neuropil
V2. nagy szegmentális interneuronok	25-30		rostralisán:VM caudalisán:L	4+4	X	ventralis neuropil
Kp. nagy szegmentális interneuronok	20-30		SI-III között L	80	X	kpvonali rostköteg
motoneuronok						
rostralis csoport	30	monopoláris, körte alakú			X	dorsalis neuropil
középső csoport			SI szintjén, L (7), VM (3)	10+10		SI
caudalis csoport			SI-II között VM (4), L (1)	5+5		SI és SII
óriásmotoneuron 1.			SII-III között VM (5), L (5)	10+10		SIII
óriásmotoneuron 2.			SI szintjén VM SI-II között L SIII szintjén VM	3+3	X	SI SII SIII
szensoros neuronok			SIII szintjén VM SI-II között L	1+1	X	SIII + SI
1.	35	kerek-ovális		6+6	-	ventralis neuropil
2.	45	bi-, tripoláris		2+2	-	SIII, következő SI

1. táblázat: A hasdúccláncban előforduló neuronok jellemzése (Günther szerint). SI-III: szegmentális idegek; D: dorsalis, Kp: középvonali; L: lateralis; V: ventralis; VM: ventromedialis; VL: ventrolateralis; X: kereszteződő rostok.

Az interneuronok közé tartoznak egyrészt az óriásaxonok perikaryonjai, melyekből összesen 7 található egy dúcon belül. Az ún. poliszegmentális interneuronok nevüknek megfelelően több szegmentumot hidalnak át axonjaik által, melyek az ún. elsődleges rostkötegeket alkotják. Nevük a rostkötegek lokalizációjának felelnek meg, így dorsomedialis, dorsolateralis, ventromedialis, ventrolateralis, valamint lateralis poliszegmentális interneuronokat különböztethetünk meg, melyek mindegyikéből 1-1 pár fordul elő minden ganglionban. Az első, ill. utolsó 10-15 szelvényben a poliszegmentális interneuronok egy része általában hiányzik, a garatalatti dúcban pedig egyik sincs jelen. A monoszegmentális interneuronok egy vagy két dúcon belül helyezkednek el, axonjaik rövid lefutást követően elvékonyodnak, majd a dúcfelek centrális részét alkotó neuropilben vesznek el. A sejteket méretük és morfológiai tulajdonságaik alapján két csoportra oszthatjuk. Az ún. kis interneuronok a hasi dúcok idegsejtjeinek legnagyobb százalékát teszik ki, számuk 400-1600 között változik egy dúcon belül. 15-25 µm nagyságú, monopoláris, körte alakú sejtek, melyek a páros ideg előtt és mögött, főleg lateralisán helyezkednek el. Axonjaik vékonyak, kereszteződés nélkül haladnak a neuropil felé. A nagy szegmentális interneuronok mérete 20-30 µm, plazmájuk vakuolizált. Egy 140 sejtből álló neuroncsoport a dorsalis neuropilbe projiciál (dorsalis nagy szegmentális interneuronok), a ventralis neuropilbe pedig egy 50 sejttes (ventralis₁ nagy szegmentális interneuronok), ill. egy másik, 4+4 idegsejtből álló csoport (ventralis₂ nagy szegmentális interneuronok) nyúlványai követhetők. Egy 80 sejtből álló neuroncsoport (középső nagy szegmentális interneuronok) axonjai pedig a contralateralis középvonali rostköteget alkotják.

A motoneuronok kb. 30 µm nagyságú, körte alakú, monopoláris idegsejtek, melyek nyúlványai a dorsalis neuropilt átszelve minden esetben kereszteződnek, és valamelyik oldalidegen keresztül lépnek ki a dúcból. Egy ganglionban összesen 50 motoneuron található, melyek három csoportba rendeződnek a dúc rostralis, középső, valamint caudalis részén. Mindegyik sejtcsoportra jellemző, hogy a perikaryonok egy része ventromedialis, más részük lateralis lokalizációjú. A rostralis sejtcsoport az első oldalideg magasságában fekszik, a dúc mindkét oldalán 10-10 neuronból áll (lateralisan 7-7, ventromedialisán 3-3), melyek axonjai az első oldalidegen keresztül lépnek ki a perifériára. A középső csoporthoz 4 ventromedialis és 1 lateralis neuron tartozik, melyek axonjai az első vagy második szegmentális idegen át hagyják el a dúcot. A páros ideg szintjében található caudalis

motoneuronok axonjai mindig a harmadik szegmentális ideget célozzák meg. Számuk 10-10 mindkét oldalon, a sejtek fele lateralisán, másik fele ventromedialisán helyezkedik el. Speciális motoneuronok az ún. óriásmotoneuronok, melyek nevüknek megfelelően az óriásaxonokkal szinaptizálnak, és ílymódon az állat menekülési reakciójának kialakulásában játszanak szerepet. Az 1. típusú óriásmotoneuronokhoz 3-3 sejt tartozik, melyek a középső óriásrost valamelyik kollaterálisával szinaptizálnak. A neuronok a dúc különböző magasságában ülnek, axonjaik a perikaryon helyzetének megfelelően az első, második, vagy harmadik oldalidegen át hagyják el a gangliont. A laterális óriásrostokkal szinaptizáló 2. típusú óriásmotoneuronból minden dúcfelelben 1 található a dúcok hátsó részén, ventromedialis lokalizációban. Ezen idegsejtek axonjai kettéválva az adott dúc harmadik, ill. a következő dúc első oldalidegén keresztül jutnak a perifériára.

Az említett neurontípusokon kívül néhány olyan idegsejt is előfordul a dúcokban, melyekről korábban azt gondolták, hogy motoneuronok, mivel axonjaik elhagyják a dúcot, később azonban kiderült, hogy mechanoreceptorokból ingerületet szállító szenzoros neuronokról van szó (Nicholls és Baylor, 1968). Az ide tartozó perikaryonok többsége (12 sejt/dúc) kisebb (35 μm), kerek vagy ovális alakú, más részük (4/dúc) valamivel nagyobb (45 μm), bi-, vagy tripolaris. Az összes sejtre jellemző, hogy a dúcok középső részén lateralisán ülnek, az axonok pedig mindig a ventralis neuropilen keresztül futnak az azonos oldali első vagy harmadik szegmentális idegek felé.

Az idegsejtek száma testtájtól függően gangliononként változik. Kb. a 10-től a 60. szelvényig fokozatosan csökken 1500-ról 900-ra, majd a 140. szelvényig stagnál, majd újra emelkedik kb. 1000-ig. Kivételt képez a clitellum területe (32-37. szelvények), ahol a sejtszám kiugrik.

Az idegrostok a szegmentális dúcok centrális és dorsalis részét foglalják el (2.b. ábra). Itt található a garatalatti dúc caudalis részétől az egész hasdúcáncon végighúzó, már kis nagyítással is szembeűnő óriásrostokat. Egy dúcban egy pár ventralis és 3 dorsalis óriásrostot különíthetünk el. A dorsalisak közül az egyik a középvonalban (középső óriásaxon), kettő pedig annak két oldalán (lateralis óriásaxonok) helyezkedik el. Mindegyik óriásrost szegmentális eredetű, dúcanként egyetlen interneuron származéka. Az óriásaxonok közé sorolható továbbá az ún. óriásinterneuron, melynek nyúlványa a ganglion mindkét felében középen fut. Az óriásrostok működése és vezetési iránya eltérő. A dorsalisak az ún.

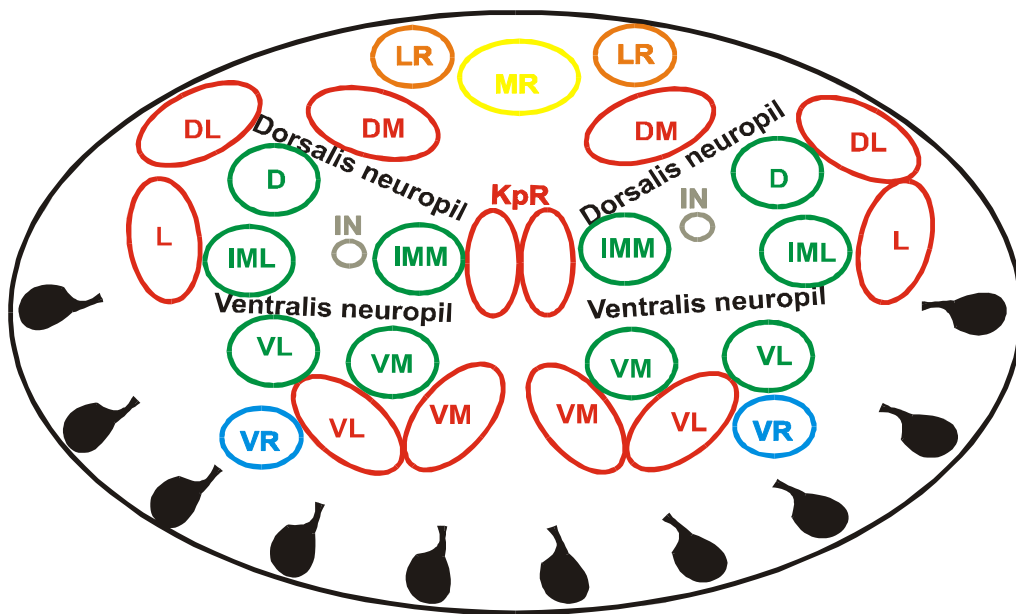
óriásmotoneuronokkal állnak kapcsolatban, melyek a bőrizomtömlő hosszanti izomrétegének kontrahálásával az állat különböző külső ingerekre adott menekülési reakcióját váltják ki. A középső óriásaxon a test elülső részét ingerelve kerül ingerületbe, és az ingerületet caudalis irányba vezeti, míg a lateralis óriásaxonok a test hátsó felének stimulálásával ingerelhetők, és az ingerületet rostralis irányba vezetik. Az óriásaxonokban az ingerület 15-45 m/sec sebességgel terjed. A ventralis óriásrostok kollaterálisakon keresztül a ventrolateralis érzőrostkötegekkel állnak kapcsolatban, ami szenzoros szerepüket valószínűsíti.

A dúcok centrális részét kitevő idegrostok elhelyezkedése meghatározott rétegződést mutat. Legkívül található a poliszegmentális interneuronok nyúlványai által kialakított, hosszanti lefutású, nagyobb átmérőjű axonok kötegeit, melyek akár 30 szegmentumon át is követhetők. Ezek a már említett elsődleges rostkötegek, bennük az ingerületvezetési sebesség 1-1,5 m/sec is lehet. Dorsalis és ventralis kötegekbe való rendeződésük megfelel a fel- és leszálló pályáknak. A dúcok középvonala mellett kétoldalt húzódnak a középvonali rostkötegek, melyek szintén longitudináisan futnak, miközben kevés kollaterálist adnak le. Ezen rostkötegek által körülvéve, centrálisan található egyrészt az érzőpályákat, másrészt az ún. neuropilt. Az ézőpályákat az epidermis primer érzékhámsejtjeinek nyúlványai hozzák létre, melyek a dúcokba a szegmentális idegeken belépve T vagy Y alakban elágazódnak, majd ipsilateráisan előre vagy hátrafelé futnak, fel- ill. leszálló pályákat kialakítva. Mindkét oldalon 5-5 ézőpálya található, úm. dorsalis, ventromedialis, ventrolateralis, ill. az utóbbi kettő között elhelyezkedő intermediomedialis és intermediolateralis érzőrostkötegek. A test feji, ill. caudalis végén sokkal több ézőrost lép a hasdúcláncba, mint a középső szegmentumokban (Friedländer, 1888), ezeken a területeken az ézőrostkötegek is fejlettebbek. A garatalatti dúcban járulékos kötegek is kialakultak. Mindhárom szegmentális ideg tartalmaz szenzoros rostokat, a legtöbb a középső oldalidegben található.

A neuropilt kis átmérőjű, sok kollaterálissal rendelkező rostok alkotják. Főleg ezen a területen jönnek létre szinaptikus átkapcsolódások. A neuropilt egy dorsalis és egy ventralis zónára oszthatjuk, melyek között a határ azonban nem éles.

A hasdúclánc az említett morfológiai leírás alapján felosztható egy dorsalis motoros és egy ventralis szenzoros félre. Ventralisan található ugyanis egy kivételével az ézőpályák, valamint a ventralis óriásaxonok, melyek funkciója valószínűleg a szenzoros rendszerrel függ össze. A mechanoreceptív ézőneuronok

axonjai szintén ventralisan, a ventralis neuropilben futnak. A dorsalis fél motoros dominanciáját támasztja alá ezzel szemben, hogy a motoneuronok axonjai a dorsalis neuropilben keresztül haladnak, ezenkívül itt találhatjuk a motoros funkcióval bíró dorsalis óriásrostokat is.



2.b. ábra: Az idegrostok elhelyezkedése a hasdúcúcláncban (Günther szerint).

MR: középső óriásaxon; **LR:** lateralis óriásaxonok; **VR:** ventralis óriásaxonok; **IN:** óriásinterneuronok; **KpR:** középvonali rostkötegek; **DM:** dorsomedialis; **DL:** dorsolateralis; **L:** lateralis; **VL:** ventrolateralis; **VM:** ventromedialis; **IML:**

A dúcok teljes leírásához természetesen az ismertett fénymikroszkópos leírás nem elegendő. Szükség van a dúcsejtek neurokémiai leírására is, vagyis annak megállapítására, hogy milyen neurotranszmitterek, neuromodulátorok fordulnak elő a ganglionok idegsejtjeiben. Irodalmi adatokból ismert, hogy az idegsejtekben az ún. klasszikus neurotranszmitterek (acetilkolin, adrenalin, noradrenalin) mellett bizonyos aminosavak, illetve aminosavszármazékok (monoaminok) is lehetnek kémiai ingerületátvivők (Kerkut és mts., 1967; Myhrberg, 1967). Jó példa erre a serotonin, ami a gerinctelenekben - beleértve a gyűrűsférgeket is - széles körben előforduló, általánosan elfogadott transzmitter (Hernádi és mts., 1989). Emellett a neuronokban számos egyéb, elsősorban peptid természetű anyag (neuropeptid) is kimutatható. Az idegsejtek mintegy fele peptidtermelő, ún. neuroszekréción sejt, melyekben elektronmikroszkóppal számos nagy (200-300 nm), különböző elektrondenzitású szekretoros vezikula látható (Al-Yousuf, 1990), a neuroszekrétum pedig felszabadulási helyétől függően lehet neurohormon vagy neuromodulátor (Scharrer, 1978; 1982). A biogén aminok és neuropeptidok együttes előfordulása ugyanazon neuronon belül szintén jól ismert (kolokalizáció), és a gerincesek mellett már gerinctelenekben is bizonyított (Chronwall és mts., 1984a; Evans és Calabrese, 1989).

A dúcsejtek neurokémiai feltérképezésére az egyik legmegfelelőbb módszer az immunhisztológia, mely az utóbbi évtizedben rutin hisztológiai módszerré vált. Laboratóriumunkban az elmúlt években közel húszféle transzmittert, ill. neuropeptidet sikerült immunhisztológiailag kimutatnunk az idegrendszerben (Csoknya és mts., 1992; 1996; Lengvári és mts., 1992). Ezek egy része, úm. a substance P (SP), met-enkephalin, calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY) emlősből, más része (proctolin, octopamin, FMRFamid) pedig alacsonyabbrendűekből izolált peptid, ill. amin. Az ismert neuropeptidok száma emelkedett az új peptidok és peptiderg rendszerek jellemzésével, különösen a gerinctelenekben (O'Shea és Schaffer, 1985; Nässel, 1993).

Jelen munkánkban részletes morfológiai leírást adunk a földigiliszta központi és perifériás idegrendszerében előforduló proctolin, SP, FMRF amid, galanin, gastrin, cholecystokinin (CCK), CGRP, NPY, corticotrop-releasing faktor (CRF) és urocortin immunpozitív idegsejtek és idegrostok eloszlásáról. A serotonerg idegelemek központi idegrendszerbeli előfordulása jól ismert (Spörhase-Eichmann és mts., 1987a; 1987b), így mi elsősorban a perifériás idegrendszerben tanulmányoztuk a

serotonin immunpozitivitást. Vizsgáltuk ezenkívül a serotonin más peptidekkel (FMRFamid, galanin, gastrin, CCK) való kolokalizációját is. Sorozatmetszeteket vizsgálva kvantitatív méréseket is végeztünk, melyek magukba foglalják a sejtszámlálást, a sejtek méretének vizsgálatát és egy háromdimenziós számítógépes rekonstrukciót is.

A földigiliszta intakt idegrendszerének immunhisztológiai vizsgálata alapját képezte a regenerálódó idegszövet tanulmányozásának. Az idegrendszer regenerációjának vizsgálata célszerűnek látszik egyrészt a hiányzó irodalmi adatok miatt, másrészt alapul szolgálhat magasabbrendűek regenerációs folyamatainak tisztázásához. A korábbi állásponttal szemben, mely kizárt mindennemű morfológiai értelemben vett regenerációt, kiderült ugyanis, hogy magasabbrendűekben is van regeneráció a központi idegrendszerben (Grandpre és Strittmatter, 2001), bizonyos neuropeptidek pedig befolyásolhatják a regeneráció folyamatát (Waschek, 2002). Nagyobb szabású, az idegrendszer regenerációjával foglalkozó vizsgálataink első részében igyekeztünk felmérni, hogy a regenerálódott idegrendszer mennyiben azonos az eltávolított idegrendszerrel. Ilyen vonatkozásban a gyűrűsférgék különösen alkalmas modellnek tekinthetők, hiszen módunkban áll mind az amputáció kapcsán eltávolított, mind a regeneráció során képződött idegrendszeri részek egyidejű szövettani vizsgálatára. Egy ilyen jellegű vizsgálatban fontos, hogy az újonnan képződött idegszövetet el tudjuk különíteni a környező, nagy mennyiségű sarjszövettől. Irodalmi adatokból, valamint immunhisztológiai vizsgálatainkból tudjuk, hogy a serotonin a gyűrűsférgék legáltalánosabban előforduló transzmittere (Spörhase-Eichmann és mts., 1987a; 1987b, Lengvári és mts., 1992, Csoknya és mts., 1992). Az idegrendszer minden részén található serotonin immunpozitív idegsejtek, a serotonin immunpozitív idegrostok pedig sok esetben szinte teljesen kirajzolják az idegrendszert az immunfestett metszeteken háttérfestődés nélkül (1/1-10 ábrák). Az idegszövet markereként ilyen megfontolásból a serotoninint használtuk.

II. MÓDSZEREK

II/1. Kísérleti állatok

Az idegrendszer neurokémiai feltérképezését ivarérett földigilisztákon (*L. terrestris*), a kolokalizációs, valamint a regenerációs vizsgálatokat trágyagilisztákon (*E. fetida*) végeztük (2. táblázat). A földigilisztákat részben a pécsi egyetemi parkban, részben kiskertekben (Baranya és Zala megye) gyűjtöttük. A trágyagilisztákat helyi ellátóktól szereztük be. Hazánkban mintegy 40 féle földigiliszta faj él. Az egyes fajok hasonló anatómiai felépítésére való tekintettel az állatokon pontosabb fajmeghatározást nem végeztünk, feltételezve, hogy az idegelemek eloszlása is hasonló az egyes fajokban (Bullock és Horridge, 1965). Az állatokat kisebb levéldarabokat is tartalmazó nedves földben tartottuk 20 °C-on, majd felhasználás előtt 2-3 nappal egyenként, 8-10 cm átmérőjű műanyag dobozokban, megnedvesített papírvatta között helyeztük el, hogy tápcsatornájukból a homok kiürüljön. Erre azért volt szükség, mert az esetlegesen a bélcsatornában maradó kvarcsemcsék a szövettani metszetkészítést akadályozhatják.

Az idegrendszer regenerációjának vizsgálata során az állatokat a műtéti beavatkozásig nedves földben, a műtét után egymástól elkülönítve, kevés földet is tartalmazó műanyag dobozokban tartottuk nedves papírvatta között, melyet másnaponta cseréltünk. Az immunhisztológiai feldolgozást megelőző 2 napon át a fent említett okok miatt az állatokat éhezettük.

	Földigiliszta	Trágyagiliszta
Törzs	Annelida (gyűrűsférgek)	
Osztály	Oligochaeta (kevéssertéjűek)	
Rend	Opisthopora	
Család	Lumbricidae	
Nemzetség	Lumbricus	Eisenia
Faj	<i>Lumbricus terrestris</i> <i>Linnae (L. terrestris)</i>	<i>Eisenia fetida</i> Savigny <i>(E. fetida)</i>

2. táblázat: A *L. terrestris* és az *E. fetida* rendszertani beosztása.

II/2. Kísérleti módszerek

II/2.1. Immunhisztológia

Sztereomikroszkóp alatt éles pengével az állatok első 6-8 szelvényét távolítottuk el, ill. további 4-5, reprezentatív szelvényeket tartalmazó darabokat vágunk ki. A dekapitációt megelőzően az állatokat rövid ideig (10 másodperc) 10%-os etanol oldatban bódítottuk, mely beavatkozással a műtét ill. a fixálás során az állatokban esetlegesen fellépő fájdalomérzést igyekeztünk elkerülni.

A mintákat Zamboni-féle fixálóban rögzítettük 24 óráig (Zamboni és De Martino, 1967), melynek penetrációját a minták 15-20 másodpercig tartó mikrohullámú besugárzásával növeltük (Mizuhira és mts., 1990; Notoya és mts., 1990). A fixálószer feleslegének foszfát-pufferolt sóoldattal (PBS) való kimosása után az anyagokat szokványos módon felszálló etanol oldat sorozatban dehidráltuk, majd 52 °C olvadáspontú paraffinba ágyasztuk. A beágyazott blokkokból frontalis és sagittalis síkban 10 µm vastag sorozatmetszeteket készítettünk, valamennyi metszetet megőrizve, hogy az immunfestett metszeten a későbbiekben kvantitatív vizsgálatokat, valamint háromdimenziós rekonstrukciót végezhessünk.

Az immunfluoreszcens festéshez, ill. a kolokalizációs vizsgálatokhoz az anyagokat kriosztáttal metszettük. Ehhez a mintákat a fixálószer eltávolítását követően 20%-os szacharóz-oldatban tartottuk egy éjszakán át, majd a blokkokból 12 µm vastag metszeteket készítettünk. A tárgylemezeket a metszetek rögzítését megelőzően 3-aminopropyl triethoxysilánnal (Sigma-Aldrich Budapest), vagy zselatinnal kezeltük a jobb adhézió érdekében. A kolokalizációs vizsgálatokhoz minden egyes frontalis síkú metszetet alternálva rögzítettünk 2 sorozat tárgylemezen. Ebben az esetben a metszési folyamat különös körültekintést igényelt, mivel egy metszet elvesztése is lehetetlenné teheti az egymást követő metszetek számítógépes összehasonlítását.

Immunfestésre az ún. kettős peroxidáz-antiperoxidáz (double PAP) módszert használtuk (Sternberger és mts., 1970), melynek során a beágyazószernek a metszetekből való eltávolítása után azokat rehidráltuk, majd 10 percen át trypsin oldattal kezeltük (0,12%, Reanal). A nem-specifikus háttérfestődés 1%-os normál birka szérummal (20 perc) való blokkolása után a metszeteket a primer antiszérummal kezeltük 4 °C-on nedveskamrában 40-48 órán keresztül. Ezt PBS-ben való alapos mosás követte, majd a metszeteket a szekunder antitesttel (anti-rabbit-gammaglobulin, ARGG, "bridge" szérum) kezeltük 10 percig szobahőn, majd ismételt

mosás után peroxidáz-antiperoxidáz (PAP) komplex-szel ugyancsak szobahőmérsékleten 10 percig. Ezután az egész folyamatot az ARGG kezeléstől megismételtük (a felhasznált ellenanyagokkal kapcsolatos információk a 3. táblázatban olvashatók). A metszetekhez kötődött PAP komplex láthatóvá tételéhez 0.25%-os, 0.01% H₂O₂-t tartalmazó diamino-benzidin oldatot (DAB) használtunk (0.05 M Tris-HCL pufferben, pH 7,5, inkubációs idő 20 perc), majd a végterméket ozmiumtetroxid gőzben intenzifikáltuk. A DAB-reakciót követően néhány metszeten Gallyas szerint ezüst-intenzifikációt végeztünk (Gallyas és mts., 1982). A kolokalizációs vizsgálatok során az immunfestést úgy végeztük, hogy az alternáló metszetsorozatok egyikét serotonin, a másikat pedig valamelyik neuropeptid antiszérummal festettük meg párhuzamosan.

Antiszérum	Hígítás	Forrás
CGRP	1:1000	Peng HB (Peng és mts., 1989)
CCK	1:1000	Peninsula
CRF	1:1000	A. Arimura (Kozicz és mts., 1997)
FMRFamid	1:2000	Incstar
galanin	1:1000	Baláspiri L (Baláspiri és mts., 2000)
Gastrin	1:2000	Sigma
NPY	1:4000	Peninsula
Proctolin	1:1000	Eckert M (Eckert és mts., 1981)
serotonin	1:4000	Görcs T (Görcs és mts., 1985)
SP	1:10 000	Sigma
urocortin	1:3000	Vale W (Vale és mts., 1981)
Birka anti-nyúl gamma globulin (ARGG)	1:300	Arnel
Peroxidáz-antiperoxidáz komplex (PAP)	1:600	Arnel
rhodamine Red TM -X-konjugált anti-nyúl IgG (2%-os számár szérumban oldva)	1:80	Jackson Immunoresearch Labs., West Grove, PA, USA

3. táblázat: Az immunfestéshez használt primer (nyúlban termelt) és szekunder szérumok.

A metszetek egy részét immunfluoreszcens technikával vizsgáltuk. A metszeteket ebben az esetben is először trypsin oldattal kezeltük, majd a nem-specifikus háttérfestődést 5%-os számár szérummal (30 perc) blokkoltuk (Jackson Immunoresearch Labs., West Grove, PA, USA). A primer antiszérummal (poliklonális CRF, ill. urocortin antitest) szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk a

metszeteket, melyet normál számár szérumban (10 perc), majd PBS-ben történő alapos mosás (3x10 perc.) követett. A szekunder antiszérummal (rhodamine RedTM-X-konjugált anti-nyúl IgG) 4 órán át kezeltük szobahőn a nedveskamrában elhelyezett metszeteket, melyeket az inkubációt követően az antiszérum feleslegének eltávolítása céljából PBS-ben többször átmostunk.

II/2.2. Számítógépes feldolgozás

Az immunfestett metszetekről Nikon FXA mikroszkóphoz kapcsolt Spot RT Color kamerával 1600x1200 pixel felbontású digitális felvételeket készítettünk, melyeket IBM kompatibilis számítógépre transzportáltunk. A képeket az Adobe Photoshop 5.5, valamint a CorelDRAW 8 számítógépes programok segítségével dolgoztuk fel, valamint rendeztük táblákba. A fluoreszcens metszeteket a digitális képfeldolgozást megelőzően Nikon FXA epifluoreszcens mikroszkóppal értékeltük.

A kvantitatív méréseket metszetenként végeztük, hosszabbik átmérőjük mérésével párhuzamosan. Ehhez a munkához felhasználtuk az "NIH Image 1.55" program által nyújtott lehetőségeket. A metszeteket digitalizálva a méréseket a képernyőn végeztük a számítógép segítségével, előzetes kalibrálást követően. A kalibrálást minden általunk használt nagyításon Bürker kamrával végeztük, és a mérési eredményeket néhány esetben okulármikrométer segítségével is ellenőriztük.

A kolokalizációs vizsgálatok alkalmával az egymást követő metszetek összehasonlítását ugyancsak az "NIH Image" 1.55 program segítségével, digitalizált képeken végeztük. Párhuzamosan, egymás alá kivetítve két egymás utáni metszetet lehetővé vált a mindkét antiszérummal festődött sejtek lokalizálása egy adott ganglionban. A két metszet egymásra vetítését követően, az ún. "AND" képfeldolgozó művelettel csak azok a sejtek váltak láthatóvá, melyek mindkét metszetben ugyanabban a pozícióban voltak. A csak az egyik antiszérummal festődött sejteknek csak halvány körvonalai jelentek meg a képen. Az ún. "XOR" műveletet használva pedig az összevetített képen a kolokalizált sejtek a többi sejtől eltérő színben jelentek meg (XIV/E ábra). Tájékoztató pontokat felhasználva győződünk meg arról, hogy a megfestődött struktúrák ugyanahhoz a sejthez tartoznak. Annak ellenére, hogy a háttérfestődés elhanyagolható volt, a perifériás erek a bennük levő, nem-specifikus peroxidáz reakciót adó adó vér jelenléte folytán jól felhasználható orientációs pontokként szolgáltak. Ezen megfontolásból hagytuk el ezen metszetek hidrogén-peroxiddal való előkezelését az immunfestés során.

Ilyen erek a dúcok alatt futó subneuralis, valamint a két lateralis ér, melyek szorosan a szegmentális idegdúcok ventralis oldalán futnak (Michaelson, 1928). Ezen látható erek a dúcok kontúrjaiként szolgálnak, jelentősen megkönnyítve a szomszédos metszetek összeillesztését.

A további feldolgozást a háromdimenziós rekonstrukció jelentette. Ehhez Nikon Optophot-2 mikroszkópra a "Neurolucida for Windows" elnevezésű program által három, egymással 90 fokos szöget bezáró tengely mentén vezérelhető Mertzhauser tárgyasztalt szereltek fel, melyet kis léptetésű távolságú stepmotorok hajtanak meg. A mikroszkóp látómezejébe a kamera lucidához hasonló megoldással "vetítették be" a monitoron is látható képet, így egyszerre látható a tárgy és a monitoron rajzolt kép. Ezek a munkát megkönnyítve egymással fedésben vannak, s mindig úgy mozdulnak el a képernyőn és a tárgyasztalon, hogy az adott pillanatban rajzolt terület a látómező közepén helyezkedjen el. Ezt a szinkron mozgást is előzetes kalibrálás biztosítja. Mivel a tárgyasztal a számítógép irányításától függetlenül is mozgatható, lehetővé vált az egymás után következő metszetek lehető legpontosabb illesztése, így nem volt szükséges egy, a metszetsoron végighúzódnó, referenciát segítő mesterséges egyenest létrehozni. A metszeteket így egymástól 20 μm távolságban rajzoltuk le, és egymás után illesztve a képeket egy szabadon forgatható, térbeli képet kaptunk (XIV/A-D ábrák). A kép arányosságáról egy másik, a már említett "NIH Image 1.55" program felhasználásával két dimenzióra leképzett, perspektívikusan ábrázolt és mélységi árnyékolással készített ábrák segítségével igyekeztünk meggyőződni. A Neurolucida program a kolokalizációt mutató sejtek megállapításában is segítséget nyújtott. A ganglionok, valamint az immunreaktív sejtek körülrajzolását követően a kapott képeket egymásra vetítve biztosan megállapítható volt, hogy a festődött struktúrák ugyanahhoz a sejthez tartoznak-e (V/1-5C; XIV/E ábrák).

II/2.3. Az idegrendszer regenerációjának vizsgálata

A műtéti beavatkozás előtt ebben az esetben is alkalmaztuk a 10%-os etanos bódítást, amiből az állatok 5-6 perc elteltével magukhoz tértek. Ezalatt az idő alatt operációs mikroszkóp alatt elvégeztük a megfelelő idegrendszeri részek eltávolítását: a cerebralis gangliont a 3-4. szelvények között ejtett kis metszésből vettük ki, átvágva az előrefelé futó prostomialis idegeket, valamint az agyból hátra- és lefelé eredő garatgyűrűket. A ventralis dúcokat a hasi oldal felől tártuk fel. A 7-8. szegmentumok magasságától előrefelé, a középvonaltól lateralisán preparáltunk, hogy elkerüljük a hasdúclánc és annak ereinek sérülését. Miután a hasdúcláncot a környező kötőszövetből felszabadítottuk, átvágtuk az oldalirányba futó szegmentális idegeket és a műtét céljától függően eltávolítottuk a garatalatti dúcot vagy az ennek caudalis folytatásába eső 2-3 szegmentális dúcot. A felhasznált több mint 400 állat a beavatkozást általában jól tűrte. A műtét utáni első 1-2 napon az állatok 10%-a hullott el, de megfigyeltük, hogy ezek a példányok mindig egy régebbi gyűjtésből származtak, hosszabb időt töltve laboratóriumi körülmények között. A későbbi időszakban elhullás gyakorlatilag nem volt.

Az idegrendszer regenerációjának vizsgálatához az állatokat különböző időpontokban dolgoztuk fel. Ez a műtétet követő első 10 nap során naponta, majd a 20. napig másnaponta, a 20-60 nap között pedig minden 5. napon történt. Minden időpontban az agy, a subesophagealis valamint a szegmentális dúcok vizsgálatához egyenként 6-6 állatot áldoztunk fel. Az agyeltávolításon átesett és túlélő giliszták első 6 szegmentumát (mely tartalmazza a subesophagealis gangliont is) vágtuk le egy éles pengével a bevált narkózist követően az általunk kijelölt időpontokban. A regenerálódott hasdúclánc vizsgálatához pedig a műtéti területtől mind rostralis, mind caudalis irányban 2-2 szegmentummal vágtuk át az állatokat. Az immunhisztológiai feldolgozás, valamint a metszetek kvalitatív és kvantitatív értékelése a fentiekhez hasonló módszerekkel történt. Az immunfestést kriosztáttal készített metszeteken végeztük, a primer antiszérum a serotonin volt, amit az idegrendszer globális markereként használtunk.

III. EREDMÉNYEK

Eredményeink 11 féle poliklonális antiszérummal (3. táblázat) végzett immunfestésből származnak (4. táblázat). Az immunfestett metszetek értékelése során figyelembe kellett venni azt a tényezőt, hogy az állatok természetes pigmentanyagának színe hasonlít az immunfestés során színreakciót adó DAB végtermék színéhez. A pigment homogén fekete színével ellentétben azonban a DAB végtermék barna színű és szemcsézett. Az elkülönítésben segített a natív és immunfestett metszetek összehasonlítása is.

	FMRF amid	CCK	SP	G	UCN	GAL	P	CRF	CGRP	NPY	SER
prostomium	+++	+++	++	0	+++	0	0	+++	0	0	+++
agy	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++	0	0	+++
garatgyűrűk	+++	+++	+++	0	+++	0	0	+++	0	0	+++
garatalatti dúcok	+++	+++	++	++	++	+	++	++	+	+	+++
ventralis dúcok	+++	+++	++	++	+++	+	++	++	+	+	+++
szegmentális idegek	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	0	0	+++
bőrizomtömlő	+++	0	0	0	0	+++	+++	0	+++	0	+++
epidermis	+++	+++	++	+++	0	++	++	0	0	0	0
stomatogastri-cus dúcok	++	++	+++	++	0	+	+++	0	0	0	+
garat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	+++
rostralis bélszakasz	++	++	++	++	++	++	0	0	0	0	++
caudalis bélszakasz	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+

4. táblázat: A vizsgált neuropeptidek és a serotonin (SER) eloszlása a földigiliszta központi és perifériás idegrendszerében.

GAL: galanin, **G:** gastrin, **P:** proctolin, **UCN:** urocortin. **+++:** kifejezett, **++:** közepes, **+** gyenge immunreaktivitás. **0:** immunreaktivitás hiánya.

Minden esetben elvégeztük az immunfestés kontrolljait. A primer antiszérum elhagyását, illetve kihígítását követően nem láttunk immureaktivitást (módszer specificitás), az ilyenkor jelentkező esetleges festést (pl. vér, pigment) természetesen nem tekintettük pozitívnak. Nem kaptunk festődést a specifikus savó preabszorpciós, valamint kimerítéses próbáját követően sem (immunológiai specificitás). A metszeteken az endogén peroxidáz által esetlegesen megfestődött erek tájékozódási

pontoknak számítottak, különösen a kolokalizációs vizsgálatokban. Az említett tényezők figyelembevételével az általunk alkalmazott antiszérumok segítségével a földigiliszta idegrendszere neurokémiai szempontból a következőképpen jellemezhető (4. táblázat).

III/1. Központi idegrendszer (4. ábra)

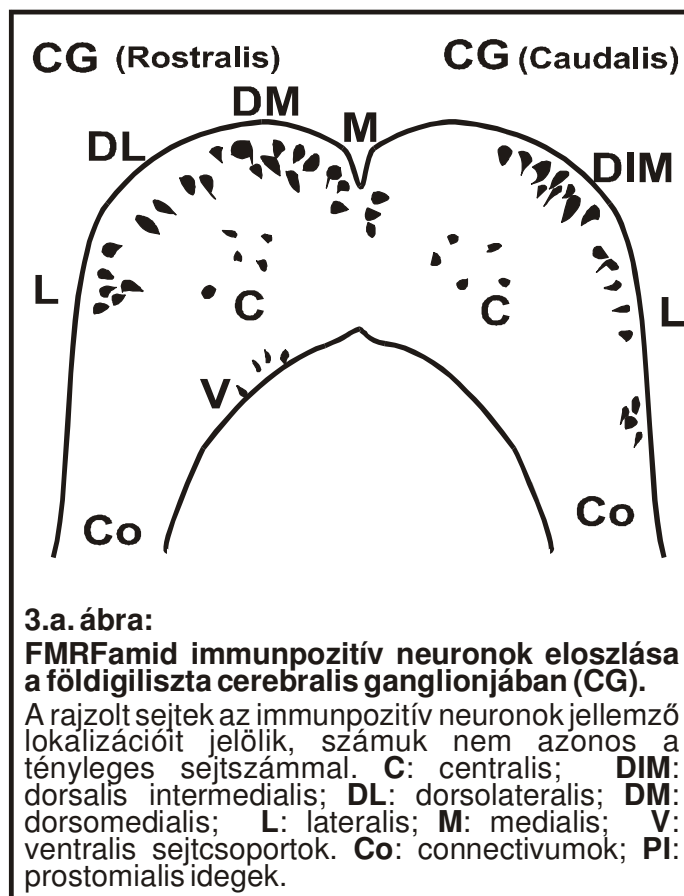
III/1.1. Cerebralis ganglion

A cerebralis ganglion szerkezetét a serotonin immunpozitív idegelemek egyértelműen kirajzolják (I/1,2 ábrák). Az agy rostralis részén az immunpozitív idegsejtek a dorsalis sejtköpeny medialis, dorsomedialis, dorsolateralis, valamint lateralis részén helyezkednek el. Medialisan, ill. dorsomedialisan a serotonin mellett proctolin, SP, FMRFamid, gastrin és galanin (I/1, III/2,5, VI/1, VII/1,3 ábrák), dorsolateralisan és lateralisan az említettekén kívül még CCK, urocortin és CRF immunreaktív idegsejtek is találhatóak (III/4, VI/2, VIII/1, XII/4, XIV/A ábrák). Elszórtan előfordulnak proctolin, SP, FMRFamid, valamint CRF immunpozitív sejtek az agy centrális és ventralis részén is, de ezek a sejtek nem rendeződnek meghatározott csoportokba (VI/1, VII/2, XI/8 ábrák). Caudalisan elkülöníthetők medialis, ún. dorsalis intermedialis, centrális, lateralis, valamint a garatgyűrűk eredése körüli sejtcsoportok, melyekben serotoninon kívül SP, FMRFamid, CCK, CRF, urocortin galanin és gastrin immunpozitív neuronokat találunk (I/2, VIII/2, IX/1,3 XI/1, XII/1 ábrák). NPY, valamint CGRP tartalmú idegelemeket az agyban nem találtunk.

Az agy serotonin immunpozitív idegsejtjei morfológiájukat tekintve különbözőek. A dorsalis sejtköpeny medialis és dorsomedialis részén található a legnagyobb méretű sejtek (25-30 μm), melyek körte alakúak, unipolárisak, és a földigiliszta agyának klasszikus neuroszekrécións sejtjeire hasonlítanak (I/1 ábra). A sejtek egy részének nyúlványa követhető a centrális neuropil felé. Lateral felé haladva a sejt méret csökken (15-25 μm), alakjukat tekintve dorsolateralisan még a körte alakú perikaryonok dominálnak, a lateralis sejtcsoportban pedig többnyire kerek, gyakran nyúlvány nélküli sejtek láthatók. Legkisebbek a ventralis, valamint a connectivumok eredésénél elhelyezkedő, 10-15 μm nagyságú sejtek, melyek nyúlványa gyakran a connectivum felé fordul (I/2 ábra).

A neuropil haránt irányban futó immunreaktív axonokat tartalmaz, melyek helyenként varikozitást is mutatnak (I/1 ábra). Az idegrostok egy része a circumpharyngealis connectivumba lép be (I/2 ábra). A serotoninon kívül proctolin,

FMRFamid, CRF, urocortin valamint a gastrin ellenes antiszérumok jól kirajzolják a neuropil rosthálózatát (III/1-3, VI/1,2, IX/1, XI/9, XII/1,5 ábrák). A SP, galanin, CCK antisavókkal halványan (VIII/1 ábra), a NPY és CGRP ellenanyagokkal megfestve a metszeteket pedig egyáltalán nem festődik a neuropil. A földigiliszta cerebralis ganglionjában átlagosan 2000 idegsejt található, ebből 80-100 serotonin immunpozitív (Spörhase-Eichmann és mts., 1987b). A különböző neuropeptideket tartalmazó idegsejtek száma változó.



Az FMRFamid a neuronok 7-8%-ában van jelen az agyban (5. táblázat). Az immunpozitív sejtek a cerebralis dúcnak már a rostralis részén is megjelennek, ahol főleg medialis és dorsomedialis lokalizációban helyezkednek el (III/2,5 ábrák). Caudal felé haladva fokozatosan megjelennek dorsolateralisan és lateralisán is FMRFamid pozitív perikaryonok, így egy FMRFamid pozitív sejtkoszorú alakul ki az agy centrális részét kitöltő neuropil körül, mely szintén intenzíven festődik

ezzel az antiszérummal (III/1 ábra). Az itt található FMRFamid pozitív neuronok általában monopolárisak, körte alakúak, nyúlványuk gyakran követhető a neuropil felé (III/3,4 ábrák). A medialis, dorsomedialis sejtek caudal felé fokozatosan eltűnnek, az agy hátsó részén főleg lateralisán, ill. a garatconnectivumok eredésénél láthatunk kisebb immunreaktív sejteket (III/6 ábra), melyek kerek (III/4 ábra) vagy orsó (III/7 ábra) alakúak, nyúlványuk néhány esetben követhető a connectivumba (III/7 ábra). Az FMRFamid immunpozitív idegsejtek eloszlását sémásan a 3.a. ábra mutatja.

A proctolin immunpozitivitás is kifejezett a cerebralis ganglionban (5. táblázat), elsősorban annak rostralis részén. Itt nagy számú immunpozitív neuron található az

összes sejtcsoportban, így ezek a perikaryonok is kialakítják a centrális neuropil körüli sejtkoszorút (VI/1 ábra). Morfológiájukat tekintve a neuronok körte, vagy kerek-ovális alakúak, monopolárisak, az FMRFamid immunpozitív neuronokkal ellentétben axonjaik nem láthatók (VI/2 ábra). Az agy caudalis részén a proctolin immunpozitivitás eltűnik.

A SP immunpozitív neuronok szintén nagy számban fordulnak elő az agyban (5. táblázat). Az összes lokalizációban találunk SP pozitív idegsejteket (VII/1 ábra), melyek viszont kisebbek, mint az FMRFamid, ill. proctolin immunpozitív sejtek, alakjukat tekintve pedig nagyrészt kerek, vagy ovális formájúak, axonjaik nem láthatók (VII/2,3 ábrák).

A gastrin és a CCK immunpozitív neuronok találhatóak a legnagyobb számban az agydúcban (5. táblázat). A gastrin immunpozitív neuronok főleg medialis és dorsomedialis (IX/1-3 ábrák), a CCK pozitív sejtek viszont inkább dorsolaterális és laterális lokalizációban (XIV/A ábra). A sejtek alakilag különfélék, nyúlványaik ritkán követhetők.

Galanin immunpozitív perikaryonok jóval kisebb számban jellemzik a cerebrális dúcot (5. táblázat). A rostralis részen főleg dorsolaterális, laterális pozíciókban (VIII/1 ábra), caudalisan pedig inkább a középvonalhoz közel (VIII/2 ábra) láthatók immunreaktív sejtek, melyek kerek vagy ovális alakúak, axonjaik nem követhetők.

Legkevesebb a CRF és az urocortin immunpozitív neuron az agyban (5. táblázat). A CRF pozitív neuronok elsősorban a laterális sejtcsoportokban figyelhető meg (XI/1 ábra), mind rostralisán, mind caudalisan. A sejtek kicsik (10-15 μm), kerek vagy ovális alakúak, nyúlványaik nem láthatók. Urocortin immunpozitív neuronból csak néhány található a cerebrális dúcban, melyek inkább dorsomedialisán, vagy dorsolaterálisán láthatók (XII/4 ábra), a CRF pozitív sejteknél nagyobbak (20 μm), körte alakúak.

Kolokalizációs vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a serotonin, mint általános transzmitter mellett tartalmaznak-e az idegsejtek egyéb neuropeptidet. Eredményeink alapján az agyban a kolokalizált sejtek száma relatíve alacsony. Az agy dorsomedialis és laterális részén találtunk 2-3 olyan neuront, amelyek serotonint és galanint is tartalmaznak. Ugyancsak ezekben a sejtcsoportokban találtunk 1-2 serotonin és CCK tartalmú sejtet. FMRFamid, gastrin, CRF valamint urocortin nem kolokalizál serotoninnal az agyban.

A **circumpharyngealis connectivumokban** serotonin, CRF, urocortin, CCK, FMRFamid valamint SP immunpozitív rostokat találunk (I/3, II/6,7, XI/2, XII/8 ábrák), melyek egy része a garatgyűrűvel kapcsolatban álló stomatogastricus dúcok felé halad (II/3 ábra), más részük pedig a subesophagealis ganglion irányában fut tovább (I/3 ábra). A többi antiszérummal a connectivumokban nem tudtunk rostokat kimutatni.

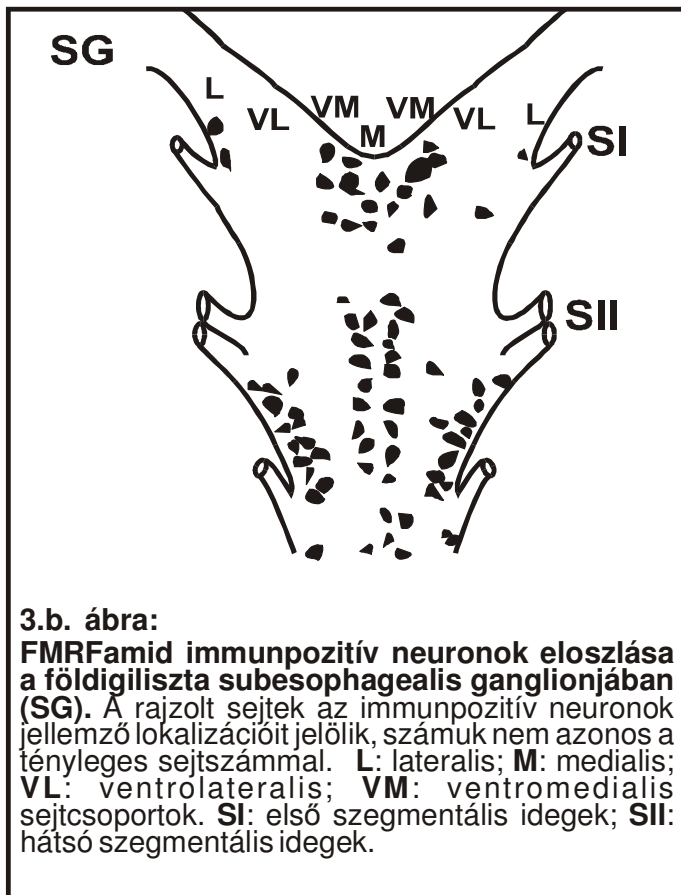
neuronok száma összesen	Agy kb. 2000		Garatalatti dúc kb. 1500		Ventralis dúc kb. 1400	
	IP neuronok		IP neuronok		IP neuronok	
	száma	%-os aránya	száma	%-os aránya	száma	%-os aránya
serotonin	80-100	4-5	120-140	8-9,3	110-140	7,8-10
CCK	170-250	8-12	120-150	8-10	50-75	3.6-5.3
CGRP	0	0	1-5	0.07-0.3	1-3	0.08-0.2
CRF	31-52	1,5-2,5	10-20	0,7-1,4	8-24	0,6-1,7
FMRFamid	150-170	7-7.8	160-180	10.6-12	80-90	5.7-6.4
galanin	30-45	1.38-2	1-5	0.07-0.3	1-5	0.08-0.4
Gastrin	170-250	8-12	32-45	2-3	7-25	0.5-1.8
NPY	0	0	2	0.1	1-3	0.08-0.2
Proctolin	100-120	4.6-5.5	20-30	1.3-2	15-20	1-1.4
SP	80-110	3.7-5	40-50	2.6-3.3	20-30	1.4-2.1
urocortin	4-12	0,2-0,6	30-75	2-5	57-88	4,1-6,3

5. táblázat: Immunpozitív (IP) neuronok száma és százalékos megoszlása a földigiliszta központi idegrendszerében.

III/1.2. Subesophagealis ganglion

A cerebralis ganglionnal ellentétben az immunpozitív neuronok a subesophagealis dúcban a ganglion ventralis és lateralis részét foglalják el, mindkét oldalon medialis, ventromedialis, ventrolateralis valamint lateralis sejtcsoportokat kialakítva (I/4-6, VII/5, IX/5 ábrák). Legnagyobb számban a serotonin, FMRFamid, ill. a CCK immunpozitív sejtek fordulnak elő ebben a dúcban (5. táblázat).

Serotonin antiszérummal a neuronok csaknem 10%-a megfestődik. Az immunpozitív sejtek minden sejtcsoportban megtalálhatók (I/3-5 ábrák), melyek a Günther által leírt neurontípusoknak megfelelően azonosíthatók, így morfológiájukat tekintve utalunk az 1. táblázatra.



Az FMRFamid immunpozitív neuronok (3.b. ábra) már a garatalatti dúc legelső részén is láthatók, ott, ahol a connectivumok elérik a dúcot (III/8 ábra). A sejtek a dúc rostralis részén inkább medialis és ventromedialis lokalizációban helyezkednek el (III/9 ábra), majd caudal felé haladva ventrolateralisan valamint lateralisán is megjelennek immunreaktív idegsejtek (III/10-13 ábrák), miközben a medialisabb sejtek száma csökken. A sejtek nagysága 25-30 μm , alakjuk változó. Gyakran látunk répa

vagy körte alakú sejtesteket, melyekből 1 vagy 2 nyúlvány indul ki (III/10-12 ábrák), a sejtek más részénél nem látható az axon, a perikaryon pedig gyakran kerek vagy ovális (III/13 ábra).

A CCK immunpozitív neuronok a garatalatti dúc rostralis részén minden lokalizációban megtalálhatók, caudalisan viszont csak ventrolateralisan és lateralisán látunk immunpozitív sejteket (XIV/B,C ábrák). Morfológiájukat és nagyságukat tekintve a sejtek az FMRFamid pozitív sejtekhez hasonlóan többfélék lehetnek.

SP-t és urocortin-t a neuronok kb. 3%-ában mutattunk ki (5. táblázat). Mindegyik sejtcsoportban találtunk immunpozitív sejteket (VII/4-6, XII/6,7 ábrák), melyek nyúlványait azonban csak ritkán tudtuk követni. A SP pozitív sejtek kisebbek (15-20 μm), többnyire kerek vagy répa alakúak (VII/4 ábra). Az urocortin pozitív perikaryonok elnyújtottabbak, ezeket inkább ovális vagy orsó alak jellemzi. Sem a SP, sem az urocortin pozitív neuronok nyúlványai nem követhetők.

A gastrin és a proctolin valamivel kevesebb, dúcenként mintegy 30 idegsejtben van jelen, CRF pedig 10-20 neuronban (5. táblázat), melyek főleg a ventrolateralis és a lateralis sejtcsoportokban foglalnak helyet (VI/3, IX/4,5, XI/3-4,10

ábrák). Ezen immunpozitív sejtek között gyakran látunk klasszikus, répa vagy körte alakú perikaryonokat (VI/4, IX/6, XI/3 ábrák), melyek nyúlványa egy rövid szakaszon követhető. A sejtek mérete 15-25 μm között változik.

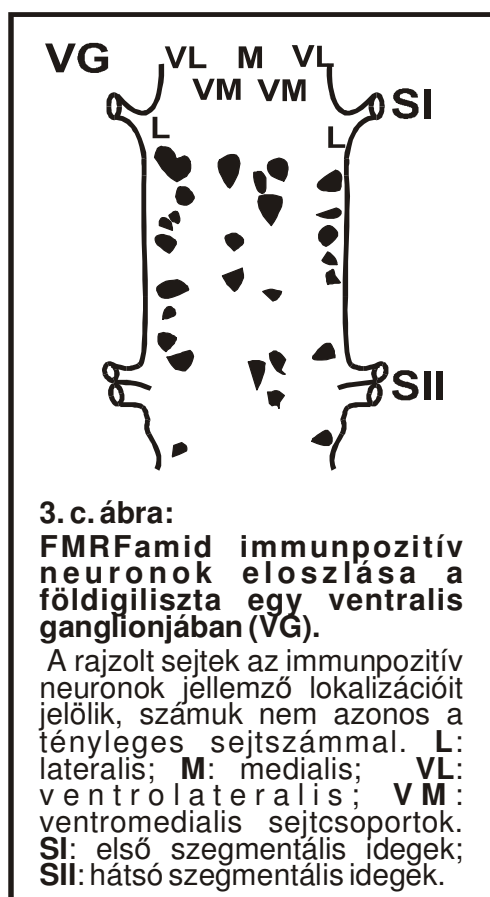
Legkevesebb a galanin, a NPY, valamint a CGRP pozitív idegsejt a subesophagealis dúcban (5. táblázat). A galanin és a CGRP immunpozitív sejtek száma 1-5, melyek elsősorban lateralisán találhatóak, kerek, vagy ovális alakúak, a neuritok nem láthatók (VIII/3, X/1,2 ábrák). A NPY immunpozitív neuronok ezzel szemben bilateralisán medialisán ülnek, alakjuk inkább ovális (X/6 ábra). A sejtek többsége kicsi (15-20 μm).

A sejtek által körbefogott centrális neuropil jól megfestődött az antiszérumokkal. A proctolin immunpozitív idegrostok dorsomedialisán egy jól elkülöníthető köteget hoznak létre, amiből vékony rostok válnak le, melyek lateral felé fordulva megcélozzák a szegmentális idegeket (VI/3 ábra). Festődésük itt eltűnik, így biztonsággal nem állítható, hogy valóban a szegmentális idegekben folytatódnak. Serotonin, FMRFamid, urocortin, CRF antiszérumokkal való festést követően pókhálószerű rajzolatot adó rosthalmazt látunk a neuropilben (III/9,10, XI/4, XII/6 ábrák). A CCK immunpozitív rostok pedig jól elkülöníthetők haránt és hosszanti lefutású kötegekre. Gyengén festődik a neuropil gastrin, galanin, NPY valamint CGRP ellenes antiszérumokkal (IX/4, X/1 ábrák). A dúc caudalis részén megjelenő dorsalis óriásaxonok körül longitudinalisan futó idegrostok egy része proctolin, gastrin, illetve CGRP immunpozitív.

A subesophagealis ganglionban is vannak olyan idegsejtek, melyek a serotonin mellett valamilyen neuropeptidet is tartalmaznak. Serotonin és FMRFamid együttesen 8-18 sejtben van jelen, melyek ventromedialisán vagy lateralisán (a páros ideg eredésénél) helyezkednek el. A ventromedialis sejtek 30 μm nagyságúak, körte alakúak, axonjukat követni lehet a dorsalis neuropil felé, melyek aztán az ellenoldali szegmentális ideg felé veszik útjukat (V/1 ábra). A lateralisak kerek vagy ovális alakú kisebb sejtek (15-25 μm), nyúlványuk nem vagy csak rövid szakaszon látható (V/2 ábra). A serotonin és CCK immunpozitív sejtek a dúc medialis, ventromedialis vagy lateralis részén találhatóak, számuk 5-6 a dúcon belül. Jóval kevesebb a serotonint és galanint is tartalmazó sejtek száma, átlagosan 1 ilyen sejt fordul elő a dúcban, ami ventromedialis helyzetű. Serotonin kolokalizációja a többi neuropeptiddel a garatalatti dúcban sem figyelhető meg.

III/1.3. Ventralis ganglionok

A subesophagealis ganglion caudalis folytatásába eső ventralis dúcok szintén tartalmaznak immunpozitív idegelemeket. Általában a garatalatti dúcot tartalmazó szegmentumokat követő 7-10 szelvényekben vizsgáltuk a ganglionok felépítését. Az idegsejtek lokalizációjukat valamint morfológiájukat tekintve hasonlóak a garatalatti dúc neuronjaihoz (I/7-10 ábrák).



Legnagyobb számban a serotonin, az FMRFamid, a CCK és az urocortin immunpozitív sejtek fordulnak elő (3.c. ábra, 5. táblázat), melyek az összes sejtcsoportban megfigyelhetők (IV/2-4, XII/9-10, XIV/D ábrák). Anti-FMRFamiddal megfestődnek a bilaterális nagy (30 μm) medialis sejtek, melyek axonjai vagy az azonos oldali vagy az ellenoldali neuropil felé követhetők (IV/5 ábra). A ventromedialis és ventrolateralis FMRFamid pozitív sejtek valamivel kisebbek (20-25 μm), körte alakúak, nyúlványaik szintén jól láthatók, az ellenoldali ventralis (IV/1 ábra) vagy dorsalis neuropil felé futnak (IV/2-4 ábrák). A lateralis sejtek alakjukat tekintve elnyújtottabbak, 15-25 μm nagyságúak, axonjaik, melyek általában átkereszteződnek, többnyire a dorsalis neuropilt célozzák meg

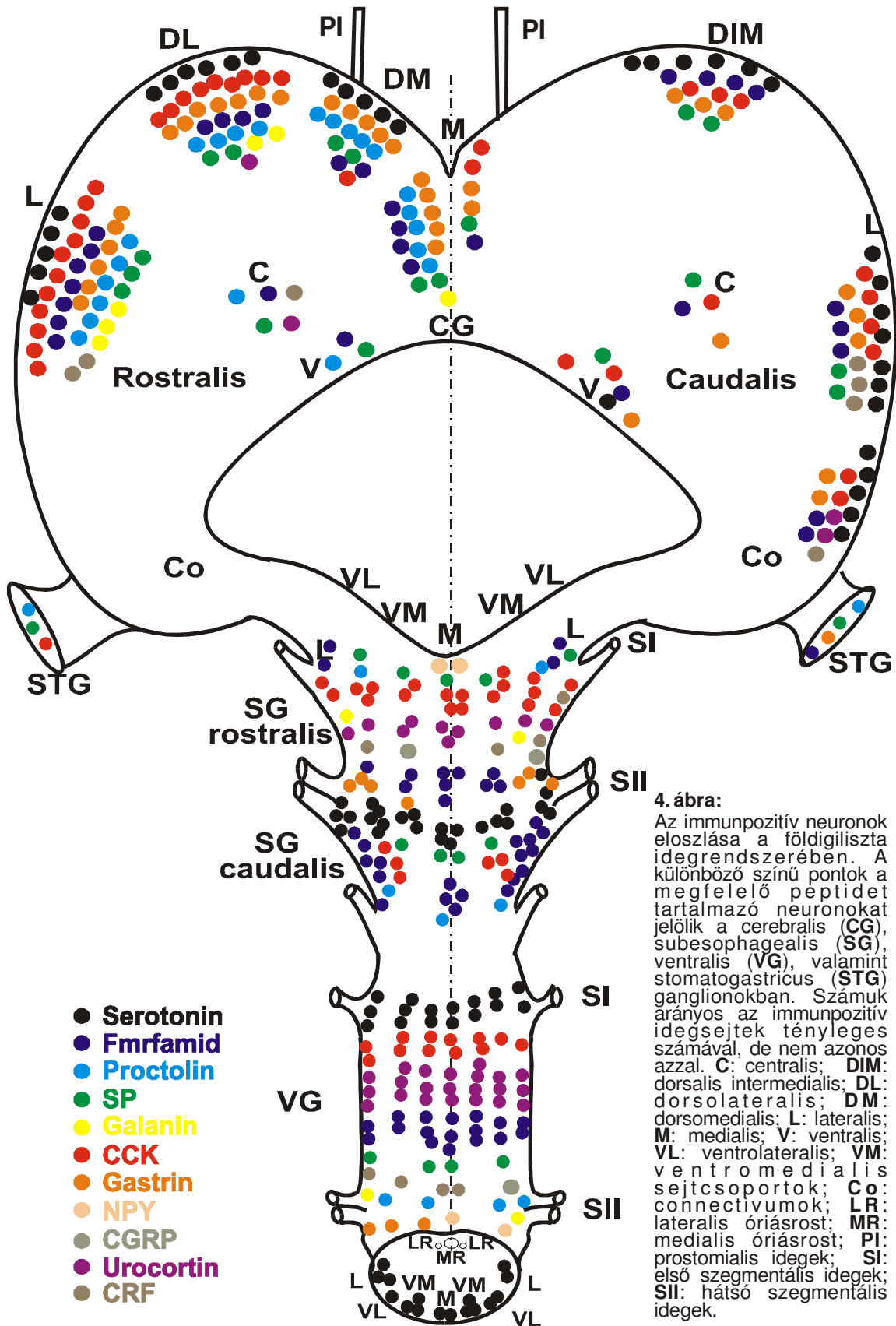
(IV/3 ábra). A CCK és az urocortin pozitív sejtek nyúlványai kevésbé festődtek meg, így lefutásukat nem tudtuk követni. Ezek a perikaryonok is többnyire körte alakúak (XII/10), méretük 15-25 μm között változik.

Proctolin valamint SP a hasi dúcok neuronjainak 1-2%-ában mutatható ki, CRF valamint gastrin a sejtek alig 1%-ában (5. táblázat). A SP immunpozitív sejtek elszórtan, minden lokalizációban előfordulnak. 15-20 μm nagyságú, többnyire kerek somájú sejtek, melyek neuritjai nem követhetők (VII/7,8 ábrák). CRF immunreaktivitás figyelhető meg a ventrolateralis és lateralis sejtcsoportokban (XI/5,7 ábrák), ezenkívül pozitívak a bilaterálisan elhelyezkedő, nagy medialis sejtek is (XI/6,11,12 ábrák).

Legkevesebb a galanin, NPY és CGRP immunreaktív idegsejt (5. táblázat), melyek kerek vagy ovális alakúak, axonjuk nem látható. A galanin pozitív sejtek főleg lateralisán láthatók (VIII/4-5 ábrák). A CGRP immunreaktív idegsejtek nemcsak lateralisán (X/3 ábra), hanem ventromedialisán is előfordulnak (X/4 ábra), az NPY pozitívak minden lokalizációban feltűnnek (X/7-9 ábrák).

A centrális neuropil az antiszérumok egy részével (serotonin, FMRFamid, proctolin, galanin, urocortin, CRF) intenzív festődést mutat varikozitásokkal (IV/2-4, VIII/6, XI/6,7,12, XII/10, ábrák), a többi esetben (SP, CCK, gastrin, NPY, CGRP) halvány (X/1 ábrák). Az óriásaxonok körül gyakran láthatók CCK, gastrin, CGRP pozitív, longitudinalis lefutású idegrostok (IX/7 ábra).

A ventralis ganglionokban a serotonint és FMRFamidot tartalmazó sejtek száma dúconként 7-13. Ezek lokalizációja, mérete és alakja hasonló a garatalatti dúcban található sejtekéhez (V/3-5 ábrák). Medialisán a kisebb, ovális sejtek között előfordulnak nagy, 30 µm nagyságú, körte alakú neuronok is, melyek nyúlványa a középső dorsalis óriásaxon felé halad (V/3 ábra). Serotonint és CCK-t együttesen tartalmazó sejt dúconként 5-6 fordul elő (XIV/E ábra), míg gangliononként 1-1 olyan idegsejt látható, ami serotonin és galanin tartalmú. Serotonin-gastrin kolokalizáció a ventralis dúcokban sem fordul elő.



4. ábra:

Az immunpozítív neuronok eloszlása a földigiliszta idegrendszerében. A különböző színű pontok a megfelelő peptidet tartalmazó neuronokat jelölik a cerebrális (CG), subesophagealis (SG), ventralis (VG), valamint stomatogastricus (STG) ganglionokban. Számuk arányos az immunpozítív idegsejtek tényleges számával, de nem azonos azzal. C: centralis; DIM: dorsalis intermedialis; DL: dorsolaterális; DM: dorsomedialis; L: laterális; M: medialis; V: ventralis; VL: ventrolaterális; VM: ventromedialis sejtcsoportok; Co: connectivumok; LR: laterális óriásrost; MR: medialis óriásrost; PI: prostomialis idegek; SI: első szegmentális idegek; SII: hátsó szegmentális idegek.

III/2. Perifériás idegrendszer

III/2.1. Szegmentális idegek

A NPY és a CGRP kivételével mindegyik antiszérummal intenzíven megfestődtek a szegmentális idegek, számos varikozitást mutatva. A rostok végződéseit ritkán lehet látni, néhány esetben a bélfonatban, a vesecsatornáknban, vagy a bőrízomtömlőben követhetők. A cerebralis ganglionból eredő **prostomialis idegek** - melyek sűrűn elágazódva az állat elülső része felé haladnak - SP, serotonin, FMRFamid, CRF, urocortin valamint CCK immunpozitívak (II/2, IV/10, VII/10 ábrák). A fő ágak csaknem minden metszetben megfestődtek, és gyakran kisebb ágak is (II/1 ábra). Vékony serotonin és FMRFamid immunpozitív rostok követhetők a prostomialis idegből a bőrízomtömlőbe, ahol ezek sugárirányban elágazódnak (IV/10 ábrák). Különösen a buccalis izomzatban látható intenzív rostfestődés, ahol az idegrostok hosszirányú lefutás után subepithelialis fonatot képeznek (IV/7 ábra).

III/2.2. Bőrízomtömlő

Az izomrétegben jelentős mennyiségű serotonin, proctolin, FMRFamid, galanin, valamint CGRP immunpozitív idegrost van jelen, különösen a külső körkörös, és a belső hosszanti izomréteg között (II/8, IV/8, X/5 ábrák). Vékony rostok figyelhetők meg az izomrostok között is mindkét izomrétegben (VI/6 ábra), melyek a testfal subepidermalis fonatával állnak kapcsolatban (II/5 ábra). Ezek az immunpozitív rostok könnyen elkülöníthetők az állat természetes pigmentanyagától, ami inhomogén, elmosódó szélű, és főleg a körkörös izomrétegben van jelen. A festődés intenzitása az állat caudalis vége felé haladva csökken.

A kültakaró hámsejtjeinek egy része proctolin, SP, FMRFamid, galanin, CCK és gastrin immunpozitív (IV/9, VI/5, VIII/9, IX/8, XII/3 ábrák). Ezek érzékhámsejteknek felelhetnek meg, melyeket főleg a rostralis szelvényekben, az állat dorsalis és lateralis oldalán láthatunk jól. A sejtek morfológiailag különfélék: egy részük átéri a hám teljes szélességét, más részük basalisán ül, körte alakú (VI/5, IX/8 ábrák). Az immunpozitív hámsejtekhez hasonlóak lehetnek a hám mirigysejtjei. A DAB végtermék barna színével és granulált megjelenési formájával ellentétben azonban a mirigysejtekben homogén fekete színű festődést látunk a sejteken belül (IV/9 ábra). Helyenként a sejtek csillói és subepidermalis nyúlványai is immunreaktívak. Feltűnő, hogy az epidermalis sejtek anti-serotoninnal nem festődtek

meg. Subepidermalis serotonin pozitív idegfonatot viszont minden esetben láttunk, főleg az első szegmentumok ventralis részén (II/5 ábra). Ez a plexus kapcsolatban van a hám alatti izomzatban levő fonattal, valamint a prostomialis és szegmentális idegek ágjaival. Ezek az immunpozitív rostok körülveszik a sertéket (IV/10 ábra), és valószínűleg beidegzik az ezeket körülvevő izomrostokat is.

III/2.3. Bélidegrendszer

A bélcsatorna minden része tartalmaz immunpozitív idegelemeket, leginkább a CCK, galanin, gastrin, FMRFamid és serotonin immunreaktivitás kifejezett.

A stomatogastricus ganglionokban, melyek a garatgyűrűk mentén helyezkednek el, nagy számú proctolin, SP, valamint néhány CCK, gastrin illetve FMRFamid pozitív ganglionsejtet láthatunk (IV/6 ábra). Ezek közül a proctolin immunpozitív sejtek kisebbek, orsó alakúak, nyúlványuk nem követhető. SP pozitív sejtek mindegyik stomatogastricus dúcban megfigyelhetők, nagy, kerek vagy ovális sejtek formájában (VII/9 ábra). A sejtek mellett nagy számú immunpozitív rostot is találunk ezekben a kis dúcokban, melyek a garatfal felé futnak (II/3,4 ábrák). A fenti ellenanyagokon kívül serotonin és galanin antiszérumokkal is sikerült ilyen rostokat kimutatnunk a circumpharyngealis dúcokban (II/3,4 ábrák).

A bélfal nyálkahártyájában, submucosájában, valamint izomrétegében az emésztőcsatorna teljes hosszában végig megfigyelhető serotonin, galanin, CCK, FMRFamid, urocortin és gastrin immunpozitív idegfonatot (II/6,7, IV/7, XII/2 ábrák), valamint galanin, CCK, gastrin és SP immunpozitív idegsejtek (VII/11, VIII/7,8 ábrák). A gerincesekkel ellentétben földigilisztában az idegsejtek a bélidegrendszeren belül nem rendeződnek dúcokba, hanem elszórtan helyezkednek el. A festődés intenzitása a tápcsatorna caudalis része felé haladva fokozatosan csökken, a beidegzés a szájüregben, valamint a garatban a legkifejezettebb.

Az intramuscularis plexusban vékony immunpozitív rostok ágazódnak el az egymással összeszövődő izomrostok között. Ezen idegrostok valószínűleg kapcsolatban állnak a bőrízomtömlővel. A bélrendszer izomfala bőségesen tartalmaz galanin, CCK és gastrin pozitív, kis méretű, elnyújtott sejteket, melyek nyúlványai meghatározhatatlan irányban futnak az izomrostok között. A CCK immunpozitív sejtek nyúlványait követni lehet a béllumen felé.

A hám alatt egy tömött felületű (subepithelialis), valamint egy lazább, mély (submucosus) immunpozitív idegfonatot találunk, melyek finom varikozitásokat is

mutatnak (II/7 ábra). A rosthálózat a szájüreg, valamint a garat területén a legfejlettebb (II/6 ábra), kevésbé kifejezett a nyelőcső, a begy, a zúzógyomor valamint a belek falában. A végbélben csak kivételesen lehet rostokat látni. Ez a hálózat látható a garatfal kitüremkedéseiben, valamint az ún. typhlosolisban is, ami a bélfal dorsalis irányú kiboltosulása. Az idegrostok a bélfal dorsalis oldalán kifejezettebbek, de ventralisan és lateralisán is jelen vannak. A rostok részben körkörös, részben hosszanti lefutásúak. A submucosus fonatból vékony rostok erednek a nyálkahártya számára, ahol immunpozitív sejteket találhatunk. A hám alatti kötőszövetben galanin, gastrin és CCK immunpozitív sejtek helyezkednek el, melyek nyúlványai vagy a hám felé, vagy azzal párhuzamosan a szomszédos bélszakaszok felé haladnak (VIII/7,8, VII/11 ábrák). A garatfalban van a legtöbb sejt, caudalis irányban az immunreaktív sejtek száma csökken.

A bélfal hámsejtjei csak gastrin antiszérummal festődtek. A nyelőcső kiöblösödéseiben elhelyezkedő mézsmirigyek fala mentén pedig finom serotonerg rostok szállnak le.

III/3. A cereberalis ganglion regenerációja

A metszésnek megfelelő szövethiányt az első postoperatív napon sarjszövet zárja le, a felszíni hám regenerációja pedig a 3. napon történik meg. A bőrizomtömlő csak később, a 7. nap körül épül fel. Az agy eltávolítását követő első napokban az átvágott garatgyűrűk a csomókknak megfelelően duzzadtak. A cereberalis ganglion helyét hegszövet foglalja el, mely dorsalis irányban a regenerálódó hámmal, ill. az alatta levő izomréteggel folytonos, ventralisan pedig a garatfallal van szoros kapcsolatban. A sarjszövetbe a garatconnectivumok felől mindkét oldalon serotonin immunpozitív idegrostok kúsznak be. Ezek már a 2. naptól egyértelműen láthatók, melyek ekkor még csak az agy caudalis részének megfelelően vannak jelen a ventralis oldalon (XIII/1 ábra). Az immunreaktív rostok száma napról napra nő. A rostok részben előrefelé haladva az agy rostralis részét rajzolják ki, részben inkább az ellenoldal felé veszik útjukat. Utóbbi esetben a két oldalról egymás felé haladó rostok a középvonalban kereszteződnek (XIII/2, 3 ábrák). A 6. napon varikozitásokat is fel lehet fedezni a rosthálózatban, majd a 10. npra az agy helyén egy rostokkal teljesen átszőtt szövetet figyelhetünk meg, amely kirajolja az agy centrális részét elfoglaló neuropilt (XIII/4 ábra). Ezzel a folyamattal párhuzamosan módosul a garatfal serotonerg beidegzése. A cereberalis dúc eltávolítását követően kifejezett serotonin immunpozitivitás észlelhető a garatfal dorsalis részén, míg a ventralis oldalon nincs festődés (XIII/7 ábra). Az 5. naptól kezdődően a dorsalis garatfalból serotonerg idegrostok követhetők a regenerálódó agyszövetbe (XIII/5 ábra), melyek vagy közvetlenül, vagy a stomatogastricus dúcokon, ill. a connectivumokon keresztül érik el azt. A garatfal ventralis oldalán csak később jelennek meg immunpozitív rostok, melyek a garat caudalisabb részén láthatók csak. A prostomialis idegekben a 6. naptól figyelhetők meg serotonerg rostok (XIII/6 ábra).

Az első idegsejtek relatíve későn, az agy eltávolítását követő 25. napon jelennek meg először caudalisan, a connectivumok eredéséhez közel (XIII/8 ábra), majd a dorsalis sejtkepenyben (XIII/9,10 ábrák). Az immunpozitív sejtek száma az egyes helyeken azonban eltérő. Feltűnő, hogy a neuronok nagy része caudalisan, a connectivumok eredése körül helyezkedik el (6. táblázat). Jólal korlátozottabb számban találunk sejteket a cereberalis dúc rostralis részén a dorsalis sejtzónában, ami intakt agy esetében a neuronok leggyakoribb előfordulási helye. Elvéve centrálisan is található idegsejtek. A serotonin immunpozitív neuronok száma fokozatosan nő, és a regeneráció 70. napjára megközelíti az intakt állatra jellemző

értéket (6. táblázat). A neuronok morfológiáját tekintve a lateralisán, a connectivumok eredése körül található sejtek 10-15 µm átmérőjűek, általában kerek, vagy orsó alakú sejtek, nyúlványaikat gyakran követni lehet, amint belépnek a garatgyűrűbe. A dorsalis sejtököpenyben - dorsomedialisán illetve dorsolateralisan - elhelyezkedő idegsejt somák általában lekerekített háromszög átmetszetűek, de lehetnek kerek, vagy ovális alakúak is. Az előbbieknél nagyobbak, 15-25 µm átmérőjűek, több sejtnek jól látható a neuropilhez csatlakozó nyúlványa. A cerebrális dúcot körülvevő tok a 40. npra válik teljessé, kialakítva az agy végleges formáját.

A cerebrális ganglion regenerációját a subesophagealis dúcban zajló változások kísérik. A serotonin immunpozitív idegsejtek száma eleinte emelkedik, majd a 10. naptól kezdődően csökken. Az eredeti sejtszám a 60-70. nap körül áll vissza.

	SER-IP neuronok száma az agyban	rostralis dorso-medialis	rostralis dorso-lateralis	centrális	caudalis lateralis
25. nap	3	1	2	-	-
30. nap	12	1	1	2	8
35. nap	4	-	4	-	-
40. nap	8	1	2	-	5
45. nap	10	1	3	2	4
50. nap	18	2	4	-	12
55. nap	24	7	8	3	6
60. nap	38	8	9	5	16
70. nap	64	8	12	10	34

6. táblázat: Serotonin immunpozitív (SER-IP) idegsejtek száma és lokalizációja a regenerálódott agyszövetben.

IV. MEGBESZÉLÉS

IV/1. Az idegrendszer neurokémiai feltérképezése

A földigiliszta idegrendszerében 10 féle neuropeptid-szerű anyag, valamint serotonin jelenlétét mutattuk ki immunhisztokémiai poliklonális ellenanyagokat használva. Jelentős mértékű immunreaktivitást kaptunk mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben. Ezen peptidek nagy részének idegrendszeri jelenlétét eredetileg gerinces fajokban írták le (SP, CCK, urocortin, CRF, gastrin, galanin, NPY, CGRP), a proctolint és az FMRFamidot viszont gerinctelenekben mutatták ki először. Jelen eredményeink, valamint egyéb peptidek alacsonyabbrendű állatokban, így a földigilisztában való előfordulására vonatkozó irodalmi adatok arra utalnak, hogy a peptideknek az idegrendszerben való jelenléte filogenetikailag ősi jelenség.

A proctolin egy gerinctelen pentapeptid (Arg-Tyr-Leu-Pro-Trh-NH₂), amit eredetileg csótány (*Periplaneta americana*) végbelének ganglionjaiban írtak le (Brown és Starrat, 1975), illetve ebből is izoláltak (Bishop és mts., 1981; Orchard és mts., 1989). Ebben a fajban a végbélben tölt be transzmitter szerepet. Eredeti leírása óta egy sor más ízeltlábúban, elsősorban rákokban (*Crustacea*) sikerült jelenlétét igazolni (Siwicki és Bishop, 1986), sőt kimutatták emlősök agyában, beleértve az emberi agyat is (Bernstein és mts., 1986). Ízeltlábú fajokban elsősorban a stomatogastricus rendszer peptidjeként tartják számon. Befolyásolja a homár (*Homarus americanus*) pylorusának összehúzóási ritmusát (Hooper és Marder, 1987), jelen van a sáska (*Locusta migratoria*) petevezetőjének simaizomzatában, hat a gyomor szekréciós működésére (Marder és mts., 1986). Mindezen adatok alapján feltételezhető a proctolin neurotransmitterként vagy neuromodulátorként betöltött szerepe az ízeltlábúak zsigeri szerveiben (Blitz és mts. 1999; Tazaki és Tazaki, 2000). *Eisenia fetida* előbelén végzett vizsgálatokkal nem sikerült ugyan kimutatni a proctolin bélmotilitást befolyásoló hatását (Barna és mts, 2001), de a proctolin immunpozitív idegsejtek jelenléte a földigiliszta stomatogastricus dúcaiban arra utal, hogy ebben a fajban a proctolin szerepet játszhat az emésztőrendszer más szabályozó folyamataiban.

Az FMRFamid egy tetrapeptid, neve a peptidet felépítő aminosavak kezdőbetűiből áll össze (fenilalanin (Phe), metionin (Met), arginin (Arg), fenilalanin-NH₂). Egy nagy gerinctelen peptidcsaládhoz tartozik, mely a tetrapeptid mellett

számos hosszabb peptidet foglal magában (Walker, 1992). Ezen peptidek N-terminálisa különböző, de tartalmazzák a jellemző Phe-X-Arg-Phe tetrapeptidből álló C-terminálisa, ahol az X lehet metionin, leucin vagy izoleucin. Eredetileg mint a puhatestűek cardioexcitatorikus peptidjét írták le, és kagylóból (*Macrocallista nimbosa*) izolálták (Price és Greenberg, 1977). Gyűrűsféregekben az eredeti tetrapeptidet egy Polychaeta tengeri féregben (*Nereis diversicolor*, Krajniak és Price, 1990), más rokon peptideket pedig orvosi piócában (*Hirudo medicinalis*, Evans és mts., 1991) mutatták ki. Ezen peptidek pontos szerepe a földigiliszta idegi funkcióiban nem ismert. Számos tanulmány foglalkozott az FMRFamid és rokon peptidek funkcióival gerinctelenekben. Kimutatták, hogy csigában neuromodulátorként és muscularis neurotranszmitterként egyaránt funkcionálhat (Cottrell, 1989; Kobayashi és Muneoka, 1990), elektronmikroszkópos megfigyelések alapján pedig leírták az FMRFamid immunreaktív neuronok szinaptikus és nem-szinaptikus kapcsolatait is (Elekes és Ude, 1993). Ismert ezenkívül, hogy orvosi piócában az FMRFamid a szívösszehúzódások és a bőrizmotömlő kontraktilitásának szabályozásában játszik szerepet (Norris and Calabrese, 1987; Simon and Calabrese, 1990).

A tachykininek közé tartozó SP emlős neuropeptid, de a gerincesek mellett a gerinctelenek körében is széles körben elterjedt (Nässel, 1993). A SP-t több gyűrűsféreg fajban is kimutatták (Lkhider és mts., 1987; Díaz-Miranda és mts., 1991). Multifunkcionális peptid, melynek hatását mind a centrális, mind a perifériás idegrendszerben, ill. egyéb szövetekben is kimutatták (Nässel, 1999). Legismertebb funkciója a simaizomkontrakció (Iversen, 1982; Regoli és mts., 1994) beleértve a bélkontrakciókat is, melyek kiváltásáért a peptid C-terminálisa felelős (Ikeda és mts., 1999). Emlősökben érző neurotranszmitterként is funkcionál (Iversen, 1982; Otsuka és Konishi, 1983), de számos magatartási folyamatot is befolyásol (Hasenöhrl és mts., 2000). Bizonyított, hogy a SP földigilisztában fokozza a bélkontrakciókat, mely hatás SP antagonistával gátolható (Kaloustian és Edmans, 1986). Ezenkívül a fejlődési folyamatokban is szerepet játszik (Nässel, 1999).

A galanint eredetileg sertés bélrendszerének kivonatából izolálták (Tatemoto és mts., 1983), majd számos gerinces állat gastrointestinalis rendszerében (Vrontakis és mts., 1991) is kimutatták. 29 aminosavból épül fel, és más ismert peptidekkel kevésbé rokon, így egy új peptidcsalád tagjaként tarthatjuk számon. A galaninról ismert, hogy számos formában létezik annak ellenére, hogy a biológiai

folyamatokban fontos szerepet betöltő N-terminálisának aminosavszekvenciája a különböző fajokban nagymértékben megőrződött (Rökæus, 1987; Vrontakis és mts., 1991). A fajokban jelen lehet több peptid is, így más antiszérumokat használva módosulhat az immunreaktív sejtek vagy rostok száma. A többi, bélrendszerben felfedezett peptidhez hasonlóan a galanin, ill. galanin-szerű immunreaktivitás széles körben előfordul az emlősök (Merchenthaler és mts., 1993), ill. más gerincesek (Batten és mts., 1990; Lázár és mts., 1991; Józsa és Mess, 1993) központi és perifériás idegrendszerében is. Kimutatták a galanin más peptidokkal ill. aminokkal való kolokalizációját is (Merchenthaler, 1993). A gerinctelenek közül a galanint tengeri csigában (*Bulla gouldiana*, Roberts és mts., 1989), dongóban (*Phormia terraenovae*, Lundquist és mts., 1991) és tengeri uborkában (*Holothuria glaberrina*, Díaz-Miranda és mts., 1996) mutatták ki. Felfedezése óta számos élettani funkcióját bizonyították, pl. hormonszekréción, simaizom összehúzódásban betöltött szerepét (Rökæus, 1987; Vrontakis és mts., 1991).

A CCK és a gastrin a két legismertebb azon gerinces peptidok közül, melyeket a gastrointestinalis rendszerben fedeztek fel, és ezt követően mutattak ki a központi idegrendszerben (Crawley és Corwin, 1994; Moore és Black, 1991; Walsh, 1994). A CCK-szerű peptidok is családot alkotnak, mivel a C-terminálison levő 8 aminosav többé-kevésbé állandó az egyes fajokban, de N-terminálisuk különbözőek. A legelterjedtebb formák a CCK-8 és CCK-33. A gastrin 17 aminosavból áll, szintén számos biológiailag aktív formában létezik (Walsh, 1994). Ezek alapján több rokon neuropeptid tehető felelőssé a gerinctelenekben észlelt CCK illetve gastrin immunreaktivitásért, úgymint a cionin, sulfakininek, LymnaeDFamidok (Johnsen és Rehfeld, 1990; 1993). Mivel a CCK C-terminálisán levő pentapeptid hasonló a gastrin C terminálisához, a két peptid között keresztreakciók alakulhatnak ki, valamint átfedések lehetnek egyes receptorok biológiai aktivitásában. Mindazonáltal ez a szerkezeti hasonlóság utalhat arra, hogy a két peptid közös őstől származik (Larsson és Rehfeld, 1977). Filogenetikai vizsgálatok alapján valószínűleg a CCK ősi, mint a gastrin (Johnsen és Rehfeld, 1992). A CCK prekursorát, a pro-CCK-t Polychaetákban kimutatták (Guissi-Kadri és mts., 1990). Mivel Oligochaetákban a CCK és a gastrin immunreaktivitás eloszlása különböző, és mivel a két peptid nem kolokalizál egymással, feltételezhető, hogy ezen fajokban legalább kétféle peptid fordul elő.

A gastrin és a CCK gerinctelenek emésztőfunkcióinak szabályozásában betöltött szerepe a gerincesekben ismert működéshez hasonlóan tűnik. A subepithelialis és a bélizomzatban jelen levő immunreaktivitás azokon a bélterületeken a legkifejezettebb, ahol magas az emésztőenzimek aktivitása (Kaloustian és Rzasa, 1986). Ezenkívül éhező állatokban is magasabb a gastrin szint (Kaloustian és Rzasa, 1986), ami valószínűleg szerepet játszik egy kollagenáz enzim aktiválódásához szükséges savas környezet létrehozásában. Éhezéskor ugyanis a földigiliszta saját, főleg kollagénból felépülő testfalát bontja le, ezért fontos ezen peptideknek a katabolizmusa a túlélés szempontjából. Ez a funkció valószínűleg fajspecifikus, mivel a gastrin szintje éhező patkányokban nem magasabb (Walsh, 1994). A CCK jóllakottsági szignálként működik gerincesekben, csökkentve a táplálékfelvételt (Lee és mts., 1994.). Hasonló hatásokat figyeltek meg puhatestűekben, ahol a CCK gátolja a buccalis motoneuronokat, melyek a zsákmányszerzésért felelősek, valamint a circumpharyngealis motoneuronokat, melyek a nyelésért felelősek (Crawley és Corwin, 1994; Wank, 1995). Földigilisztában a CCK immunpozitív sejtek funkciója mind a stomatogastricus rendszerben, mind a bélcsatorna elülső részében valószínűleg hasonló. A serotonin befolyásolja a CCK kiváltotta táplálékfelvétel-csökkenést (Crawley és Corwin, 1994; Samanin és Garattini, 1996). A mi megfigyeléseink alapján a CCK- és gastrin-szerű peptideknek moduláló hatásuk van, mivel a bélizomzat minden szegmentumban tartalmaz néhány immunreaktív sejtet.

CRF, urocortin. A CRF-et, ami egy 41 aminosavból álló neuropeptid, először az emberi agyból izolálták (Spiess és mts., 1981). Több peptid is létezik, melyek rendelkeznek a CRF biológiai hatásaival, így ezeket a CRF peptidcsalád tagjaiként tartják számon (urotensin I, II, sauvagine, urocortin). Ezek közül az urocortin a CRF-hez szerkezetileg és farmakológiailag is hasonló neuropeptid, amit 1995-ben fedeztek fel (Vaughan és mts., 1995). Ponty U-I cDNS próbát használva patkány középagyából egy különleges cDNS-t klónoztak, ami egy prekuzort és egyben egy önálló peptidet, az urocortint kódolt, aminek aminosavszekvenciája 63%-ban azonos az urotensin I-ével, 45%-ban pedig a CRF-ével. Nemrég a CRF peptidcsalád újabb két tagját izolálták, az urocortin II-t és az urocortin III-at (Lewis és mts., 2001; Dautzenberg és Hauger, 2002).

A CRF eloszlását gerincesekben behatóan tanulmányozták (Merchenthaler, 1984; Petrusz és mts., 1985; Yulis és mts., 1986). A gerinctelenek körében csak

néhány fajban mutatták ki, pl. rovarokban (Verhaert és mts., 1984), ill. egy gyűrűsféreg fajban (*Dendrobaena subrubicunda*, Remy és mts., 1982). A CRF-hez hasonlóan az urocortin is széles körben elterjedt a patkány központi idegrendszerében (Kozicz és mts., 1998), az emberi agyban (Iino és mts., 1999) valamint számos perifériás szervben, pl. a bőrben (Slominski és mts., 2000) vagy az endokrin mirigyekben. Az urocortin gerinctelenekben való előfordulásáról nincs adat. Az urocortin és a CRF különböző fajokban való előfordulását összevetve elmondható, hogy minimális az átfedés a két neuropeptid eloszlásában, így feltételezhető, hogy ezen két neuropeptid élettani szerepe is különböző. A CRF legismertebb funkciója, hogy a hypothalamo-hypophysealis-adrenalis rendszer neurohormonjaként a stresszhatásokat követően fokozza a hypophysis ACTH elválasztását, de emellett mint neurotranszmitter a vegetatív, magatartási és immunológiai válaszok koordinálásában is részt vesz (Turnbull és Rivier, 1997). Ismert ezenkívül a CRF szorongáskeltő (Koob és Bloom, 1985), tanulást fokozó (Diamant és de Wied, 1993), vérnyomásszabályozó (Lenz és mts., 1985) valamint táplálékfelvételt moduláló (Richardson és mts., 2000) hatása. A CRF peptidcsalád tagjai közül néhányról kimutatták, hogy gerinctelenekben a folyadékháztartás neuroendocrin szabályozásában vesznek részt (Coast, 1998; laboni és mts., 1998; Baldwin és mts., 2001). Földigilisztában is ismert néhány neuropeptid hasonló funkciója (Zimmermann, 1971; Fujino és mts., 1999).

Az urocortin rendelkezik a CRF biológiai hatásaival. Intravénásan vagy intracerebroventrikulárisan adva megegyezik a plazma ACTH szintjét, ami megegyezik a CRF stresszhatásra adott endokrin válaszával (Turnbull és Rivier, 1997). Ezenkívül fokozza a motoros aktivitást (Jones és mts., 1998), valamint szorongáskeltő hatása is ismert (Parrott és mts., 2000). Feltételezik, hogy szerepe van az immunválaszok központi szabályozásában, amennyiben immunszuppresszió kiváltotta stresszben mediátorként viselkedik (Okamoto és mts., 1998), ezenkívül gyulladásgátló hatással is rendelkezik (Agnello és mts., 1998). Perifériásan adva pedig a CRF-hez hasonlóan késlelteti a gyomorürülést és csökkenti az étvágyat (Asakawa és mts., 1999).

A NPY egy filogenetikailag ősi neuropeptidcsalád tagja, melyet disznó agyból izoláltak és határoztak meg (Tatemoto, 1982). Molekuláris szerkezetét tekintve nagymértékben hasonlít az YY peptidhez (PYY), valamint a marha pancreas polypeptidhez (BPP), melyek szintén ezen peptidcsalád tagjai, így ezekkel az NPY keresztreakciót adhat. Az NPY a patkány és az ember központi idegrendszerében

széles körben elterjedt, minden más transzmitternek vélt neuropeptidnél nagyobb koncentrációban fordul elő az agyban (Allen és mts., 1983; Dawbarn és mts., 1984). Emlősökben jól ismert biogén aminokkal (katekolaminok; Everitt és mts., 1984) és más peptidekkel (pl. somatostatin, FMRFamid; Chronwall és mts., 1984a, 1984b) való kolokalizációja is. Alacsonyabbrendű gerincesekben (Perroteau és mts., 1988), ill. gerinctelenekben (Remy és mts., 1988; Roberts és Moore, 1987) való előfordulásáról viszont csak néhány adat áll rendelkezésre. Jól ismert étvágyfokozó hatása (Clark és mts., 1984), de részt vesz az értónus és a szexuális magatartás szabályozásában is (Hoyle, 1999).

CGRP. A calcitonin génje nemcsak a calcitonint kódolja, hanem egy másik peptidet is, amelyet ennek alapján calcitonin gene-related peptide-nak (CGRP) neveztek el (Rosenfeld és mts., 1983), majd mutattak ki különböző típusú gerinces neuronokban a szintetikus peptid terminális ellenes antitest segítségével (Goodman és Iversen, 1986). A CGRP széles körben elterjedt a gerinctelenek központi idegrendszerében is, beleértve a földigilisztát is (Sonetti és mts., 1990; Sasayama és mts., 1991), így feltételezhető, hogy az evolúció során jól konzerválódott peptidről van szó. Funkciójára vonatkozóan bizonyított, hogy a központi és a perifériás idegrendszerben neuromodulátorként számos élettani folyamatban (fájdalomérzés, étvágy, véráramlás szabályozás) szerepet játszik (Zaidi és mts., 1987; Breimer és mts., 1988; Azria, 1989). Alacsonyabbrendűekben valószínűleg motoneuronokban is előfordul (Peng és mts., 1989).

A serotonint tartalmazó neuronok minden olyan fajban megtalálhatók, melyek rendelkeznek idegrendszerrel. A legtöbb ilyen fajban a serotonin olyan fontos magatartási folyamatokat befolyásol, mint a táplálkozás, a szexuális és az agresszív viselkedés (Weiger, 1997). Puhatestűekben kimutatták, hogy jóllakott állatokban a központi idegrendszer és az emésztőrendszer serotonin koncentrációja csökken. Ennek alapján valószínű, hogy a táplálkozás során serotonin szabadul fel, ami bélkontrakciókat okoz, valamint valószínűleg fokozza az állat táplálkozásakor bekövetkező általános aktivitását (Hernádi és mts., 2000). A gyűrűsférgék közül az orvosi piócában (*Hirudo medicinalis*) tanulmányozták behatóan a serotonin szerepét. A serotonerg interneuronok esetében a serotonin mint klasszikus transzmitter vesz részt az úszómozgások szabályozásában. A minden dúcban megtalálható, perifériára projiciáló ún. Retzius, és az ún. nagy laterális sejtek is serotonergek, melyek szintén az úszómozgásokat szabályozzák, de ebben az esetben a serotonin

valószínűleg nem szinaptikus kapcsolat útján, hanem mint neurohormon fejt ki hatását (Kristan és Nusbaum, 1983). Ezen sejteket ingerelve összetett táplálkozási mozgásminta jön létre, úgymint harapásszerű szájnyitó mozgás, nyáleválsztás, garatperisztaltika, nyákszekréció, valamint a testfal relaxációja, mely az emésztőfunkciók előkészítését szolgálja (Lent és mts., 1989). A serotonerg neuronokat a megfelelő környezeti és belső stimulusok aktiválják és gátolják. Ezen feltételezett funkcionális adatokkal jól korrelálnak a mi földigilisztában tett megfigyeléseink, úgymint immunpozitív idegrostok jelenléte a bőrizomtömlőben, valamint a prostomialis idegek valamennyi ágában.

Az immunpozitív sejtek eloszlásának és morfológiai jellemzőinek megfelelően, valamint *Lumbricus*-idegrendszer térképek felhasználásával levonhatók bizonyos következtetések ezen sejtek azonosítására és lehetséges szerepükre vonatkozóan. Az általunk vizsgált neuropeptidok a következő folyamatokban játszhatnak szerepet földigilisztában:

1. központi integráló folyamatok,
2. izomműködés szabályozása,
3. emésztőrendszer szabályozása,
4. védekezési reakciók szabályozása,
5. szenzoros folyamatok.

1. Központi integráló folyamatok

A központi idegrendszer feladata földigilisztában a szenzoros folyamatok és motoros aktivitás központi szabályozása mellett a táplálkozási, védekezési valamint a regenerációs folyamatok integrálása. Az immunoreaktív sejtek, melyek száma általában 10-100 között mozog, majdnem minden esetben megtalálhatók az összes vizsgált dúcban. Néhány vizsgált neuropeptid (CRF, urocortin) ellenes antitesttel azonban az immunoreaktív sejtek száma nagyon alacsony. Az adatok ezen heterogenitása azzal magyarázható, hogy a gerinctelen idegrendszerre a viszonylag alacsony sejtszám ellenére nagyfokú variabilitás jellemző az egyes neuronok morfológiai, biokémiai, funkcionális jellemzőinek vonatkozásában (O'Shea és Schaffer, 1985; Changeaux, 1986.).

A földigiliszta központi idegrendszerében a nagy számú immunpozitív idegsejt ellenére azon neuronok száma relatíve alacsony, melyek a serotonin mellett valamelyik neuropeptidet (FMRFamid, CCK, gastrin, galanin) is tartalmazzák. A kolokalizációt mutató sejtek valószínűleg többen vannak, hiszen a kisebb sejtek

méretüknél fogva nem kerülhettek rá a két egymást követő metszetre. Munkánk elsődleges célja azonban a kolokalizáció jelenlétének kimutatása volt, kvantitatív analízis nélkül.

Az immunpozitív sejtek morfológiai jellemzőinek változatossága arra utal, hogy a vizsgált neuropeptidek sokféle típusú idegsejtben fordulnak elő. A kerek vagy polygonális (SP, galanin, CRF immunpozitív) sejtek, melyek nem rendelkeznek citoplazmatikus nyúlvánnyal, az ún. apoláris sejteknek felelhetnek meg, melyek az immunoreaktív anyagot a környező sejtek felé szekretálják (paraneuronok). Más neuronok axonszerű citoplazmanyúlvánnyal az unipoláris sejtek megfelelői, mely neuronokban valószínűleg az axon transzportálja peptideket, melyek az axonterminálisnál neuromodulátor hatásúak is lehetnek (Sasayama és mts. 1991). Az axonok lefutását ugyan nem lehet pontosan követni, de a nyúlványok gyakran látható kezdeti szakasza alapján erre vonatkozóan is vonhatunk le következtetéseket.

A dorsalis sejtöpeny laterális sejtcsoportjának serotonin, SP, FMRFamid, CRF, CCK ill. gastrin immunpozitív sejtjeinek egy része megfelelhet az Ogawa által leírt jellemző sejteknek (Ogawa, 1928). Ezekről feltételezik, hogy a felszálló rostok legnagyobb részét kapják (Adey, 1951), így a garatalatti dúcot az aggyal összekötő interneuronoknak tekinthetők. A laterális sejtek caudalisabban, a connectivumok eredésénél elhelyezkedő (serotonin, FMRFamid, CCK, gastrin, CRF, urocortin immunpozitív) csoportját, valamint a dorsomedialis (serotonin, gastrin, proctolin, SP, FMRFamid immunpozitív) sejteket a connectivumba leszálló axon jellemzi, ezek valószínűleg projekciós interneuronok. A ventralisan és centrálisan elszórtan elhelyezkedő sejtek, melyek serotonin, proctolin, SP, FMRFamid, CCK, gastrin, urocortin, CRF immunreaktívak, valószínűleg lokális interneuronok, melyek egy része a medialis-dorsalis sejtcsoporthoz projiciál (Bullock és Horridge, 1965). Ezek valószínűleg a szenzoros folyamatok szabályozásában vesznek részt, ezáltal befolyásolják a földigiliszta táplálkozási és motoros aktivitását.

A subesophagealis dúcban és a ventralis ganglionokban többféle típusú interneuron (Günther, 1971) is megfestődött az általunk használt antiszérumokkal. Rostrálisan a ventromedialis immunpozitív sejtek egy része morfológiai jellemzőinek megfelelően ventralis nagy, szegmentális interneuron lehet. A caudalisan fekvő ventromedialis és laterális sejtek poliszegmentális interneuronoknak felelhetnek meg, melyek axonjai az elsődleges rostköteghez csatlakoznak. A kisebb laterális szómák

valószínűleg kis interneuronok, és az immunreaktív sejtek 50-80%-át teszik ki. Az utóbbi sejtcsoportban az általunk vizsgált összes neuropeptid jelen van a NPY és a CGRP kivételével, az említett neuropeptidok mindegyikének lehet integráló szerepe. A kolokalizációt mutató neuronok (melyek a serotonin mellett FMRFamid, CCK vagy gastrin immunpozitívak) egy része lokalizációja alapján szintén megfelelhet kis interneuronnak. A nagy szegmentális és a poliszegmentális interneuronok csak a serotonin, az FMRFamid és a CCK immunpozitív neuronok esetében kerülnek szóba, mivel a többi esetben a hiányzó axonfestődés miatt a neuronok pontos beazonosítása nem volt lehetséges. A neuropil kifejezett festődése, valamint a varikozitások jelenléte a dúcokban szintén utalnak ezen neuropeptidok központi kapcsoló szerepére.

2. Izomműködés szabályozása

A cerebrális ganglionban az általunk kimutatott immunpozitív sejtek között a dorsális sejtkepenyben valószínűleg motoneuronok is vannak, de mivel az axonok csak rövid szakaszon voltak követhetők, biztonsággal nem tudtuk megállapítani, hogy eléri-e a nyúlványok a prostomialis idegeket. A prostomialis idegekben, annak kisebb ágaiban, valamint az ezekhez kapcsolódó dúcok sejtjeiben FMRFamid, serotonin, SP és CCK immunpozitivitást észleltünk. A bőrízomtömlőben, a körkörös és hosszanti izomréteg között az anti-SP kivételével az összes antiszérummal mutattunk ki immunpozitív rostokat, melyek mindkét izomrétegbe adnak le ágakat. Az immunreaktív rostok és az izomzat között fennálló szoros kapcsolat utalhat ezen peptidok izomösszehúzódnak szabályozásában betöltött szerepére földigilisztában. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a hasdúcúcláncban serotonin, FMRFamid, CGRP, NPY, gastrin, CCK, CRF antiszérumokkal megfestődött ventromedialis és laterális neuronok egy része morfológiája alapján feltételezhetően motoneuron. Szintén motoneuronoknak felelhetnek meg lokalizációjuk, ill. morfológiai tulajdonságaik alapján a serotonin-FMRFamid, serotonin-CCK, valamint a serotonin-gastrin kolokalizációt mutató neuronok nagy része is. Az élettani és farmakológiai vizsgálatoknak megfelelően a serotoninnak a gyűrűsférgek izomösszehúzódnására van hatása (Gardner és Walker, 1982). A serotoninnal kolokalizáló peptidok neuromodulátorként valószínűleg a serotonin aktivitást módosítják. Általános felfogás szerint ugyanis a peptid kotranszmitterek a hagyományos transzmitterek hatékonyságát befolyásolják (Kupfermann, 1991), de lehetnek neurohormonok is

(Siwicki és mts., 1987). Mivel számos neuron nem jelölődött kettősen, a vizsgált neuropeptideknek a serotonin aktivitás befolyásolásán kívül egyéb moduláló és/vagy transzmitter funkciója lehet.

Az óriásrostok által közvetített motoros válasz szabályozását is befolyásolhatják a feltérképezett neuropeptidek, ill. a serotonin. A dorsalis középső óriásaxon bilaterálisan ventromedialisan elhelyezkedő nagyméretű perikaryonja ugyanis serotonin, a lateralis óriásaxon ventrolateralis helyzetű bipoláris perikaryonja pedig serotonin és FMRFamid immunpozitivitást is mutat. Az óriásrostok körüli neuropil CCK, CGRP és gastrin immunpozitivitása pedig ezen neuropeptidek jelentőségére utal. Különböző gerinces fajok neuromuscularis junctiójában kimutatták, hogy a kolinerg motoneuronok végződéseik CGRP-t is tartalmaznak. Feltételezik, hogy a felszabaduló CGRP szerepet játszik az acetilkolin hatását közvetítő nikotin-receptorok fenntartásában (Csillik és mts., 1993).

3. Emésztőrendszer szabályozása

A földigiliszta stomatogastricus rendszere vagy az agyból, vagy a subesophagealis ganglionból ered, és az idegek a beleket vagy közvetlenül, vagy a connectivumokhoz kapcsolt stomatogastricus dúcok idegsejtjein keresztül érik el. A stomatogastricus dúcok *E. fetida*-ban 250-300 neuront tartalmaznak (Barna és mts., 2001). A stomatogastricus rendszer mellett a bél izomrétegét ellátó idegek a ventralis dúcokból is eredhetnek. A földigiliszta bélidegrendszeréből hiányoznak a dúcszerű idegsejtcsoportok, csak különálló sejtek és idegrostok találhatók. Állandó festődés volt jelen a bélfalban mind a subepithelialis-submucosus, mind az intramuscularis idegfonatokban (serotonin, galanin, gastrin, CCK immunpozitivitás). Mivel idegrostokon kívül sikerült kimutatnunk galanin, CCK, gastrin és SP immunreaktív sejteket is a bélfalban, feltehető, hogy az immunpozitív rostok részben intrinsic eredetűek (Kaloustian és Edmans, 1986). Ezt támogatja az a tény is, hogy a gyűrűsférgék bélcsatornája a központi idegrendszer aktivitástól függetlenül működő koordinált mozgásmintázatot mutat, amit lokális idegsejtek szabályozhatnak. Nem lehet azonban kizárni az immunpozitív rostok extrinsic eredetét sem, mivel a stomatogastricus dúcok nagy számú proctolin, SP, CCK, gastrin, FMRFamid immunreaktív sejtet tartalmaznak. Eredményeink támogatják az immunreaktív idegelemek kettős, azaz intestinalis (intramuscularis, submucosus, subepithelialis) és idegszöveti lokalizációját, ami a gerincesekben a peptidhormonok jellemző

előfordulása. Mivel serotonerg idegsejteket az enteralis plexusban egyáltalán nem, a stomatogastricus dúcokban pedig csak kis számban figyeltünk meg, a bélrendszer serotonerg beidegzése valószínűleg extrinsic eredetű. Ezek az idegek főleg a hasdúccláncból erednek, ahol a serotonin immunpozitív idegsejtek előfordulási aránya 5-10%, ami kiemelkedő a gerinctelenek körében.

Irodalmi adatokból ismert egyes aminok/neuropeptidek bélizomzatra kifejtett serkentő, ill. gátló hatása földigilisztában (Barna és mts., 2001), miszerint a dopamin és az octopamin *E. fetida* előbéli izomzatán kontrakciót vált ki, míg a GABA és a proctolin hatástalannak bizonyultak. A serotonin kis koncentrációban gátolta, nagy koncentrációban fokozta az előbél mozgásait. Mivel ezek a hatások az axonális vezetés gátlását követően is megmaradtak, valószínűleg közvetlen izomhatásokról van szó. Az általunk vizsgált neuropeptidek bélidegrendszerben való jelenléte alapján feltételezhetjük, hogy ezek a neuropeptidek is szerepet játszhatnak a bélcsatorna motilitásának, valamint szekréciónak aktivitásának szabályozásában, főleg a bélcsatorna proximális részén, ahol a legtöbb immunpozitív idegelem található.

4. Védekezési reakciók szabályozása

A stresszjelenségek a gerinctelenek körében is előfordulnak, az immunválaszok szabályozásában a gerincesekhez hasonlóan neuropeptidek is részt vesznek (Ottoviani és mts., 1992; 1994). A földigiliszta a stresszhatásokra különféle reflex mechanizmusokkal válaszol, melyek közül jól ismert az óriásaxonok által kiváltott hirtelen bőrizomtömlő-kontrakció (Günther, 1972). Az érzőingerület feldolgozásán, valamint a motoros válasz összehangolásán kívül azonban a stresszre adott válaszreakció immunválaszokat is magába foglal (Cooper, 1996). Puhatestűek vérsejtjeiben kimutatták a stresszreakciónak egy a CRF által mediált ősi formáját, aminek alapján feltételezhetjük, hogy a CRF és rokon peptideknek szerepük lehet az immunfolyamatok neurogén kontrolljában (Genedani és mts., 1994). A puhatestűek vérsejtjeivel analóg sejtek földigilisztában az ún. celomasejtek (Cooper, 1996), melyek az állat immunrendszerének legfőbb végrehajtó sejtjei. Ezen sejtek neurohumorális szabályozásáról ismereteink hiányosak, de más gerinctelen fajokhoz hasonlóan a CRF, ill. az urocortin immunpozitív neuronoknak szerepük lehet a neuroimmunválasz kialakításában. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a földigiliszta központi idegrendszerében jelen van az ACTH (Kaloustian, 1986), ami a gerincesekhez hasonlóan a CRF által kiváltott folyamatok egyik effektora.

5. Szenzoros folyamatok

A földigilisztában szelvényenként mintegy 20.000 epidermalis és subepidermalis érzékhámsejt található (Jamieson, 1981), melyek kapcsolatba hozhatók tapintási, kémiai és fényingerek felvételével. A subepidermalis idegfonat valószínűleg érzőfonat, amit az érzékhámsejtek nyúlványai hoznak létre. Az érzékhámsejtek valamint a subepidermalis fonat kifejezett festődése alapján feltételezhető a kimutatott neuropeptidek (proctolin, SP, FMRFamid, galanin, CCK, gastrin) szerepe az Oligochaeták szenzoros folyamataiban. Ezt a feltételezést támasztja alá a serték körüli finom rostok festődése is. Érdekes módon az érzékhámsejtek néhány esetben nem festődtek (pl. serotonin antiszérummal). Ez részben a módszer korlátainak tudható be, amennyiben az érzékhámsejtek különösen érzékenyek a különböző kezelésekre (Gesser és Larsson, 1986). A festődés kiesésének másik oka az érzékhámsejtek alacsony amin koncentrációja lehet. A serotonin és az FMRFamid szenzoros folyamatokban való további részvételére utal, hogy serotonin és FMRFamid immunpozitívak a hasdúclánc érzőneuronjai. A ventralis óriásaxon perikaryonja pedig, mely szintén az érzőrendszerrel hozható kapcsolatba (Günther, 1971), FMRFamid immunpozitív, aminek alapján feltételezhető az FMRFamid moduláló szerepe az érzőingerület továbbításában.

A fent említett adatok azt sugallják, hogy az általunk vizsgált peptidek főleg neurotransmitterként és/vagy neuromodulátorként játszanak szerepet központi kapcsoló, neuromuscularis, ill. szenzoros folyamatokban. A neurohormonális szerepüket sem lehet azonban kizárni. A neuroszekréción sejtékből történő excitáció földigilisztában szintén széles körben elterjedt a nem-szinaptikus régiókban (Golding és May, 1983). A földigiliszta idegrendszere gazdagon ereszett, nagy számú neuroszekréción sejtet tartalmaz, melyek közül néhány hormonok forrása lehet. A nem-szinaptikus excitotikus anyagfelszabadulást a földigiliszta cerebralis ganglionjában elektronmikroszkóposan Al-Yousuf figyelte meg (Al-Yousuf, 1988). A földigiliszta idegrendszerének neurokémiai feltérképezése alapjául szolgálhat további kolokalizációs valamint összehasonlító vizsgálatoknak. Ezenkívül elősegíti a számos élettani folyamatot szabályozó neuronális hálózatok azonosítását, ill. a feltérképezett neuropeptideknek az idegrendszer regenerációjának szabályozásában betöltött szerepének meghatározását földigilisztában.

IV/2. A cerebralis ganglion regenerációja

A cerebralis dúc morfológiai regenerációja rendkívül gyorsan végbemegy. Az agyeltávolítást követő 40 nap alatt az agy visszanyeri alakját és szerkezetét (Aros és Vigh, 1962). A cerebralis ganglion eltávolítását követő első néhány napon a serotonerg idegrostok fokozatosan kirajzolják a regenerálódó agy területét, először annak ventralis, majd pedig dorsalis részét. A rostok nagy része a connectivumokból, kisebb részük a garatfalból származik. Az első 2 hétben a bőrízomtömlőt innerváló serotonerg idegek, a prostomialis idegek, valamint a stomatogastricus fonatok alakulnak ki. Intakt állatban a serotonerg idegsejtek száma az agyban 70-80 (Spörhase-Eichmann és mts., 1987b). A regeneráció alatt az első serotonerg perikaryonok a 25. napon figyelhetők meg, a neuronok eredeti száma pedig a vizsgált periódus végére állt vissza. Ezzel ellentétben a garatalatti dúcban a serotonerg neuronok száma végig elmarad az intakt állatra jellemző értéktől. A cerebralis ganglion eltávolítását követően a sejtszám a subesophagealis dúcban először megemelkedik, majd a következő 10 nap folyamán az intakt állatra jellemző érték alá csökken. Ezután ugyan emelkedik a sejtszám, de a megfigyelési periódus végére sem éri el az ép állatra jellemző értéket. Az intakt dúcok HPLC-vel kimutatott serotonin tartalma a regeneráció első felében csökken (Csoknya és mts., 1993). Ehhez hasonlóan csigában a cerebro-buccalis connectivum lézióját követően a serotonin depletálódik a buccalis dúcokból (Baker és Croll, 1996; Chiasson és mts., 1994). A serotonin ezek alapján valószínűleg gátolja a regeneráció folyamatát (McCobb és mts., 1988; Murrain és mts., 1990).

A regenerálódó cerebralis gangliont felépítő idegsejtek eredete nem tisztázott. Keletkezhetnek (1) az intakt ventralis ganglionok hám alatti differenciálatlan sejtjeiből, (2) a kötőszövetes tokok mesodermalis sejtjeiből vagy (3) a garatfal hámelemeiből (Aros és Vigh, 1962; Bánvölgyi és mts., 1994). A subesophagealis ganglionban megfigyelt hiperszekréció utalhat arra, hogy ez a dúc átmenetileg átveszi az agy szekretoros funkcióját, és/vagy olyan anyagokat választ el, melyek a cerebralis ganglion regenerációjának folyamatához szükségesek. Ennek a feltételezésnek megfelelnek adataink, miszerint a regeneráció első felében az első intakt ganglionban az idegsejtek száma fokozatosan nő.

A regenerálódó idegek eredetére vonatkozóan eredményeink alátámasztják az említett elméletet. A regeneráció első napjaitól fokozatosan egyre több serotonerg idegrost nő a garatconnectivumokból a hegszövetbe, kialakítva végül a cerebralis

ganglion idegrosthálózatát. Elmondható, hogy az agy serotonerg rendszere elsősorban a connectivumokból regenerálódik. A garatalatti dúcban észlelt változások alapján ez a ganglion is szerepet játszik a regeneráció folyamatában.

A kialakuló agy ventralis része szoros kapcsolatban van a garatfallal is, különösen a regeneráció első 3 hetében. Serotonerg rostok kötik a garatfalat a regeneráló agyi neuropil ventralis részéhez, valamint a stomatogastricus rendszerhez. Intakt agy esetében annak ventralis része innerválja a garatfalat a stomatogastricus rendszeren keresztül (Bullock és Horridge, 1965). Ennek alapján nem zárható ki, hogy a cerebralis ganglion egy kis része a garat falából regenerálódik.

V. IRODALOMJEGYZÉK

- Adey WR (1951) The nervous system of the earthworm *Megascolex*. *J Comp Neurol* 94:57-103
- Agnello D, Bertini R, Sacco S, Meazza C, Villa P, Ghezzi P (1998) Corticosteroid-independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide urocortin. *Am J Physiol* 275(5 Pt 1):E757-762
- Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221:877-879
- Al-Yousuf S (1988) Distribution and ultrastructure of neurosecretory cells in the cerebral ganglion of the earthworm. *J Morphol* 197:1-20
- Al-Yousuf S (1990) Neuropeptides in annelids. *Prog Comp Endocrinol* 232-241
- Aros B, Vigh B (1962) Regeneration of the neurosecretory system of the cerebral ganglion in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Acta Biol Hung* 13:323-337
- Asakawa A, Inui A, Ueno N, Makino S, Fujino MA, Kasuga M (1999) Urocortin reduces food intake and gastric emptying in lean and ob/ob obese mice. [see comments]. *Gastroenterology* 116(6):1287-1292
- Azria M (1989) "The calcitonins." Karger, Basel
- Bailey FL (1930) The influence of the nervous system in the regeneration of *Eisenia foetida savigny*. *J Exp Zool* 57:473-509
- Baker MW, Croll RP (1996) Modulation of in vivo neuronal sprouting by serotonin in the adult CNS of the snail. *Cell Molec Neurobiol* 16:561-576
- Balásperi L, Tegyei Zs, Dux M, Jancsó G, Józsa R, Csernus V, Mess B (2000) Synthesis of chicken galanin and its N- and C-terminal segments, and preparation of their antisera. *Lett Peptide Sci* 7:23-26
- Baldwin DC, Schegg KM, Furuya K, Lehmborg E, Schooley DA (2001) Isolation and identification of a diuretic hormone from *Zootermopsis nevadensis*. *Peptides* 22:147-152
- Bánvölgyi T, Barna J, Csoknya M, Lengvári I, Hámori J (1994) The number of ganglion cells in the intact and regenerated nervous system in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Acta Biol Hung* 45:179-187
- Barna J, Csoknya M, Lázár Zs, Barthó L, Hámori J, Elekes K (2001) Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). *J Neurocytol* 30:313-325
- Batten TFC, Moons L, Cambre M, Vandesande F (1990) Anatomical distribution of galanin-like immunoreactivity in the brain and pituitary of teleost fishes. *Neurosci Lett* 111:12-17
- Bernstein H-G, Eckert M, Penzlin H, Vieweg U, Röse I, Dorn A (1986) Proctolin immunoreactive neurons in the human brain stem. *Acta Histochem* 80:111-114
- Bischoff CA, O'Shea M, Miller RS (1981) Neuropeptide proctolin (H-Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr-OH): Immunological detection and neuronal localization in insect nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5899-5902
- Blitz DM, Christie AE, Coleman MJ, Norris BJ, Marder E, Nusbaum MP (1999) Different proctolin neurons elicit distinct motor patterns from a multifunctional neuronal network. *J Neurosci* 19:5449-5463
- Breimer LH, MacIntyre I, Zaidi M (1988) Peptides from the calcitonin genes: Molecular genetics, structure and function. *Biochem J* 255:377-390

- Brown BE, Starrat AN (1975) Isolation of proctolin, a myotropic peptide, from *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol* 21:1879-1881
- Bullock TH, Horridge GA (1965) Structure and function in the nervous system of invertebrates. Freeman, San Francisco
- Changeux JP (1986) Coexistence of neuronal messengers and molecular selection. In: Hökfelt T, Fuxe K, Pernow B (eds) Prog Brain Res Elsevier, Amsterdam, Vol 68:373-403
- Chiasson BJ, Baker MW, Croll RP (1994) Morphological changes and functional recovery following axotomy of a serotonergic cerebrobuccal neuron in the land snail *Achatina fulica*. *J Exp Biol* 192:147-167
- Chronwall BM, Chase TN, O'Donohue TL (1984a) Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in human cortical and rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett* 52:213-217
- Chronwall BM, Knight RM, O'Donohue TL (1984b) Colocalization and segregation of peptide in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *Soc Neurosci (Abstr)* 10:155
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984) Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115:427-429
- Coast GM (1998) Insect diuretic peptides: structures, evolution and actions. *Am Zool* 38:442-449
- Cooper EL (1996) The immunology of the earthworms and tunicates. *Lab Animal* 25:38-43
- Cottrell GA (1989) The biology of the FMRFamide-series of peptides in molluscs with special reference to *Helix*. *Comp Biochem Physiol* 93A:41-45
- Crawley JN, Corwin RL (1994) Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15:731-755
- Csillik B, Tajti L, Kovács T, Kukla E, Rakic P, Knyihár-Csillik E (1993) Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junctions: relationship to the acetylcholine receptor. *J Histochem Cytochem* 41(10):1547-1555
- Csoknya M, Lengvári I, Benedeczy I, Hámori J (1992) Immunohistochemical and ultrastructural study of the enteric nervous system of earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Acta Biol Hung* 43:241-251
- Csoknya M, Lengvári I, Hiripi L, Eckert M, Rapus J, Elekes K (1996) Octopamine in the central nervous system of Oligochaeta: an immunocytochemical and biochemical study. *Cell Tissue Res* 285:27-37
- Csoknya M, Lengvári I, Hiripi L, Elekes K, Vincze J, Szelier M, Hámori J (1993) Serotonin content during the regeneration of nervous system in earthworm (*Lumbricus terrestris* L., Oligochaeta). *Acta Biol Szeged* 39:39-49
- Dautzenberg FM, Hauger RL (2002) The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23:71-77
- Dawbarn D, Hunt SP, Emson PC (1984) Neuropeptide Y: regional distribution, chromatographic characterization and immunohistochemical demonstration in post-mortem human brain. *Brain Res* 296:168-173
- Diamant M, de Wied D (1993) Structure-related effects of CRF and CRF-derived peptides: dissociation of behavioral, endocrine and autonomic activity. *Neuroendocrinology* 57(6):1071-1081

- Díaz-Miranda L, Escalona de Motta G, García-Arrarás JE (1991) Localization of neuropeptides in the nervous system of marine annelid *Sabellastarte magnifica*. *Cell Tissue Res* 266:209-217
- Díaz-Miranda L, Pardo-Reoyo CF, Martínez R, García-Arrarás JE (1996) Galanin-like immunoreactivity in the sea cucumber *Holothuria glaberrina*. *Cell Tissue Res* 286:385-391
- Eckert M, Agricola H, Penzlin H (1981) Immunocytochemical identification of proctolin-like immunoreactivity in the terminal ganglion and hindgut of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res* 217, 633-645
- Elekes K, Ude J (1993) An immunogold electron microscopic analysis of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the CNS of *Helix pomatia*: ultrastructure and synaptic connections. *J Neurocytol* 22:1-13
- Evans BD, Calabrese RL (1989) Small cardioactive peptide-like immunoreactivity and its colocalization with FMRFamid-like immunoreactivity in the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *Cell Tissue Res* 257:187-199
- Evans BD, Pohl J, Kartsonis NA, Calabrese RL (1991) Identification of RFamide neuropeptides in the medicinal leech. *Peptides* 12:897-908
- Everitt BJ, Hökfelt T, Terenius L, Tatemoto K, Mutt V, Goldstein M (1984) Differential coexistence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 11:443-462
- Friedländer B (1888) Beiträge zur Kenntnis des Centralnervensystems von *Lumbricus*. *Z Wiss Zool* 47:47-84
- Fujino Y, Nagahama T, Oumi T, Ukena K, Morishita F, Furukama Y, Matsushima O, Ando M, Takahama H, Satake H, Mirakata H, Nomoto K (1999) Possible functions of oxytocin/vasopressin- superfamily peptides in annelids with special reference to reproduction and osmoregulation. *J Exp Zool* 284:401-406
- Gallyas F, Görcs T, Merchenthaler I (1982) High-grade intensification of the end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. *J Histochem Cytochem* 30:183-184
- Gardner CR, Walker RJ (1982) The roles of putative neurotransmitters and neuromodulators in annelids and related invertebrates. *Prog Neurobiol* 18:81-120
- Genedani S, Bernardi M, Ottoviani E, Franceschi C, Leung MK, Stefano GB (1994) Differential modulation of invertebrate hemocyte motility by CRF, ACTH, and its fragments. *Peptides* 15:203-206
- Gesser BP, Larsson LI (1986) Enkephalins may act as sensory transmitters in earthworms. *Cell Tissue Res* 246:33-37
- Golding DW, May BA (1983) Duality of secretory inclusions in neurons. Ultrastructure of the corresponding sites of release in invertebrate nervous system. *Acta Zool* 63:229-238
- Goodman EC, Iversen LL (1986) Calcitonin gene-related peptide: novel neuropeptide. *Life Sci* 38:2169-2178
- Görcs T, Liposits Zs, Palay SL, Chan-Palay V (1985) Serotonin neurons on the ventral brain surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7449-7452
- Grandpre T, Strittmatter SM (2001) Nogo: a molecular determinant of axonal growth and regeneration. *Neuroscientist* 7:377-386
- Guissi-Kadri S, Bulet P, Cury JJ (1990) Polypeptides related to mammalian procholecystinin in the brain of an invertebrate, a marine worm, *Nereis*

- diversicolor*: evidence from in Ovo translation of mRNA. *Gen Comp Endocrinol* 77:339-347
- Günther J (1971) Mikroanatomie des Bauchmarks von *Lumbricus terrestris* L. (Annelida, Oligochaeta). *Z Morphol Tiere* 70:141-182
- Günther J (1972) Giant motor neurons in the earthworm. *Comp Biochem Physiol* 42A:967-973
- Haller B (1889) Beiträge zur Kenntnis der Textur des Central-Nervensystems höherer Würmer. *Arb Zool Inst Univ Wien* 8:175-312
- Haller B (1910) Über das Bauchmark. *Jena Z Naturw* 46:591-632
- Hartenstein V (1997) Development of the insect stomatogastric nervous system. *Trends Neurosci* 20:421-427
- Hasenöhrl RU, De Souza-Silva MA, Nikolaus S, Tomaz C, Brandao ML, Schwarting RKW, Huston JP (2000) Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. *Neuropeptides* 34:272-280
- Herlant-Meewis H (1964) Regeneration in Annelids. *Adv Morphog* 4:155-215
- Hernádi L, Elekes K, S-Rózsa K (1989) Distribution of serotonin-containing neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. Comparison of immunocytochemical and 5,6-dihydroxytryptamine labelling. *Cell Tissue Res* 257:313-323
- Hernádi L, Erdélyi L, Hiripi L, Elekes K (2000) The possible roles of the monoaminergic system in the feeding of the snail *Helix pomatia*. *Acta Biol Hung* 51:177-187
- Hooper SL, Marder E (1987) Modulation of the lobster pyloric rhythm by the peptide proctolin. *J Neurosci* 7:2097-2112
- Hoyle CH (1999) Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Res* 27:848(1-2):1-25
- laboni A, Holman GM, Nachman RJ, Orchard I, Coast GM (1998) Immunocytochemical localization and biological activity of diuretic peptides in the housefly, *Musca domestica*. *Cell Tissue Res* 94:549-560
- Iino K, Sasano H, Oki Y, Andoh N, Shin RW, Kitamoto T, Takahashi K, Suzuki H, Tezuka F, Yoshimi T, Nagura H (1999) Urocortin expression in the human central nervous system. *Clin Endocrinol* 50(1):107-114
- Ikeda T, Minakata H, Nomoto K (1999) The importance of C-terminal residues of vertebrate and invertebrate tachykinins for their contractile activities in gut tissues. *FEBS-Lett* 461:201-204
- Iversen LL (1982) Substance P. *Br Med Bull* 38:277-282
- Iwanow P (1903) Die Regeneration von Rumpf- und Kopfsegmenten bei *Lumbricus variegatus* Gr. *Z Wiss Zool* 75:327-390
- Jamieson EGM (1981) The ultrastructure of the Oligochaeta. Academic Press, New York London
- Johnsen AH, Rehfeld JF (1990) Cionin: a disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*. *J Biol Chem* 265:3054-3058
- Johnsen AH, Rehfeld JF (1992) Identification of cholecystokinin/gastrin peptides in frog and turtle: evidence that cholecystokinin is phylogenetically older than gastrin. *Eur J Biochem* 207:419-428
- Johnsen AH, Rehfeld JF (1993) LymnaeDFamines, a new family of neuropeptides from the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Clue to cholecystokinin immunoreactivity in invertebrates? *Eur J Biochem* 213:875-879

- Jones DN, Kortekaas R, Slade PD, Middlemiss DN, Hagan JJ (1998) The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. *Psychopharmacology* 138(2):124-132
- Józsa R, Mess B (1993) Galanin-like immunoreactivity in the chicken brain. *Cell Tissue Res* 273:391-399
- Kaloustian KV (1986) Immunochemical evidence for ACTH-like immunoreactivity in tissues of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comp Biochem Physiol* 85A:351-353
- Kaloustian KV, Edmans JA (1986) Immunochemical evidence for substance P-like peptide in tissues of the earthworm *Lumbricus terrestris*: action on intestinal contraction. *Comp Biochem Physiol* 83C:329-333
- Kaloustian KV, Rzsasa PJ (1986) Immunochemical evidence on the occurrence of opioid- and gastrin-like peptides in tissues of the earthworm *Lumbricus terrestris*. In: Stefano G, Ed. Handbook of comparative opioid and related neuropeptide mechanisms. Boca Raton, FL: CRC Press
- Kerkut GA, Sedden CB, Walker RJ (1967) Cellular localization of monoamines by fluorescence microscopy in *Hirudo medicinalis* and *Lumbricus terrestris*. *Comp Biochem Physiol* 21:687-690
- Kobayashi M, Muneoka Y (1990) Structure and action of molluscan neuropeptides. *Zool Sci* 7:801-814
- Koob GF, Bloom FE (1985) Corticotropin-releasing factor and behavior. *Fed Proc* 44(1 Pt 2):259-263
- Koritsánszky S, Hartwig HG (1974) The regeneration of the monoaminergic system in the cerebral ganglion of the earthworm *Allobophora caliginosa*. *Cell Tissue Res* 151:171-186
- Kozicz T, Vigh S, Arimura A (1997) Axon terminals containing PACAP- and VIP-immunoreactivity form synapses with CRF-immunoreactive neurons in the dorsolateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Res* 767:109-119
- Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A (1998) Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 391(1):1-10
- Krajniak KG, Price DA (1990) Authentic FMRFamide is present in the polychaete *Nereis virens*. *Peptides* 11:75-77
- Krawany J (1905) Untersuchungen über das Zentralnervensystem des Regenwurms. *Arb Zool Inst Univ Wien* 15:281-316
- Krecker FH (1923) Origin and activities of the neuroblasts in the regeneration of microdrilous annelida. *J Exp Zool* 37:27-46
- Kristan WB, Nusbaum MP (1983) The dual role of serotonin in leech swimming. *J Physiol (Paris)* 78:743-747
- Kupfermann I (1991) Functional studies of cotransmission. *Physiol Rev* 71:683-732
- Larsson LI, Rehfeld, JF (1977) Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. *Nature* 269:335-338
- Lázár Gy, Liposits Zs, Tóth P, Trasti SL, Maderdrut JL, Merchenthaler I (1991) Distribution of galanin-like immunoreactivity in the brain of *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 310:45-67
- Lee, MC, Schiffman SS, Pappas, TN (1994) Role of neuropeptides in the regulation of feeding behavior: a review of cholecystokinin, bombesin, neuropeptide Y, and galanin. *Neurosci Biobehav Rev* 18:313-323

- Lengvári I, Csoknya M, Merchenthaler I, Hámori J (1992) Immunohistochemical study of the nervous system in earthworm (*Lumbricus terrestris* L). *Acta Biol Hung* 43:253-258
- Lenhossék M von (1892) Ursprung, Verlauf und Endigung der sensibeln Nervenfasern bei *Lumbricus*. *Arch Mikr Anat* 39:102-136
- Lent CM, Dickinson MH, Marshall CG (1989) Serotonin and leech feeding behaviour: obligatory neuromodulation. *Am Zool* 29:1241-1254
- Lenz HJ, Fisher LA, Vale WW, Brown MR (1985) Corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: effects on blood flow. *Am J Physiol* 249(1 Pt 2):R85-90
- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyás J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW (2001) Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7570-7575
- Lkhider M, Marcel R, Tramu, G (1987) Etablissement d'une carte des neurons du cerveau d'*Eisenia fetida* (Annelide, Oligochaète) contenant des substances immunologiquement apparentées à des peptides de vertébrés. *Gen Comp Endocrinol* 65:457-468
- Lundquist CT, Rökaus A, Nässel DR (1991) Galanin immunoreactivity in the blowfly nervous system: localization and chromatographic analysis. *J Comp Neurol* 312:77-96
- Marder E, Hooper SL, Siwicki KK (1986) Modulatory action and distribution of the neuropeptide proctolin in the crustacean stomatogastric nervous system. *J Comp Neurol* 243:454-467
- McCobb DP, Haydon PG, Kater SB (1988) Dopamine and serotonin inhibition of neurite elongation of different identified neurons. *J Neurosci Res* 19:19-26.
- Merchenthaler I (1984) Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides* 5 Suppl 1:53-69
- Merchenthaler I, López FJ, Negro-Vilar A (1993) Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol* 40:711-769
- Michaelsen W (1928) Oligochaeta. In: Kükenthal N and Krumbach T (Eds). *Handbuch der Zoologie 2: Vermes Polymera*. de Gruyter Leipzig
- Mizuhira V, Notoya M, Hasegawa H (1990) New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation. I. General remarks. *Acta Histochem Cytochem* 23:501-523
- Moore MR, Black PML (1991) Neuropeptides. *Neurosurg Rev* 14:97-110
- Murrain M, Murphy AD, Mills LR, Kater SB (1990) Neuron-specific modulation by serotonin of regenerative outgrowth and intracellular calcium within the CNS of *Helisoma trivolvis*. *J Neurobiol* 21:611-618
- Myhrberg HE (1967) Monoaminergic mechanisms in the nervous system of *Lumbricus terrestris* (L.). *Z Zellforsch* 81:311-343
- Nässel DR (1993) Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tissue Res* 273:1-29
- Nässel DR (1999) Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review. *Peptides* 20:141-158
- Nevmyvaka GA (1967) The nervous system of the earthworm (English translation). National Lending Library for Science and Technology, Boston

- Nicholls JG, Baylor DA (1968) Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *J Neurophysiol* 31:740-756
- Norris BJ, Calabrese RL (1987) Identification of motor neurons that contain FMRFamide-like peptide and the effect of FMRFamide on longitudinal muscle in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *J Comp Neurol* 266:95-111
- Notoya M, Hasegawa H, Mizuhira V (1990) New tissue fixation method for cytochemistry using microwave irradiation. II. Details. *Acta Histochem Cytochem* 23:525-536
- Ogawa F (1928) On the number of ganglion cells and nerve fibers in some of the ventral cords of the earthworm. I. The number of ganglion cells. *Sci Rep Tôhoku Univ* (4) 3:745-756
- Ogawa F (1930) On the number of ganglion cells and nerve fibers in some of the ventral cords of the earthworm. II. The number of nerve fibers. *Sci Rep Tôhoku Univ* (4) 5:691-716
- Okamoto S, Ishikawa I, Kimura K, Saito M (1998) Potent suppressive effects of urocortin on splenic lymphocyte activity in rats. *Neuroreport* 9(18):4035-4039
- Orchard I, Belanger JH, Lange AB (1989) Proctolin: A review with emphasis on insects. *J Neurobiol* 20:470-496
- O'Shea M, Schaffer M (1985) Neuropeptide function: the invertebrate contribution. *Annu Rev Neurosci* 8:171-198
- Otsuka M, Konishi S (1983) Substance P-the first peptide neurotransmitter? *Trends Neurosci* 62:317-320
- Ottoviani E, Caselgrandi E, Petraglia F, Franceschi C (1992) Stress response in the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata): interaction between CRF, ACTH, and biogenic amines. *Gen Comp Endocrinol* 87:354-360
- Ottoviani E, Franchini A, Caselgrandi E, Cossarizza A, Franceschi C (1994) Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: evolutionary evidence. *FEBS Lett* 351:19-21
- Parrott RF, Vellucci SV, Goode JA (2000) Behavioral and hormonal effects of centrally injected "anxiogenic" neuropeptides in growing pigs. *Pharmacol Biochem Behav* 65(1):123-129
- Peng HB, Chen Q, De Biasa S, Zhu D (1989) Development of calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in relationship to the formation of neuromuscular junctions in *Xenopus* myotomal muscle. *J Comp Neurol* 290:533-543
- Perroteau I, Danger JM, Biffo S, Pelletier G, Vaudry H, Fasolo A (1988) Distribution and characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the crested newt. *J Comp Neurol* 275:309-325
- Petrusz P, Merchenthaler I, Maderdrut JL, Heitz PU (1985) Central and peripheral distribution of corticotropin-releasing factor. *Fed Proc* 44(1 Pt 2):229-235
- Price DA, Greenberg MJ (1977) Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 197:670-671
- Regoli D, Boudon A, Fauchère J (1994) Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 46:551-599
- Remy C, Guy J, Pelletier G, Boer HH (1988) Immunohistological demonstration of a substance related to neuropeptide Y and FMRFamide in the cephalic and thoracic nervous system of the locust *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res* 254:189-195

- Remy C, Tramu G, Dubois MP (1982) Immunohistological demonstration of a CRF-like material in the central nervous system of the annelid *Dendrobaena*. *Cell Tissue Res* 227(3):569-575
- Retzius G (1892) Das Nervensystem der Lumbriciden. *Biol Untersuch N F* 3:1-16
- Richardson RD, Boswell T, Woods SC, Wingfield JC (2000) Intracerebroventricular corticotropin-releasing factor decreases food intake in white-crowned sparrows. *Physiol Behav* 71(1-2):213-216
- Roberts MH, Moore RY (1987) Localization of neuropeptides in efferent terminals of the eye in the marine snail *Bulla gouldiana*. *Cell Tissue Res* 248:67-73
- Roberts MH, Speh JC, Moore RY (1989) The central nervous system of *Bulla gouldiana*: peptide localization. *Peptides* 9:1323-1334
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene with tissue-specific RNA processing. *Nature* 304:129-135
- Rökæus A (1987) Galanin: a newly isolated biologically active neuropeptide. *Trends Neurosci* 10:158-167
- Samanin R, Garattini S (1996) Pharmacology of ingestive behavior. *Therapie* 51:107-115
- Sasayama Y, Katoh A, Oguro C, Kambegawa A, Yoshizawa H (1991) Cells showing immunoreactivity for calcitonin or calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the central nervous system of some invertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 83:406-414
- Scharrer B (1978) Peptidergic neurons: facts and trends. *Gen Comp Endocrinol* 34:50-62
- Scharrer B (1987) Neurosecretion: beginnings and new directions in neuropeptide research. *Ann Rev Neurosci* 10:1-17
- Simon TW, Calabrese RL (1990) FMRFamide reduces a delayed outward current in leech heart interneurons. *Soc Neurosci Abst* 16:793
- Siwicky KK, Beltz BS, Kravitz EA (1987) Proctolin in identified serotonergic, dopaminergic and cholinergic neurons in the lobster, *Homarus americanus*. *J Neurosci* 7:522-532
- Siwicky KK, Bishop CA (1986) Mapping of proctolin-like immunoreactivity in the nervous system of lobster and crayfish. *J Comp Neurol* 243:435-453
- Slominski A, Roloff B, Curry J, Dahiya M, Szczesniowski A, Wortsman J (2000) The skin produces urocortin. *J Clin Endocrinol Metab* 85(2):815-823
- Sonetti D, Lusvardi C, Fasolo A (1990) Immunohistochemical localization of some vertebrate-like neuropeptides (SP, NPY, CGRP, CCK) in the central nervous system of the freshwater snail *Planorbarius corneus*. *Cell Tissue Res* 260:435-448
- Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W (1981) Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(10):6517-6521
- Spörhase-Eichmann U, Gras H, Schürmann FW (1987a) Patterns of serotonin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. I. Ganglia of the ventral cord. *Cell Tissue Res* 249:601-614
- Spörhase-Eichmann U, Gras H, Schürmann FW (1987b) Patterns of serotonin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. II. Rostral and caudal ganglia. *Cell Tissue Res* 249:625-632

- Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cucullis JJ, Meyer HG (1970) The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish-peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochaetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333
- Tatemoto K (1982) Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5485-5489
- Tatemoto K, Rökaeus A, Jörnvall H, McDonald TJ, Mutt V (1983) Galanin- a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164:124-128
- Tazaki K, Tazaki Y (2000) Multiple motor patterns in the stomatogastric ganglion of the shrimp *Penaeus japonicus*. *J Comp Physiol (A)* 186:105-118
- Turnbull AV, Rivier C (1997) Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Exp Biol Med* 215(1):1-1
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213(4514):1394-1397
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378(6554):287-292
- Verhaert P, Marivoet S, Vandesande F, De Loof A (1984) Localization of CRF immunoreactivity in the central nervous system of three vertebrate and one insect species. *Cell Tissue Res* 238(1):49-53
- Vrontakis ME, Torsello A, Friesen HG (1991) Galanin. *J Endocrinol Invest* 14:785-794
- Walker RJ (1992) Neuroactive peptides with RFamide or Famide carboxyl terminal. *Comp Biochem Physiol (C)* 102:213-222
- Walsh JH (1994) Gastrointestinal hormones. In: Johnson LR, Ed. Physiology of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press
- Wank SA (1995) Cholecystikinin receptors. *Am J Physiol* 269:628-646
- Waschek JA (2002) Multiple actions of pituitary adenylyc cyclase activating polypeptide in nervous system development and regeneration. *Dev Neurosci* 24:14-23
- Weiger WA (1997) Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol Rev* 72:61-95
- Yulis CR, Lederis K, Wong KL, Fisher AW (1986) Localization of urotensin I- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the central nervous system of *Catostomus commersoni*. *Peptides* 7(1):79-86
- Zaidi M, Breimer LH, MacIntyre I (1987) Biology of peptides from the calcitonin genes. *Q J Exp Physiol* 72:371-408
- Zamboni L, Martino L de (1967) Buffered picric acid-formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. *J Cell Biol* 35:148A
- Zimmermann P (1971) Die Zentralnervöse Kontrolle der Dehydration bei *Lumbricus terrestris* L. *Z Zellforsch* 112:551-571

VI. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

- Lengvári I, Csoknya M, **Lubics A**, Szelier M, Hámori J (1994) Proctolin immunoreactive elements in the nervous system of earthworm. *Acta Biol Hung* 45:337-345
- Reglődi D, Slezák S, **Lubics A**, Szelier M, Elekes K, Lengvári I (1997) Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of *Lumbricus terrestris*. *Cell Tissue Res* 288:575-582
- Reglődi D, **Lubics A**, Slezák S, Szelier M, Lengvári I (1997) Substance P immunoreactive elements in the nervous system of earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Acta Biol Hung* 48:189-200
- Lubics A**, Reglődi D, Slezák S, Szelier M, Lengvári I (1997) Colocalization of serotonin and FMRFamide-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida*. *Acta Histochem* 99:459-467
- Reglődi D, **Lubics A**, Szelier M, Lengvári I (1997) Serotonin immunoreactivity in the peripheral nervous system of Oligochaeta. *Acta Biol Hung* 48:439-451
- Reglődi D, **Lubics A**, Szelier M, Balásperi L, Lengvári I (1998) Galanin-like immunoreactivity in the nervous system of Oligochatea. *Eur J Anat* 2:141-146
- Reglődi D, **Lubics A**, Szelier M, Lengvári I (1999) Gastrin- and cholecystokinin-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm. *Peptides* 20:569-577
- Lubics A**, Reglődi D, Szelier M, Lengvári I (2002) Time course of the regeneration of the earthworm cerebral ganglion with special reference to the serotonergic elements. *Eur J of Anat (közlésre elfogadva)*
- Lubics A**, Reglődi D, Szelier M, Lengvári I, Kozicz T (2002) Comparative distribution of Urocortin- and CRF-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris*. (közlésre elküldve) *Peptides*

VII. ELŐADÁSKIVONATOK, POSZTEREK

- Lubics A**, Reglődi D, Slezák S, Szelier M, Lengvári I (1996) Coexistence of serotonin and FMRFamide-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Neurobiol* 4:158
- Lubics A**, Reglődi D, Slezák S, Szelier M, Lengvári I. Coexistence of serotonin and FMRFamide-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida*. European Neuropeptide Club 6th Annual Meeting, Pécs (1996)
- Lubics A**, Reglődi D, Slezák S, Szelier M, Lengvári I. Serotonin és FMRFamid kolokalizáció *Eisenia fetida* idegrendszerében. Magyar Idegtudományi Társaság IV. Konferenciája, Gödöllő (1997)
- Reglődi D, **Lubics A**, Szelier M, Lengvári I. Cholecystokinin immunreaktivitás Oligochaeták idegrendszerében. Magyar Anatómus Társaság IX. Konferenciája, Szeged (1997).
- Reglődi D, Lakatos A, **Lubics A**, Berki T, Szeberényi J, Szelier M, Lengvári I (1998) Gastrin immunoreactivity in the nervous system of Annelida. (Abstract) *Eur. J. Neurosci* 10 (Suppl. 10): 231
- Reglődi D, **Lubics A**, Szelier M, Lengvári I. Serotonin immunreaktivitás Oligochaeták perifériás idegrendszerében. Magyar Idegtudományi Társaság V. Konferenciája, Debrecen (1998)
- Lakatos A, Reglődi D, **Lubics A**, Berki T, Szelier M, Lengvári I. Gastrin immunreaktivitás Oligochaeták idegrendszerében. 28. Membrane-transport conference, Sümeg (1998)
- Reglődi D, Lakatos A, **Lubics A**, Berki T, Szeberényi J, Lengvári I. Gastrin immunoreactivity in the nervous system of Oligochaeta. Forum of European Neuroscience, Berlin (1998)
- Lubics A**, Reglődi D, Tamás A, Szelier M, Lengvári I. Regeneration of the serotonergic elements after removal of the cerebral ganglion in *Eisenia fetida*. Magyar Idegtudományi Társaság VIII. Konferenciája, Szeged (2001)

VIII. EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Lubics A, Sebők B, Havass Z, Schneider I (2000) Endogenous ochronosis (Alkaptonuria). *Arch Dermatol* 136: 548-550

Reglődi D, Somogyvári-Vigh A, Németh J, **Lubics A**, Józsa R, Jakab B, Tamás A, Rábl K, Gábrriel R, Toller G, Meggyesi R, Weiland V, Lengvári I, Arimura A (2001): Comparative distribution of PACAP and VIP in the nervous system of vertebrate and invertebrate species. *Regul Peptides* 102:64

Németh J, Jakab B, Reglődi D, **Lubics A**, Józsa R, Tamás A, Lengvári I, Görcs T, Szolcsányi J (2001): Distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. *Regul Peptides* 102:62.

Németh J, Jakab B, Reglődi D, **Lubics A**, Józsa R, Hollósy T, Tamás A, Lengvári I, Görcs T, Szolcsányi J (2002) Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. *Regul Peptides* (közlésre elfogadva)

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindennek előtt dr. Lengvári István egyetemi docensnek, aki diákköri témavezetőként először vezetett be a neurohisztológiai kutatómunkába, s aki velem ezt a tevékenységet olyannyira megkedveltette, hogy azt foglalkozásul választottam, és aki azóta is irányítja a kutatómunkámat.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá dr. Reglődi Dórának, akivel pályakezdésem óta egy munkacsoportban dolgozom, és akivel a kísérletes munka nagy részét közösen végeztük.

Ugyancsak köszönettel tartozom Szelier Mártának precíz asszisztensi munkájáért, valamint az immunhisztológiai módszerek elsajátításában nyújtott segítségéért.

Ezen túlmenően köszönettel tartozom dr. Sétáló György Professzor Úrnak, valamint az Anatómiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik hozzájárultak az alkotó munkát elősegítő légkör kialakításához.