

OLIGOCHAETA FAJOK IDEGRENSZERÉNEK IMMUNHISZTOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Lubics Andrea

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet**

Pécs, 2002

**Témavezető: Dr. Lengvári István egyetemi docens
Programvezető: Dr. Sétáló György egyetemi tanár**

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. Ezen klasszikus leírásokból vált ismertté a földigiliszta idegrendszerének fénymikroszkópos szerkezete. A gyűrűsférgék regenerációs képességét is számos, ma már klasszikusnak tekinthető vizsgálatban tanulmányozták. Jól ismert ugyanis az a tény, hogy ezen állattörzs egyedei a test elülső vagy hátsó szegmentumainak elvesztésekor az amputáció helyétől és mértékétől függően igen nagyfokú regenerációra képesek, beleértve az idegrendszer regenerációját is.

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 viszonylagos leírását. 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 szelvényvel, ami további hasznos információkkal szolgálhat.

Az említett klasszikus leírások alapján a földigiliszta idegrendszere a következőképpen vázolható. Az idegrendszer központi részét képezi az agy (suprapharyngealis vagy cerebralis ganglion), a hasdúclánc (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, bilaterálisan szimmetrikus félre osztott. Elülső széléből mindkét oldalon 1-1

idegnyaláb ered (prostomialis idegek), melyek az állat feji részének beidegzését végzik. A hasdúclánc ventralisan, a bőrizomtömlő 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. A garatconnectivumok masszív idegrostkötegek, melyek az agy oldalsó-elülső részén erednek, majd a garatot kétoldról körülfogva lefelé és kicsit hátrafelé haladva lépnek be kétoldról 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.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Mivel a dúcok teljes leírásához az ismertett fénymikroszkópos leírás nem elegendő, munkánk fő célja a központi és perifériás idegrendszer neurokémiai feltérképezése volt, vagyis annak megállapítása, hogy milyen neurotranszmitterek, ill. neuromodulátorok fordulnak elő a vizsgált Oligochaeta fajok idegelemeiben. A monoaminok közül a gerinctelenek körében széles körben elterjedt és általános transzmitterként működő serotonin eloszlását vizsgáltuk. A neuropeptidok közül részletes morfológiai leírást kívántunk adni a proctolin, substance P (SP), FMRF amid, galanin, gastrin, cholecystokinin (CCK), calcitonin-gene related peptide (CGRP), neuropeptid Y (NPY), corticotrop-releasing faktor (CRF) és urocortin immunpozitív idegsejtek és idegrostok eloszlásáról.

2. Sorozatmetszeteket vizsgálva kvantitatív méréseket is terveztünk, melyek magukba foglalják a sejtszámlálást, a sejtek méretének vizsgálatát és egy háromdimenziós számítógépes rekonstrukciót is.

3. Biogén aminok és neuropeptidok együttes előfordulása (kolokalizációja) ugyanazon neuronon belül a gerincesek mellett már gerinctelenekben is bizonyított. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a serotonin immunpozitív neuronok tartalmazzák-e a feltérképezett neuropeptidok valamelyikét.

4. A földigiliszta intakt idegrendszerének immunhisztológiai vizsgálata alapját képezte a regenerálódó idegszövet tanulmányozásának, ami a hiányzó irodalmi adatok miatt mindenképpen célszerűnek látszott. Ezen vizsgálatok segítséget nyújthatnak továbbá magasabbrendűek regenerációs folyamatainak megértéséhez, valamint a regenerációs folyamatokban szerepet játszó neuropeptidok funkcióinak tisztázásához. Nagyobb szabású, az idegrendszer regenerációjával foglalkozó vizsgálataink első részében azt igyekeztünk felmérni, hogy a regenerálódott idegrendszer mennyiben azonos az eltávolított idegrendszerrel. Ilyen vonatkozásban a gyűrűsféreg különösen alkalmas modellnek tekinthető, 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 gyűrűsféreg legáltalánosabban előforduló transzmittere. Az idegszövet markereként ilyen megfontolásból a serotonint használtuk.

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok. Az idegrendszer neurokémiai feltérképezését ivarérett földigilisztákon (*Lumbricus terrestris* Linnae, *L. terrestris*), a kolokalizációs, valamint a regenerációs vizsgálatokat trágyagilisztákon (*Eisenia fetida* Savigny, *E. fetida*) végeztük. 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.

Mintavétel. Sztereomikroszkóp alatt éles pengével az állatok első 6-8 szelvényét távolítottuk el, ill. további 4-5, reprezentatív szelvényeket tartalmazó darabokat vágunk ki. 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 végezhesünk. A kolokalizációs vizsgálatokhoz minden egyes frontalis síkú metszetet alternálva rögzítettünk 2 sorozat tárgylemezen.

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 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. A kolokalizációs vizsgálatok során az immunfestést úgy végeztük, hogy az alternáló metszetsorozatokat egyikét serotonin, a másikat pedig valamelyik neuropeptid antiszérummal festettük meg párhuzamosan. A metszetek egy részét immunfluoreszcens technikával vizsgáltuk. A metszeteket ebben az esetben is először trypsin oldattal kezeltük, majd a nem-specifikus háttérfestődést 5%-os szamár szérummal (30 perc). A primer antiszérummal (poliklonális CRF, ill. urocortin antitest) szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk a metszeteket, melyet normál szamár 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.

Értékelés. 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. Minden esetben elvégeztük az immunfestés kontrolljait. A primer antiszérum elhagyását, illetve kihígítását követően nem láttunk immureaktivitást (módszer specifitás), az ilyenkor jelentkező esetleges festést (pl. vér, pigment) természetesen nem tekintettük pozitívnak. Nem kaptunk festődést a specifikus savó preabszorpció, valamint kimerítéses próbáját követően sem (immunológiai specifitás).

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. 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 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. Tájékozódási 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. A további feldolgozást a háromdimenziós rekonstrukció jelentette. Ehhez a "Neurolucida for Windows" elnevezésű programot használtuk. A metszeteket egymástól 20 μm távolságban rajzoltuk le, és egymás után illesztve a képeket egy szabadon forgatható, térbeli

képet kaptunk. 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.

Az idegrendszer regenerációjának vizsgálata során operációs mikroszkóp alatt távolítottuk el a megfelelő idegrendszeri részeket: a cerebralis gangliont a 3-4. szelvények között ejtett kis metszésből vettük ki. A ventralis dúccokat a hasi oldal felől tártuk fel, és a műtét céljától függően eltávolítottuk a garatalatti dúcot vagy az ennek caudalis folytatásába eső 2-3 szegmentális dúcot. 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. Az agyeltávolításon átesett és túlélő giliszták első 6 szegmentumát (mely tartalmazza a subesophagealis gangliont is) vágtuk le, a regenerálódott hasdúclánc vizsgálatához pedig a műtési 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, a primer antiszérum a serotonin volt, amit az idegrendszer globális markereként használtunk.

EREDMÉNYEK

Eredményeink alapján a földigiliszta idegrendszere neurokémiai szempontból a következőképpen jellemezhető:

Központi idegrendszer

A cerebralis ganglion rostralis részén az immunpozitív idegsejtek a dorsalis sejtköpeny medialis, dorsomedialis, dorsolateralis, valamint lateralis részén helyezkednek el. Medialisan, ill. dorsomedialisan serotonin, proctolin, SP, FMRFamid, gastrin és galanin, dorsolateralisan és lateralisán az említetteken kívül még CCK, urocortin és CRF immunreaktív idegsejtek is. Elszórtan előfordulnak proctolin, SP, FMRFamid, valamint CRF immunpozitív sejtek az agy centrális és ventralis részén is, de ezek a sejtek nem rendeződnek meghatározott csoportokba. 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. NPY, valamint CGRP tartalmú idegelemeket az agyban nem találtunk.

Az agy 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 földigilisza agyának klasszikus neuroszekréción sejtjeire hasonlítanak. 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. A neuropil haránt irányban futó immunreaktív axonokat tartalmaz, melyek helyenként varikozitást is mutatnak. Az idegrostok egy része a circumpharyngealis connectivumba lép be. A serotoninon kívül proctolin, FMRFamid, CRF, urocortin valamint a gastrin ellenes antiszérumok jól kirajzolják a neuropil rosthálózatát. A SP, galanin, CCK antisavókkal halványan, a NPY és CGRP ellenanyagokkal megfestve a metszeteket pedig egyáltalán nem festődik a neuropil.

A circumpharyngealis connectivumokban serotonin, CRF, urocortin, CCK, FMRFamid valamint SP immunpozitív rostokat találunk, melyek egy része a garatgyűrűvel kapcsolatban álló stomatogastricus dúcok felé, más részük pedig a subesophagealis ganglion irányában fut tovább. A többi antiszérummal a connectivumokban nem tudunk rostokat kimutatni.

A subesophagealis ganglionban az immunpozitív neuronok a ganglion ventralis és lateralis részét foglalják el, mindkét oldalon medialis, ventromedialis, ventrolateralis valamint lateralis sejtcsoportokat kialakítva. Az immunpozitív sejtek minden sejtcsoportban megtalálhatók. A sejtek nagysága 25-30 μm , alakjuk változó. Gyakran látunk répa vagy körte alakú sejttesteket, melyekből 1 vagy 2 nyúlvány indul ki. A sejtek más részénél nem látható az axon, a perikaryon pedig gyakran kerek vagy ovális. A sejtek által körbefogott centrális neuropil jól megfestődött az antiszérumok nagy részével, gyengébben a gastrin, galanin, NPY valamint CGRP antiszérumokkal. A dúc caudalis részén megjelenő dorsalis óriásaxonok körül longitudinalisan futó idegrostok egy része proctolin, gastrin, ill. CGRP immunpozitív.

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. A centrális neuropil az antiszérumok egy részével (serotonin, FMRFamid, proctolin, galanin, urocortin, CRF) intenzív festődést mutat varikozitásokkal, a többi esetben (SP, CCK, gastrin, NPY, CGRP). Az óriásaxonok körül gyakran láthatók CCK, gastrin, CGRP pozitív, longitudinalis lefutású idegrostok. Kvantitatív vizsgálataink eredményeit az alábbi táblázat foglalja össze:

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

Kolokalizációs vizsgálatok. Az agyban a kolokalizációt mutató sejtek száma relatíve alacsony. Az agy dorsomedialis és lateralis 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 subesophagealis ganglionban a serotonin és FMRFamid együttesen 8-18 sejtben van jelen, melyek ventromedialisan 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. A lateralisak kerek vagy ovális alakú kisebb

sejtek (15-25 μm), nyúlványuk nem vagy csak rövid szakaszon látható. A serotonin és CCK immunpozitív sejtek a dúc medialis, ventromedialis vagy lateralis részén található, 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.

A ventralis ganglionokban a serotonint és FMRFamidot tartalmazó sejtek száma dúconként 7-13. Ezek lokalizációja, mérete és alakja hasonló a garatalatti dúcban található sejtekéhez. Serotonint és CCK-t együttesen tartalmazó sejt dúconként 5-6 fordul elő, míg gangliononként 1-1 olyan idegsejt látható, ami serotonin és galanin tartalmú. Serotonin-gastrin kolokalizáció a ventralis dúcokban sem fordul elő.

Perifériás idegrendszer

A szegmentális idegek A NPY és a CGRP kivételével mindegyik antiszérummal intenzíven megfestődtek, számos varikozitást mutatva. A rostok végződéseit ritkán lehet látni, néhány esetben a bélfonatban, a vesecsatornákban, vagy a bőrizomtömlőben követhetők. A cerebralis ganglionból eredő prostomialis idegek - melyek sűrűn elágazódva az állat elülső része felé haladnak - SP, serotonin, FMRFamid, CRF, urocortin valamint CCK immunpozitívak. A fő ágak csaknem minden metszetben megfestődtek, és gyakran kisebb ágak is.

A bőrizomtömlő izomrétegében jelentős mennyiségű serotonin, proctolin, FMRFamid, galanin, valamint CGRP immunpozitív idegrost van jelen, különösen a külső körkörös, és a belső hosszanti izomréteg között. Vékony rostok figyelhetők meg az izomrostok között is mindkét izomrétegben, melyek a testfal subepidermalis fonatával állnak kapcsolatban. A festődés intenzitása az állat caudalis vége felé haladva csökken. A kültakaró hámsejtjeinek egy része proctolin, SP, FMRFamid, galanin, CCK és gastrin immunpozitív. 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. Helyenként a sejtek csillói és subepidermalis nyúlványai is immunreaktívak. Subepidermalis immunpozitív idegfonat főleg az első szegmentumok ventralis részén látható, ami kapcsolatban van a hám alatti izomzatban levő fonattal, valamint a prostomialis és szegmentális

idegek ágaival. Ezek az immunpozitív rostok körülveszik a sertéket, és valószínűleg beidegzik az ezeket körülvevő izomrostokat is.

Bélidegrendszer. A bélcsatorna minden része tartalmaz immunpozitív idegelemeket, leginkább a CCK, galanin, gastrin, FMRFamid és serotonin immunreaktivitás kifejezett. A stomatogastricus ganglionokban nagy számú proctolin, SP, valamint néhány CCK, gastrin illetve FMRFamid pozitív ganglionsejtet, valamint a garatfal felé futó immunpozitív rostokat is láthatunk, melyek serotonin és galanin antiszérumokkal is festődtek. A bélfal nyálkahártyájában, submucosájában, valamint izomrétegében az emésztőcsatorna teljes hosszában végig megfigyelhető serotonin, galanin, CCK, FMRFamid, urocortin és gastrin immunpozitív idegfonat, valamint galanin, CCK, gastrin és SP immunpozitív idegsejtek. 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.

A cerebralis ganglion regenerációja

A metszésnek megfelelő szövethiányt az első postoperatív napon sarjszövet zárja le, a felszíni hám regenerációja pedig a 3. napon történik meg. A bőrízomtömlő csak később, a 7. nap körül épül fel. A cerebralis ganglion helyét hegyszövet 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. A rostok részben előrefelé haladva az agy rostralis részét rajzolják ki, részben a két oldalról egymás felé haladó rostok a középvonalban kereszteződnek. A 6. napon varikozitásokat is fel lehet fedezni a rosthálózatban, majd a 10. napra az agy helyén egy rostokkal teljesen átszőtt szövetet figyelhetünk meg, amely kirajzolja az agy centrális részét elfoglaló neuropilt. Ezzel a folyamattal párhuzamosan módosul a garatfal serotonerg beidegzése. A cerebralis dúc eltávolítását követően kifejezett serotonin immunpozitivitás észlelhető a garatfal dorsalis részén, míg a ventralis oldalon nincs festődés. Az 5. naptól kezdődően a dorsalis garatfalból serotonerg idegrostok követhetők a regenerálódó agyszövetbe, 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 figyelhető meg serotonerg rostok. Az első idegsejtek relatíve későn, az agy eltávolítását követő 25. napon jelennek meg először caudalisan, a connectivumok eredéséhez közel, majd a dorsalis sejtköpenyben. A neuronok nagy része caudalisan, a connectivumok eredése körül helyezkedik el. Jóval korlátozottabb számban találunk sejteket a cerebralis dúc rostralis részén a dorsalis sejtzónában, ami intakt agy esetében a neuronok leggyakoribb előfordulási helye. Elvértve centrálisan is található idegsejtek. A serotonin immunpozitív neuronok száma fokozatosan nő, és a regeneráció 70. napjára megközelíti az intakt állatra jellemző értéket. A cerebralis dúcot körülvevő tok a 40. napra válik teljessé, kialakítva az agy végleges formáját. A cerebralis 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.

MEGBESZÉLÉS

Az idegrendszer neurokémiai feltérképezése

A földigiliszta idegrendszerében 10 féle neuropeptid-szerű anyag, valamint serotonin jelenlétét mutattuk ki immunhisztokémiaiilag 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 FMRFamid-ot 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.

Az immunpozitív sejtek eloszlásának és morfológiai jellemzőinek megfelelően, valamint *Lumbricus*-idegrendszer térképek felhasználásával levonhatók bizonyos következtetések ezen sejtek azonosítására és lehetséges szerepükre vonatkozóan. Az immunpozitív sejtek morfológiai jellemzőinek változatossága arra utal, hogy a

vizsgált neuropeptidok sokféle típusú idegsejtben fordulnak elő. Az általunk vizsgált neuropeptidok a következő folyamatokban játszhatnak szerepet földigilisztában.

1. Központi integráló folyamatok. A cerebrális dúc dorsalis sejtkefényében a lateralis sejtcsoporth sejtjei a garatalatti dúcot az aggyal összekötő interneuronoknak tekinthetők. A lateralis sejtek caudalisabban, a connectivumok eredésénél elhelyezkedő csoportját, valamint a dorsomedialis sejteket a connectivumba leszálló axon jellemzi, ezek valószínűleg projekciós interneuronok. A ventralisan és centrálisan elszórtan elhelyezkedő sejtek pedig lokális interneuronok lehetnek. A subesophagealis dúcban és a ventralis ganglionokban többféle típusú interneuron is megfestődött az általunk használt antiszérumokkal. Rostrálisan a ventromedialis immunpozitív sejtek egy része ventralis nagy, szegmentális interneuron lehet. A caudalisan fekvő ventromedialis és lateralis sejtek polisegmentális interneuronoknak felelhetnek meg. A kisebb lateralis szómák valószínűleg kis interneuronok, és az immunreaktív sejtek 50-80%-át teszik ki. Az utóbbi sejtcsoporthban 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 immunpozitívok) egy része lokalizációja alapján szintén megfelelhet kis interneuronnak. A neuropil kifejezett festődése, valamint a varikozitások jelenléte a dúcokban szintén utalnak ezen neuropeptidok központi kapcsoló szerepére.

2. Izomműködés szabályozása. A cerebrális és subesophagealis ganglionokban, valamint a hasdúcláncban az általunk kimutatott immunpozitív sejtek között valószínűleg motoneuronok is vannak. 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 gyűrűsféreg izomösszehúzására van hatása. A serotoninnal kolokalizáló peptidok neuromodulátorként valószínűleg a serotonin aktivitást módosítják, de egyéb moduláló és/vagy transzmitter funkciójuk is lehet. Az óriásrostok körüli immunpozitív neuropil, valamint immunpozitív óriásrost-perikaryonok jelenléte alapján feltételezhetően az óriásaxon által közvetített motoros válasz szabályozását is befolyásolhatják a feltérképezett neuropeptidok, ill. a serotonin. A prostomialis idegekben, annak kisebb ágaiban, és a bőrizomtömlő körkörös és hosszanti izomrétege között is mutattunk ki immunpozitív rostokat, melyek mindkét

izomrétegbe adnak le ágakat. Az immunreaktív rostok és az izomzat között fennálló szoros kapcsolat utalhat ezen peptidek izomösszehúzóds szabályozásában betöltött szerepére földigilisztában.

3. Emésztőrendszer szabályozása. 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 immunpozitiv rostok részben intrinsic eredetűek. Ezt valószínűsíti az a tény is, hogy a gyűrűsférges bélcsatornája a központi idegrendszer aktivitástól függetlenül működő koordinált mozgásmintázatot mutat, amit lokális idegsejtek szabályozhatnak. Nem lehet azonban kizárni az immunpozitiv rostok extrinsic eredetét sem, mivel a stomatogastricus dúcok nagy számú proctolin, SP, CCK, gastrin, FMRFamid immunreaktív sejtet tartalmaznak, a serotonerg idegek pedig főleg a hasdúclánból erednek. Eredményeink alátámasztják az immunreaktív idegelemek kettős, azaz intestinalis (intramuscularis, submucosus, subepithelialis) és idegszöveti lokalizációját, ami a gerincesekben a peptidhormonok jellemző előfordulása. Az általunk vizsgált neuropeptidok bélidegrendszerben való jelenléte alapján feltételezhetjük, hogy ezek a neuropeptidok is szerepet játszhatnak a bélcsatorna motilitásának, valamint szekrécións aktivitásának szabályozásában, főleg a bélcsatorna proximális részén, ahol a legtöbb immunpozitiv idegelem található.

4. Védekezési reakciók szabályozása. A stresszjelenségek a gerinctelenek körében is előfordulnak. A földigiliszta a stresszhatásokra különféle reflex mechanizmusokkal válaszol, melyek közül jól ismert az óriásaxonok által kiváltott hirtelen bőrízomtömlő-kontrakció. Az érzőingerület feldolgozásán, valamint a motoros válasz összehangolásán kívül azonban a stresszre adott válaszreakció immunválaszokat is magába foglal, melyek szabályozásában a gerincesekhez hasonlóan neuropeptidok is részt vesznek. A CRF, ill. az urocortin immunpozitiv neuronoknak szerepük lehet a neuroimmunválasz kialakításában földigilisztában. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a földigiliszta központi idegrendszerében jelen van az ACTH, 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, melyek kapcsolatba hozhatók tapintási, kémiai és fényingerek felvételével. A subepidermalis idegfonat valószínűleg

érzőfonat, amit az érzékhámsejtek nyúlványai hoznak létre. Az érzékhámsejtek valamint a subepidermális fonat kifejezett festődése alapján feltételezhető a kimutatott neuropeptidok (proctolin, SP, FMRFamid, galanin, CCK, gastrin) szerepe az Oligochaeták szenzoros folyamataiban. Ezt a feltételezést támasztja alá a serték körüli finom rostok festődése is.

A fent említett adatok alapján 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 földigiliszta idegrendszerének neurokémiai feltérképezése alapjául szolgálhat további kolokalizációs valamint összehasonlító vizsgálatoknak. Elősegíti ezenkívül a számos élettani folyamatot szabályozó neuronális hálózatok azonosítását, ill. a feltérképezett neuropeptideknek az idegrendszer regenerációjának szabályozásában betöltött szerepének meghatározását földigilisztában.

A cerebralis ganglion regenerációja

Az agy serotonerg rendszere elsősorban a connectivumokból regenerálódik, de 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. Ennek alapján nem zárható ki, hogy a cerebralis ganglion egy kis része a garat falából regenerálódik. A regenerálódó cerebralis ganglion felépítő idegsejtek eredete nem tisztázott. Keletkezhetnek (i) az intakt ventralis ganglionok hám alatti differenciálatlan sejtjeiből, (ii) a kötőszövetes tokok mesodermális sejtjeiből vagy (iii) a garatfal hámelemeiből. A subesophagealis ganglionban megfigyelt hiperszekréciónak 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.

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*. **Peptides** (közlésre elfogadva)

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)

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)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenekelőtt dr. Lengvári István egyetemi docensnek, aki diákköri témavezetőként először vezetett be a neurohisztológiai kutatómunkába, s aki velem ezt a tevékenységet annyira 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.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet mondok Szüleimnek és Férjemnek, akik lehetőséget adtak és biztosítottak munkámhoz.