

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

**A szenzoros rendszer szerveződése *Oligochaeta*
gyűrűsférgekben**

PhD értekezés

Kiszler Gábor

PÉCS, 2012

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

A szenzoros rendszer szerveződése Oligochaeta gyűrűsférgekben

PhD értekezés

Kiszler Gábor

Témavezető:
Dr. Molnár László
egyetemi docens

Témavezető aláírása

Iskolavezető aláírása

PÉCS, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
1.1. A SZENZOROS RENDSZER JELENTŐSÉGE	5
1.2. A GYŰRŰSFÉRGEK IDEGRENSZERE.....	8
1.2.1. A központi idegrendszer.....	9
1.2.2. A környéki idegrendszer	14
2. CÉLKITŰZÉS	23
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
3.1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK TARTÁSA ÉS ELŐKÉSZÍTÉSE	25
3.2. PÁLYAJELÖLÉSEK.....	25
3.2.1. DiI-töltés.....	26
3.2.2. Lucifer yellow-töltés.....	27
3.3. GABA IMMUNHISZTOKÉMIA	28
3.3.1. Pre-embedding immunhisztokémia.....	28
3.3.2. Post-embedding immunhisztokémia	29
3.4. SZKENNING ELEKTRONMIKROSKÓPIA	29
3.5. ÁTTEKINTŐ ÉS IMMUN-ELEKTRONMIKROSKÓPIA	29
3.6. AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE.....	30
4. EREDMÉNYEK	31
4.1. AZ ÉRZÉKSZERVEK ELOSZLÁSI MINTÁZATÁNAK MEGHATÁROZÁSA.....	31
4.1.1. Érzékszervek felszíni vizsgálata	31
4.2. SZENZOROS RENDSZER VIZSGÁLATA PÁLYAJELÖLÉSEL.....	36
4.2.1. DiI-töltések eredményei.....	36
4.2.1.1.1. A prosztómium és az orális régió (1-3. testszelvény)	36
4.2.1.1.2. A középdarab és a testvég	37
4.2.2. Lucifer yellow-töltések eredményei	44
4.3. ULTRASTRUKTÚRÁLIS VIZSGÁLATOK	47
4.3.1. Konvencionális elektronmikroszkópia	47
4.4. GABA-IMMUNREAKTIVITÁS A SZENZOROS RENDSZERBEN	51
4.4.1. Fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémia	51
5. DISZKUSSZIÓ	67
5.1. AZ ÉRZÉKSZERVEK SZERVEZŐDÉSE A TESTFALBAN	67
5.2. A SZENZOROS RENDSZER SZERVEZŐDÉSE.....	69
5.3. GABA-IMMUNREAKTIVITÁS AZ <i>EISENIA FETIDA</i> ÉS A <i>LIMNODRILUS HOFFMEISTERI</i> SZENZOROS RENDSZERÉBEN.....	72
6. ÖSSZEFOGLALÁS	75
7. SUMMARY	76
8. IRODALOMJEGYZÉK	77
9. PUBLIKÁCIÓK	83
9.1. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	83
9.2. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK JEGYZÉKE.....	83
9.3. EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	84
9.4. EGYÉB KONFERENCIA ELŐADÁSOK JEGYZÉKE	84
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86

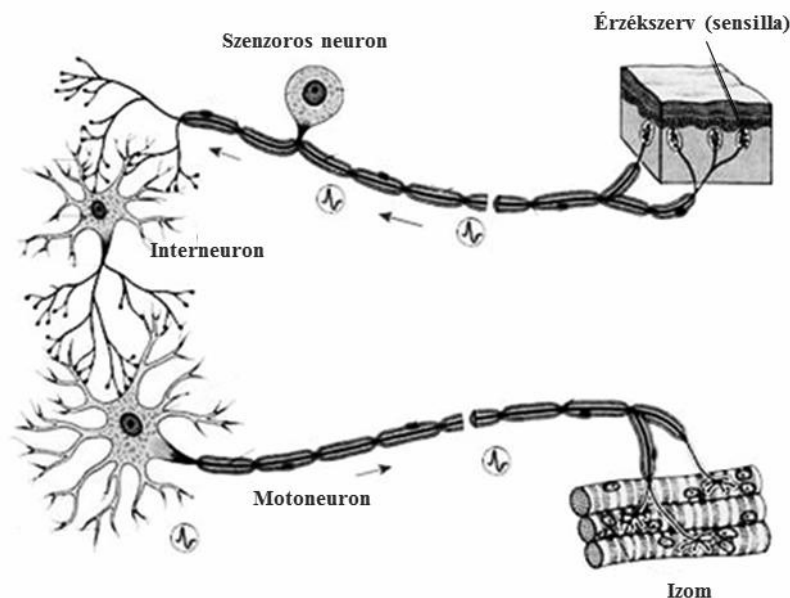
„knowledge comes to man through the door of the senses”
Heraclitus

1. BEVEZETÉS

1.1. A szenzoros rendszer jelentősége

Már az állati egysejtűek is rendelkeznek azon képességgel, hogy reagálnak az őket körülvevő fizikai és kémiai környezet hatásaira. A többsejtű állatokban speciális sejtek differenciálódtak a különböző ingerek detektálására és azok elektromos jellé történő átalakítására. Ezek legősibb formája a centrális nyúlvánnyal az idegsejtekkel szinaptizálódó ún. elsődleges érzékhám, amely főleg a gerinctelen állatokban fordul elő. A másodlagos érzékhámsejtek az érzékszervekben lokalizálódó nyúlvány nélküli energiaátalakító, transducer sejtek, amelyek a stimulus hatására akciós potenciálokot termelnek és azokat a velük szinaptizáló idegsejtek nyúlványaira továbbítják. A harmadik sejttípus az ún. érző idegsejt, amelynek perifériás nyúlványai vagy szabadon, vagy speciális idegvégtestet kialakítva végződnek a hám-, kötő- és izomszövetekben (Brusca és Brusca 1990).

Az érzékhámsejtek, vagy érző idegsejtek által inger hatására indukált elektromos jelet (akciós potenciál) az idegrendszerben az interneuronok dekódolják, értékelik és megfelelő válaszreakciót alakítanak ki, amelyek szintén elektromos jelként az ún. motoneuronok közvetítésével jutnak el a végrehajtó (effektor) sejtekhez, szövetekhez. Ez a folyamat az adekvát inger által kiváltott válaszreakció, azaz a reflex (1. ábra). A reflexív vizsgálata és az egyes alkotórészek anatómiai, működési sajátosságainak feltárása elősegíti az integratív idegrendszeri folyamatok alaposabb megismerését. Az idegrendszer speciális tulajdonsága az információ rögzítő és tároló képessége, amely lehetővé teszi a gyors és megfelelő válaszreakció kialakítását a már ismert és rögzített környezeti ingerekre.



1. ábra. A reflexív sematikus rajza.

A fizikai és kémiai hatások széles skálája éri folyamatosan az állati szervezetet, amelyek érzékelése létfontosságú. Ennek megfelelően speciális neuronok, illetve szenzoros sejtek, sejtcsoportok differenciálódtak, mint fény, nyomás, kémiai és hődetektorok. Ezeket az idegrendszeri specializációkat receptoroknak nevezzük, amelyek a szervezet egyéb rendszereivel együttműködve biztosítják, hogy az állat a környezetéről és annak változásairól pontos és gyors információkhoz jusson. Az adekvát szenzoros érzékelés és a gyors hatékony reagálás lehetővé teszi, hogy az egyed megfelelően adaptálódjon az éppen érvényes környezeti állapothoz, illetve új lehetőségeket aknázzon ki.

A szenzoros rendszer differenciálódására különösen nagy hangsúly tevődött a törzsfajlás folyamán. Az állatok érzékelésének sokszínűsége összhangban van a környezet sokszínűségével, amely folyamatosan hatást gyakorol rájuk. A természetes szelekció mind a ragadozóktól, mind pedig prédáiktól megköveteli, hogy érzékelésük a lehető legkifinomultabb legyen, csak így biztosított a fennmaradásuk. Ennek a folyamatnak köszönhetően az érzékszervek széles skálájával találkozhatunk a ma élő állatcsoportokban, ami azt is mutatja, hogy a tökéletes érzékszerv mindenkor jó evolúciós stratégiának bizonyult.

A szenzoros rendszer pontos feltérképezése a különböző fajokban nagy evolúcióbíológiai jelentőséggel bír. A korai evolúciós szintet képviselő állatcsoportok - gyűrűsférgék, puhatestűek- kezdetleges idegrendszeri szerveződése lehetővé teszi a szenzoros rendszer részletes anatómiai, valamint funkcionális vizsgálatát. A kísérletek eredményei

segítségét nyújthatnak a magasabb evolúciós szintet képviselő, komplex idegrendszerrel rendelkező állatok szenzoros mechanizmusainak megértéséhez.

Az idegrendszer működésének reprezentatív sajátossága a reflexműködés, amely az állati szervezet minden fejlődési szintjén jelen van. Legegyszerűbb formájában -egy detektor indukálását követően- az adott ingerre adott sztereotip reakció, amely a legtöbb esetben valamilyen motoros aktivitást eredményez. Ennek megfelelően rendelkezik egy afferens résszel, amely egy jelfelfogó szenzoros alegységből áll és az információt a központba továbbítja.

A szenzoros információ eredetét tekintve lehet külső, amelyet az exteroceptorok érzékelnek és közvetítenek, míg a szervezet belső állapotáról az interoceptorok tájékoztatják a központi idegrendszert. A két rendszer folyamatos, összehangolt működése képessé teszi az adott fajta megfelelő, gyors és pontos reakcióra.

A szenzoros rendszer afferens részét a receptorok adják, amelyek különböző ingerek felvételére -és fiziológiás jellé történő átalakítására- specializálódott idegsejtek. A receptorsejtek legősibb típusa a saját afferens, központi nyúlvánnyal rendelkező primer érzékhámsejt. Ezek a sejthalakok nagy számban fordulnak elő gerinctelen állatok köztakarójában, de a gerincesekben is megtalálhatóak.

A szenzoros receptorokat követően egy integratív rendszer dolgozza fel az információkat, értékeli azokat, illetve gyakran összefüggésbe hozza korábbi információkkal, majd a körülményeknek megfelelő döntéseket hoz. Ezt követően a motoros rendszer lép működésbe, ami a döntéseket motoros parancsá konvertálja, ezzel befolyásolva az effektor rendszerek működését.

Már hosszú ideje a neurológiai kutatások egyik központi témája az idegrendszer és a motoros rendszer kapcsolata, a motoros szabályozás mechanizmusa. Az egyszerűbb mozgásformákhoz tartoznak a primitív reflexek, amelyek a szenzoros inputok által kiváltott akaratlan, sablonos és osztályozott válaszreakciók. A kiváltott mozgások lehetnek fixált akció mintázatok (Fixed Action Pattern, FAP), -általában az egyszerűbb, lokális reflexeket soroljuk ide-, lehetnek ritmikus motoros mintázatok (Rhythmic Motor Pattern, RMP) -ezek az akaratlagos kontroll alatt álló komplex mozgások-, illetve közvetlen irányított mozgások (Direct Movement, DM).

Az RMP a viselkedési mozgásmintázat spektrumának nagy részét lefedi, ezen mozgások háttérében az ún. központi ritmusgenerátor (Central Pattern Generator, CPG) mechanizmus áll. A CPG egy relatív kicsi és autonóm neurális hálózat, amely által létrehozott

endogén működési mintázat a rendszer kimeneteinél mérhető (Grillner és Graybiel, 2006). Gerinctelen modellállatok idegrendszeri működéseinek vizsgálata során bebizonyították, hogy az RMP a központi idegrendszer által generálódik, és izolált idegrendszer esetében is regisztrálható (Marder és Calabrese, 1996). Szelvényezett állatokban kimutatták, hogy egyes szelvények önállóan képesek az alap helyváltoztató mozgásmintázat képzésére. Ez azt mutatja, hogy minden egyes szelvény ganglionjai individuális oszcillátorként működő központi ritmusgenerátor (Delcomyn, 1980; Marder és Calabrese, 1996).

A motoros parancsok szervezéséért a koordinációs rendszer a felelős, amely a központi idegrendszer részeként biztosítja, hogy az egyes effektor szervek, szervcsoportok a környezeti tényezőknek megfelelően zavartalanul, hatékony módon működjenek. A szenzoros információk szerepe a motoros mintázat megváltoztatásában van. Közvetlenül a CPG-re hatva módosítják a kimenő motoros programot és megváltoztatják az állat viselkedését. A szenzoros inputok hatása gyakran attól függ, hogy éppen milyen fázisban érik az aktuális motoros mintázatot. Közvetlenül a válaszreakció után érkező szenzoros információk korrekciós hatással vannak a központ működésére, és ezáltal visszaállítják a normális CPG mintázatot.

A motoros működés folyamatos kontroll alatt van. Az efferens kontrollban nagy szerepe van az interoceptorok által szolgáltatott információnak. A homeosztázis fenntartásához létfontosságú ezen rendszerek összetett, folyamatos és zavartalan működése.

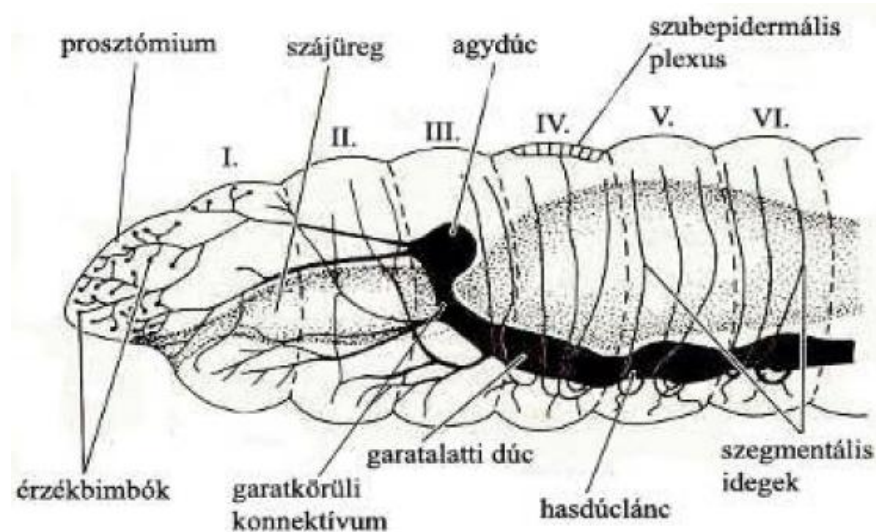
1.2. A gyűrűsférgék idegrendszere

A gyűrűsférgék dúcidegrendszerrel rendelkeznek, amelynek anatómiailag két részét tudjuk elkülöníteni; megkülönböztetünk központi (centrális) és környéki (perifériás) részt. A központi részt az agydúc (ganglion cerebrale, GC), a szelvényenkénti ganglionokból felépülő hasdúclánc (ventral nerve cord, VNC) és az ezeket összekötő konnektívumok alkotják. A környéki részt a dúcokból kilépő szegmentális idegek, a sztomatogasztrikus ganglionok (STG), a bélplexus, valamint a bőrízomtömlő érzéksejtjei alkotják (Smallwood, 1926; Jamieson, 1981).

1.2.1. A központi idegrendszer

1.2.1.1. Az agydúc anatómiai jellemzése

Az agydúc a harmadik testszelvényben dorzálisan, a szájüreg, illetve a garat felett helyezkedik el. A középvonala mentén két, bilaterálisan szimmetrikus ganglionfélre (hemiganglion) oszlik. Szegmentális idegei a prosztómiális idegek, amelyek a ganglion laterális oldalán erednek és a prosztómium, az első szelvény, valamint a szájüreg innervációját biztosítják (Hess, 1925a) (2. ábra).



2. ábra. *Lumbricus terrestris* idegrendszerének makroszkópikus szerveződése az anterior szelvényekben (Hess nyomán, 1925).

Az agydúc neuropilje elülső, középső és hátulsó régióra osztható. Az elülső neuropil régiót projekciós neuron sejtek nyúlványai alkotják (Ogawa, 1939), a középső régió a hasdúclánc afferens végződéseit tartalmazza, míg a hátulsó neuropil régióban interneuronok nyúlványai futnak, amelyek a garatalatti dúccal vannak kapcsolatban. Hisztológiai vizsgálatok során neuroszekréciós sejteket is azonosítottak, és ezek anatómiai pozícióját meghatározták (Teichmann és mtsai, 1966).

Az agydúcot a garatalatti (suboesophageális) dúccal a garatot kétoldalról körülölelő garatkonnektívumok (circumpharyngealis connectivum) kapcsolják össze, amelyek

interneurális és szenzoros rostokat is tartalmaznak. Ez utóbbiak a prosztómiális epithél felől szállítanak szenzoros információt, és a prosztómiális idegen, majd az agydúcon keresztül haladva a garatalatti dúcban végződnek. A garatalatti dúc a ventrális oldalon elhelyezkedő első három idegdúc összeolvadásából alakul ki, interneuronokat és projekciós neuronokat egyaránt tartalmaz (Ogawa, 1939).

1.2.1.2. A hasdúclánc anatómiája

A hasdúclánc (Ventral Nerve Cord, VNC) a hasi oldalon, a bõrizomtömlõ és a bélcsatorna között a mediánszagittális síkban húzódik az állat hossz tengelye mentén a negyedik testszelvénytõl a kaudális szelvényekig. A ganglionokból három pár oldalideg (szegmentális ideg) ered, amelyek a központi és a perifériás idegrendszert kapcsolják össze. Az I. szegmentális idegek rostrális helyzetûek, közvetlenül az anterior disszipimentum mögött lépnek ki a VNC ganglionjából. A caudálisan elhelyezkedõ II. és III. szegmentális idegek szorosan egymás mellett erednek, ezért ezeket páros idegeknek nevezik. A szegmentális idegek keverték szenzoros (afferens) és motoros (efferens) rostokat egyaránt tartalmaznak (Mill, 1978).

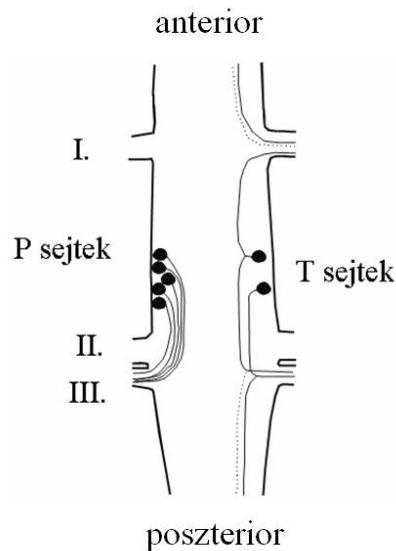
1.2.1.3. A központi idegrendszer szöveti szervezõdése

A dúcok -az agydúc kivételével- ventrális elhelyezkedésûek, amelyet egy három rétegû tok (cõlómasejtek, kötõszövet és izomréteg) a gangliontok (perineurium) vesz körül, biztosítva a tokon belüli sejtek táplálását, valamint az anatómiai integritás megõrzését (Coggeshall, 1965). Anatómiailag a dúcok két hemiganglionból állnak, amelyeket kommisszúrák kapcsolnak össze. A ganglionok szövettani szempontból egy külsõ, sejtés és egy belsõ, rostokból álló centrális neuropil régióra különülnek (Laverack, 1963; Prosser, 1935). A központban motoneuronok, interneuronok, valamint centrális érzõneuronok különböztethetõk meg.

1.2.1.3.1. A szenzoros rendszer

A legtöbb gerinctelen állatcsoporttal ellentétben az *Oligochaeta* fajoknál a motoros és interneuronokon kívül centrális érzõneuronok is találhatóak a ganglionokban. A centrális

érzőneuronoknak két csoportját különítjük el, ezek a PN2 és a PN3 neuronok (Günther és Walther, 1971). A második szegmentális idegtől anterior irányban helyezkedő PN2 sejtcsoportot nyomásra érzékeny neuronokként írták le és P (pressure) sejteknek nevezték el. A PN3 csoport, amelyek a második szegmentális idegtől anterior irányban helyezkednek el, T (tactile) -tapintásérzékelő- sejtekként azonosították (3. ábra).

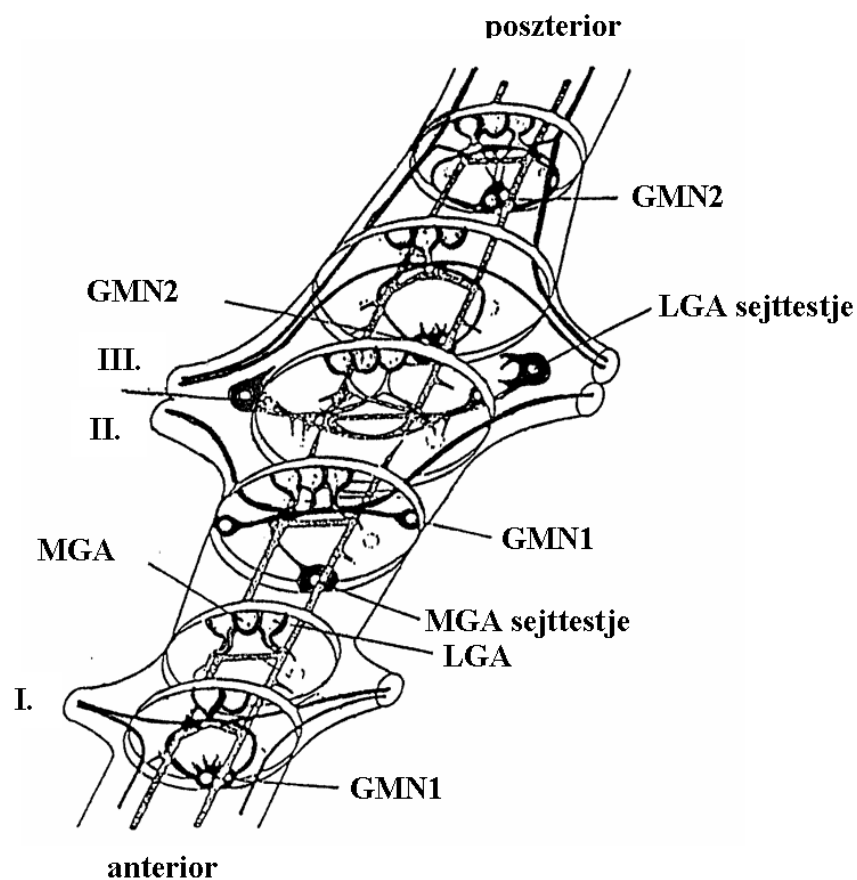


3. ábra. A centrális érzéksejtek -P és T sejtek- elhelyezkedése és axonjaik lefutása *Lumbricus terrestris* ganglionjában. I., II., III. a szegmentális idegek pozícióit jelölik (Günther és Walther nyomán, 1971).

A dúcokban elhelyezkedő sejtek nyúlványai, valamint a belépő szenzoros rostok hálózata képezi a dúcok neuropil állományát. Ez a rész felosztható egy külső részre, ahol az interganglionáris pályák futnak, valamint egy centrális, központi neuropil régióra. A külső neuropil régió belül elkülönítünk dorzomediális (DM-IT), dorzolaterális (DL-IT), laterális (L-IT), ventrolaterális (VL-IT) és ventromediális (VM-IT) interganglionáris pályákat (Günther és Walther, 1971). Az interganglionáris pályákon kívül megkülönböztünk 5 pár hosszanti szenzoros köteget, a dorzális (D-SLB), a ventrolaterális (VL-SLB), a ventromediális (VM-SLB), az intermedio-laterális (IML-SLB) és az intermedio-mediális (IMM-SLB) pályákat, amelyek a neuropil ventrális és laterális részén helyezkednek el (4. ábra). A szenzoros axonkötegek lefutása, szerveződése jól ismert, azonban az nem világos, hogy milyen funkcionális szerep áll ezen elrendeződés hátterében.

szegmentális idegek vonalában helyezkedik el. Ez utóbbi feltételezhetően az érzőkötegekkel, valamint az óriás interneuronokkal áll összeköttetésben (Dorsett, 1978). A laterális rostok a poszterior vég felől anterior irányba, míg a mediális rostok az anterior végtől a poszterior vég felé szállítják az ingerületet (Laverack, 1963).

A ventrális óriásaxonok (VGA) szómái szintén unipolárisak, a második szegmentális ideg magasságában fekszenek. Axonja a hasdúcánc teljes hosszán végigfut, bizonyítottan kapcsolatban van az intermedio-mediális és intermedio-laterális hosszanti szenzoros axonkötegekkel (Günther és Schürmann, 1973).



5. ábra. Az óriás motoneuronok és az óriásrostok lokalizációja a hasdúcáncban. GMN1: első típusú óriás motoneuronok, GMN2: második típusú óriás motoneuronok, MGA: mediális óriásaxon, LGA: laterális óriásaxon I., II., III.: a szegmentális idegek pozícióit jelölik (Günther és Walther nyomán, 1971).

1.2.1.3.3. A motoros rendszer

A ventrális ganglionokban ún. óriás motoneuronokat és kisméretű motoneuronokat azonosítottak, melyek többnyire kontralaterális projekciójú idegsejtek. Nyúlványaik a dorzális neuropilt átszelve keresztezik a ganglion középvonalát és a szemközti szegmentális idegen keresztül lépnek ki a perifériára. Gangliononként összesen 50 motoneuron található, amelyek a dúc rosztrokaudális tengelye mentén egyenletesen oszlanak meg a szegmentális idegek között. A sejtek perikaryonjai ventromediális, illetve laterális lokalizációjúak. A nagyméretű motoros neuronok (Giant Motoneuron, GMN) az óriásaxonokkal szinaptizálnak, és az állat menekülési reflexeinek kialakításában játszanak szerepet. Günther (1972) négy pár óriás motoneuront azonosított be, a sejtek perikaryonjának pozícióját és nyúlványaik pontos lefutását egyaránt leírták (5. ábra).

Az első típusú óriás motoneuronokból (GMN1) gangliononként három pár található a szegmentális idegeknek megfelelően rendeződve. Ezek a neuronok a dúc különböző magasságában helyezkednek el és a mediális óriásrost kollaterálisaival szinaptizálnak. A nyúlványaik a sejttestek lokalizációjának megfelelően az első, a második vagy a harmadik szegmentális idegen keresztül futnak a perifériára.

A ventromediális lokalizációjú, kettes típusú óriás motoneuronok (GMN2) a laterális óriásrostokkal képeznek szinapszist, majd axonjaik kettéválnak és az egyik ág a kontralaterális oldali harmadik szegmentális idegen, míg a másik ág a poszterior helyzetű szomszédos ganglion első szegmentális idegén keresztül hagyja el a gangliont (Günther és Walther, 1971; Günther, 1972; Dorsett, 1978).

1.2.2. A környéki idegrendszer

A ventrális ganglionokból 3 pár szegmentális ideg lép ki, ezek biztosítják a kapcsolatot a központi és a perifériás idegrendszer között. Az idegek mindegyike kevert ideg, azaz afferens és efferens rostokat egyaránt tartalmaz. A szegmentális idegeken át a perifériára távozó motoros axonokat már az előzőekben tárgyaltuk, ebben a fejezetben a központba érkező szenzoros rostok és a perifériás idegrendszer szenzoros elemei kerülnek tárgyalásra. A bélidegrendszer részletes tárgyalásától eltekintünk, mivel a későbbiekben ezekre a struktúrákra nem hivatkozunk.

1.2.2.1. Epidermális primer érzékhámsejtek

Az *Oligochaeta* gyűrűsféreg testfalában szenzoros sejteket találunk a peritoneum, az izomréteg, illetve az epithél területén. A hámréteg különösen nagy számban tartalmaz változatos alakú primer érzékhámsejteket.

A bőrizomtömlő érzéksejtjeinek többsége csoportokba, érzékszervekbe, az ún. érzékbimbókba (szenzillák) rendeződik, magányos sejtek ritkán fordulnak elő. A nagyobb szenzillák övszerűen veszik körül az állatot, a szelvények közepén, a sertékkal egy vonalban az ún. sertesorban helyezkednek el. A kisebb szenzillák szórtan helyezkednek el a szelvények sertesor előtti és utáni részében és ezt a látszólagos szabálytalanságot csak a kiválasztópórusok körül koncentrálódó érzékszervek törik meg. Ez az elrendeződés a test anterior és poszterior végét alkotó szelvények kivételével minden testszelvényre érvényes. A fejlebeny (prosztómium) területén különösen nagyméretű szenzillák találhatóak, amelyek elrendeződésében szabályszerűséget nem lehet felismerni (Aros és mtsai, 1978; Langdon, 1895; Ogawa, 1939).

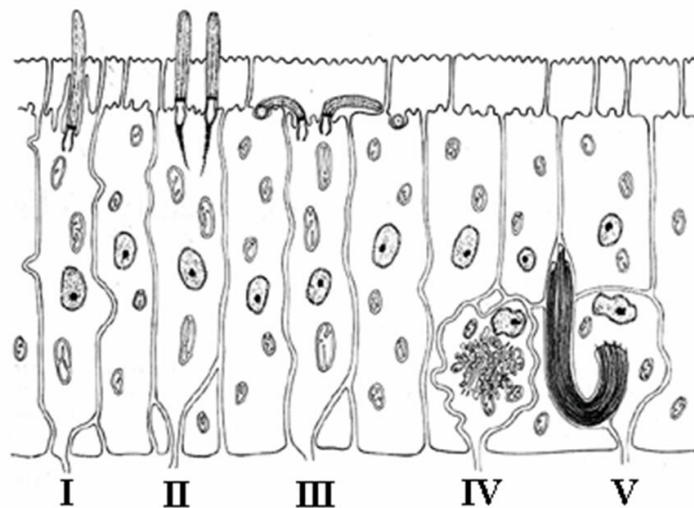
A szenzillákba csoportosuló érzékhámsejtek számának meghatározása és az egyes szelvényeken található szenzillák száma alapján Langdon kiszámította az egyes testszelvényekben koncentrálódó receptorsejtek számát. Megállapította, hogy a legtöbb érzéksejt a test első szelvényeiben található és a sejtek száma a rosztrokaudális tengely mentén fokozatosan csökken egészen az utolsó 4-5 szelvényig, amelyekben ismét a sejtszám növekedése figyelhető meg. *Lumbricus agricola*-ban 1900 érzékszervet számolt meg az első testszelvényben -a prosztómiális lebennyel együtt-, 1200-at a tizedik és 700-at az ötvenhatodik testszelvényben. Számításai szerint egy átlagosnak tekinthető posztklitelláris szelvényben közel 20 ezer érzékhámsejt található (Langdon, 1895).

A későbbi, korszerűbb módszerekkel végzett hisztológiai vizsgálatok megerősítették ezeket az adatokat, sőt arra is felhívták a figyelmet, hogy a *Lumbricida* fajok szenzilláinak száma és megoszlási mintázata nagyon hasonló a különböző fajokban (Aros és mtsai, 1978; Jamieson, 1981; Laverack, 1963; Moment és Johnson, 1979; Myhrberg, 1967, 1971, 1979; Spörhase-Eichmann, 1998).

A primer érzékhámsejteket fénymikroszkópos vizsgálatok alapján csoportosították, a sejttipizáláshoz a szóma alakját, illetve a sejtek nyúlványainak jellegzetességeit vették figyelembe (Hess, 1925a; Langdon, 1895; Ogawa, 1939). A legtöbb sejtest kör, vagy orsó alakú, a sejtnyúlványok lefutása meglehetősen változatos. Általában az ún. szubepidermális plexusban (lásd később: 1.3.2.1.2. fejezet) elágazódnak, végül a szegmentális idegekben

szedődnek össze, bár előfordul az is, hogy a centrális nyúlvány elágazódás nélkül halad át a plexuson. Kisebb számban előfordulnak nagyméretű, hasáb alakú sejtek, amelyeknek a nyúlványa gazdagon elágazik a szubepidermális plexusban, továbbá a hámréteg apikális részén elhelyezkedő körte alakú szómával és vastag centrális nyúlvánnyal bíró sejtek, valamint a hámréteg alapján elhelyezkedő, közel gömb alakú sejtek. Az ismertetett típusokon kívül a test elülső szelvényeiben, különösen a prosztómiumon, és az utolsó ún. kaudális szelvényekben nagy számban fordulnak elő fotoreceptorok. Ezek kisebb számban a cerebrális ganglionba futó szegmentális idegek mentén, sőt az agyban is megtalálhatók (Hess, 1925b; Jamieson, 1981; Röhlich és mtsai, 1970). A fotoreceptorok a test egyéb szelvényeiben is előfordulnak, főleg a dorzális oldalon lokalizálódnak (Hess, 1925b; Moment, 1979).

Az ultrastrukturális vizsgálatok tették lehetővé a primer érzékhámsejtek alaktani sajátosságainak teljes feltárását és részben funkcionális jellegzetességeik megismerését. Földigilisztákban az érzékhámsejtek öt típusa különböztethető meg (6. ábra): (I.) penetratív uniciliáris, (II.) penetratív multiciliáris, (III.) nem penetratív multiciliáris sejt, (IV.) az ún. faoszomás fotoreceptor és (V.) a bazális csillós sejt (Aros és mtsai, 1971a, b; Jamieson, 1981; Knapp és Mill, 1971; Mill, 1978, 1982).



6. ábra. A primer érzékhámsejtek csoportosítása. Ultrastrukturális vizsgálatok alapján. I: penetratív uniciliáris sejt, II: penetratív multiciliáris sejt, III: nem penetratív multiciliáris sejt, IV: faoszomás sejt, V: bazális csillós sejt (Jamieson nyomán, 1981).

A penetratív uniciliáris sejtek 9+2 szerkezeti felépítésű csillója alapi testtel rendelkezik és áttöri a kutikulát. A multiciliáris érzékszövetek csillói szintén áthatolnak a vékony kutikulán és közvetlen kapcsolatba kerülnek a külvilággal. A sejtek változó számú, 4-18 csillóval bírnak, a csillók alapi testtel, valamint bazális csillógyökeérrrel rendelkeznek. A penetratív uni- és multiciliáris sejtek mindig érzékbimbókba tömörülve helyezkednek el, magányosan nem fordulnak elő. Az érzékbimbókban elhelyezkedő támasztósejtek alakja és szerkezete a multiciliáris sejtek felépítéséhez hasonló. Az apikális résznél zonula adherenssel kapcsolódnak egymáshoz a támasztó és érzékszövetek. A test elülső szelvényeiben az érzékbimbók általában 3-5 uniciliáris sejtet is tartalmaznak, míg a többi testszelvényben csak penetratív multiciliáris sejtek találhatóak a szenzillákban (Knapp és Mill, 1971; Mill, 1978, 1982). Az érzékbimbókban soha nem fordulnak elő nem penetratív multiciliáris sejtek, amelyek magányosan (ún. szoliter sejtek), mirigy- és támasztósejtek által körülvéve, szórtan helyezkednek el a bőrízomtömlő hámjában. A szómából kilépő hosszú csillók közvetlenül a kutikula alatt, a hám felszínével párhuzamosan futnak.

A fotoreceptorok változatos alakú, de általában gömb, vagy kissé ovális formájú sejtek, citoplazmájuk nagy részét egy üreg foglalja el, amelybe nagy számban nyomulnak be csillók (Hess, 1925b; Röhlich és mtsai, 1970). Az állat teljes testfelületén találunk fotoreceptorokat, különösen nagy számban a prosztómium, az első két testszelvény, valamint az utolsó szelvény területén. Előfordulhatnak még a feji régió és a kaudális szelvények nagy idegi mentén, valamint az agyi ganglionban (Hess, 1925b).

A bazális csillós sejt szerkezete a fotoreceptorokéhoz hasonló, de a szómából kinyúló csillóköteg alapján attól könnyen megkülönböztethető. Ez a sejt típus különösen nagy számban fordul elő a posztklitelláris szelvények dorzális oldalán (Myhrberg, 1979), funkciója teljesen ismeretlen.

A gyűrűsférgék testfalában a primer érzékszövetek mellett szabad idegvégződéseket is találunk amelyek egy részét efferens végződésnént írták le (Langdon, 1895). Ezek feltételezhetően az epidermális mirigysejtek szekréciós kontrolljának szabályozásában játszanak szerepet (Coonfield, 1932).

1.2.2.2. A szubepidermális és az izom plexus

A primer érzékhámsejtek nyúlványai a hámréteg alatt az ún. szubepidermális plexus sűrű hálózatát hozzák létre. A plexus megléte már a korai hisztológusok számára is ismert

volt (Hess, 1925a; Langdon, 1895), de a funkció és a lehetséges működés közötti elképzelések erősen különböznek mind a mai napig. Langdon szerint ezt a plexust kizárólag efferens szenzoros rostok alkotják, amelyek közvetlenül a központba futnak. Más elképzelés szerint a szenzoros axonok mellett egyéb rostok is előfordulnak, korlátozott számban még szenzoros-motoros összeköttetések is (Hess, 1925a; Smallwood, 1926; S Miller és Ting, 1949). Az ideghálóként jellemzett struktúra Prosser (1935) szerint nem csak neuronális összeköttetéseket tartalmaz. A plexus átvágását követően a testfal stimulálásakor a szegmentális idegekben nem sikerült válaszokat indukálni, valamint a VNC hiányában maga a bőrízomtömlő is képes lokális reflexreakciók fenntartására.

Az ultrastruktúrális vizsgálatok kimutatták, hogy a plexus rostjainak egy része monoaminerg, amelyeken jellemzően axonális megvastagodások is előfordultak. A legtöbb rostban 30-50 nm átmérőjű vezikulákat sikerült kimutatni, szinaptikus kapcsolatra utaló membránspecializációkat azonban mindeddig még nem találtak. Korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a szegmentális idegekben található axonok száma és a perifériás érzékszervek száma megegyezik (Prosser, 1935; Ogawa, 1939). Elektronmikroszkópos megfigyelésekkel számos kisebb axont sikerült feltárni, de a szenzoros axonok fűzőjára mindeddig még nem találtak bizonyítékot (Mill, 1975).

A primer érzékhámsejtek nyúlványai a plexust követően a szegmentális idegeken át megszakítás nélkül futnak a dúcokba, ahol öt pár hosszanti szenzoros kötegbe rendeződnek (Mill, 1982).

Az izomplexus kevésbé kondenzált, rostjai szórtan helyezkednek el az izomréteg rostjai között. Tartalmaz afferens és efferens rostokat, amelyek a neuromuszkuláris funkció, illetve az efferens izomkontroll kialakításában játszanak szerepet.

Mindkét plexus érző- és mozgató működésekben játszott lehetséges szerepére már hisztológiai és élettani kutatások felhívták a figyelmet (Hess, 1925a; Langdon, 1895; Laverack, 1963; Mill, 1978, 1982) de a hipotézis egyértelmű kísérleti megerősítése, alátámasztása mindeddig nem történt meg.

1.2.3. Az idegrendszer kémiai neuroanatómiája

A gyűrűsférgék idegrendszerében számos neuroaktív anyagot sikerült beazonosítani mind a központi, mind pedig a környéki idegrendszer struktúráiban (Rude, 1966; Robertson és Osborne, 1979). A monoaminok közül a szerotonin széles körben előforduló

neuromodulátor anyag, amely a ventrális ganglionban lokalizálódó sejtek 5-10%-ában megtalálható (Myhrberg, 1967, 1971; Spörhase-Eichmann és mtsai, 1987a,b). Szerotonint a periférián is sikerült kimutatni, relatíve nagy számban találtak immunreaktív rostokat a testfalban (Reglődi és mtsai, 1997b). Oktopamin immunreaktivitást is leírtak (Csoknya és mtsai, 1996, 1997) az egyes idegsejtekben.

A gátló neurotranszmitterként ismert γ -amino-vaajsav (GABA) jelenlétét a központi idegrendszerre korlátozva írták le. Meghatározták az immunreaktív sejtek számát és eloszlását. Az egyes dúcokban, gangliontól függően a sejtek 4-8%-a bizonyult GABA immunreaktívnek (Telkes és mtsai, 1996).

Széles körben vizsgálták az idegrendszerben előforduló különféle peptid természetű anyagokat. Meghatározták, az FMRF-amid (Reglődi és mtsai, 1997c), a noradrenalin, a calcitonin gén-relációs peptid (CGRP), a P-anyag, a proktolin, valamint a neuropeptid Y immunreaktív sejtek idegrendszeri előfordulását és gangliononkénti eloszlását (Csoknya és mtsai, 1992; Lengvári és mtsai, 1994; Reglődi és mtsai, 1997a).

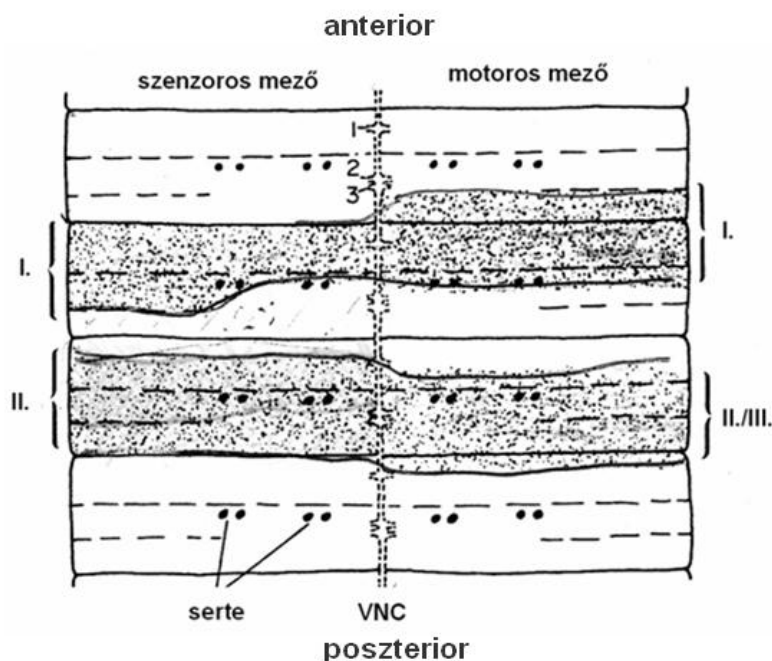
A perifériás idegrendszerben a primér érzékhámsejtek tulajdonságait vizsgálták részletesen. Kimutatták, hogy az érzékhámsejtek neurokémiai szempontból heterogén populációkba tartoznak. Transzmitter-specifikus sejteket mutattak ki különböző fajokban, így peptiderg (Curry és mtsai, 1989; Gesser és Larsson, 1986; Lengvári és mtsai, 1994; Reglődi és mtsai, 1997a, 1999, 2000), aminerg (Ehinger és Myhrberg, 1971; Myhrberg, 1967, 1971; Reglődi és mtsai, 1997b; Rude, 1966; Spörhase-Eichmann, 1998) és GABAerg (Telkes és mtsai, 1996; Spörhase-Eichmann, 1997; Csoknya és mtsai, 2005) sejtcsoportok leírására került sor. (Spörhase-Eichmann és mtsai, 1998)

1.2.4. A gyűrűsférgék szenzoros működése

A gyűrűsférgék képesek reagálni a környezetből érkező taktilis, kémiai, proprioceptív és fény ingerekre. Az erős mechanikai és fényingerrel kiváltható visszahúzóási, menekülési reflexválasz az összes *Annelida* fajban megtalálható, erősen konzerválódott viselkedési forma. A mechanikai és fényingerekhez való alkalmazkodás -a habituáció- meglehetősen gyorsan végbemegy (Clark, 1960a). Ez az egyszerű reflex a longitudinális izmok gyors kontrakcióját és a cirkuláris izmok relaxációját idézi elő. Földigilisztában a serték mozgata is a reflexválasz része, ez a válasz azonban az alkalmazott inger irányától függ. A reflexív jól definiálható elemekből tevődik össze; az afferens részhez a testfal, az érzékszervek, a VNC,

míg az efferens részhez a VNC és a testfal hosszanti valamint körkörös izomrostjai tartoznak. A reflexben kitüntetett szerepe van az óriásaxonoknak, ezt számos ligatúrák, regenerációs és embrionális fejlődést vizsgáló kísérlettel igazolták (Prosser, 1935; Laverack, 1963; Friesen és Chang, 2001).

Taktilis ingerre az állat egész testfelszínén indukálható válasz (Laverack, 1963). A taktilis stimulusokra adott válaszokat az I. és a III. szegmentális idegeken regisztráltak. A testfal enyhe stimulálására gyorsan adaptálódó válasz jellemző, míg az erősebb nyomási inger -ami a testfal deformálódását eredményezi- lassabban adaptálódó válaszokat generál (Knapp és Mill, 1967). Bullock (1945) kimutatta, hogy az anterior szegmensek, valamint a klitellum régiójának mechanikai ingerlését követően a mediális óriásrostban megnövekedett potenciálok regisztrálhatóak, míg az anterior szelvények ingerlését követően csak a laterális óriásrostokban mért aktivitást. A receptív mezők meghatározására a taktilis ingerek esetében volt lehetőség. A kísérletek során intakt I. és II. szegmentális idegekből történtek az elvezetések. A szenzoros mező beborította a szelvény egész ipszilaterális oldalát és a szomszédos szelvényfél ipszilaterális régióira is kiterjedt (Prosser 1935, Knapp és Mill 1967). Mill és Knapp a VNC eltávolítását követően a szegmentális idegekhez tartozó receptív mezőket tanulmányozták. Azt tapasztalták, hogy a receptív mezők területe egy szelvényen belülre korlátozódott. és az I. és a III. szegmentális idegek receptív mezői átfedtek (7. ábra).



7. ábra. A I. és II. szegmentális ideghez tartozó receptív mezők elhelyezkedése. Taktilis mező (bal oldalt) és a dorzális óriásrost stimulálását követően detektált motoros mező (Knapp és Mill nyomán, 1967). VNC: hasdúclánc, 1/2/3: szegmentális idegek, I./II./III.: Az egyes szegmentális ideghez tartozó receptív mezők.

A kémiai ingerek egy része -mint a NaCl és a savas pH- hasonlóan a taktilis ingerekhez az állat egész testfelületén válaszreakciót eredményez. Egyéb anyagok, mint a répacukor, a glicerol és a kinonok érzékelése a prosztómialis régióra korlátozódik (Laverack, 1963). A kemoreceptív inputok elsősorban az I. és a III. szegmentális idegen, kis mértékben a II. idegen keresztül jutnak a centrális idegrendszerbe.

Proprioceptív receptorok képesek folyamatosan monitorozni a test változásait, így folyamatosan tájékoztatják a központot az éppen aktuális megnyúlási, feszülési állapotokról. *Lumbricus terrestris*ben mindhárom szegmentális idegen keresztül juthat ilyen jellegű információ a központba (Knapp és Mill, 1967).

Az elektrofiziológiai kutatások kimutatták, hogy a hasdúclánc ganglionjai önálló reflexközpontokként funkcionálnak. Ezek működését a felsőbb központok, az agy és a garatalatti dúc modulálják. Az agy elsősorban, mint szenzoros átkapcsoló hely az ingerek klasszifikációjában vesz részt, míg a garatalatti dúc motoros mechanizmusok kontrolálásában játszik szerepet (Laverack, 1963; Mill, 1978).

Az egyes érzékszertípusok lehetséges funkcióit csak részben sikerült feltárni. A rendelkezésre álló elektrofiziológiai eredmények alapján a nem penetratív multiciliáris sejtek mechanoreceptorok, a penetratív uni- és multiciliáris sejtek kemoreceptorok lehetnek (Knapp és Mill, 1971; Mill, 1978, 1982). Elektrofiziológiai vizsgálatok adatai szerint az érzékbimbók ingerekkel szembeni érzékenysége testtájanként változik annak ellenére, hogy azonos morfológiájú sejtek építik fel azokat. Így a prosztómium és a szájüreg érzékbimbói alacsony ingerküszöbvel jellemezhetők, sőt diszkrét kémiai ingerek (édes, savanyú és keserű) elkülönítésére is képesek, míg a test többi szelvényében elhelyezkedő érzékbimbók a környezet sókoncentrációjának és vegyhatásának változásait képesek csak detektálni, ízek vagy szagok megkülönböztetésére képtelenek (Laverack, 1963; Mill, 1978, 1982). Ez a különbség arra utal, hogy az azonos morfológiájú receptorsejtek működése jelentősen különbözik egymástól és a szerkezet alapján nem lehet egyértelműen az adott sejtípus funkciójára következtetni.

2. CÉLKITŰZÉS

A *Lumbricus terrestris*, az *Eisenia fetida* és a *Limnodrilus hoffmeisteri* mint modellállatok egyszerű szerveződésű és könnyen manipulálható idegrendszerük miatt a neuromorfológiai, neurotoxikológiai és neurofiziológiai kutatások kedvelt modellállatai. A rendelkezésünkre álló szakirodalom alapján megállapítottuk, hogy az állatok anatómiai szerveződése már a korai munkákban is nagy részletességgel tárgyalt. Ezekben a leírásokban néhány, mára már klasszikussá vált irodalomra hivatkoznak, mint például -a teljesség igénye nélkül- Langdon 1895-ös, vagy Hess 1925-ös publikációjára. A mai funkcionális és a hisztológiai vizsgálatok is ezen kísérletek eredményeit veszik alapul, holott ezeket az adott kor technikai színvonalának megfelelően végezték el. Felvetődhet a kérdés, hogy a mai modern jelölési és festési technikákat kombinálva nagy felbontású képalkotási eljárásokkal helytállóak maradnak-e ezek a megállapítások. Fontosnak tartottuk, hogy a szenzoros rendszer egzakt anatómiai leírását követően kvantitatív méréseket is folytassunk, és ezeket hasonlítsuk össze a korábbi mérésekkel.

Az érzékszervek vizsgálata során az anatómiai és fiziológiai kísérletek a test elülső részén elhelyezkedő prosztómium területére korlátozódtak. A többi szelvényben helyet foglaló szenzillákról igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Ezért célul tűztük ki a test más szelvényeiben előforduló érzékszervek, szenzillák anatómiai jellemzését. Az érzékszervek elhelyezkedésének, méretének meghatározása fontos lépés lehet a szenzoros rendszer működésének megismeréséhez.

Az állatok idegrendszerének neurokémiai tulajdonságáról is sok adat áll rendelkezésünkre, ezen kísérletek nagy része azonban a központi idegrendszerre korlátozódott. A szenzoros rendszer egzakt neurokémiai jellemzése még a mai napig nem történt meg. A rendelkezésre álló adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a primer érzékhámsejtek funkciójának feltárását jelentős mértékben segítheti az egyes transzmitter-specifikus sejtpopulációk anatómiájának részletes elemzése. Számos transzmitter előfordulását leírták már a primer érzékhámsejtekben, de szisztematikus jellemzésükre a mai napig nem került sor. A transzmitter specifikus sejtek száma és eloszlása a lehetséges funkcióikra is rámutathat. Az eddig azonosított, de csak részlegesen leírt transzmitterek közül megkülönböztetett figyelmet érdemel a gátló transzmitterként ismert GABA előfordulása a szenzoros sejtekben. Mivel a GABA expresszálo sejtek már az embrionális fejlődés korai

szakaszaiban megjelennek (Koza és Csoknya, 2004), így feltételezhetően fontos szerepük lehet a szenzoros mechanizmusokban.

Az eddigi eredmények alapján arra következtettünk, hogy a központi és a perifériás idegrendszer kapcsolatának részletes anatómiai és immunitokémiai jellemzése hozzájárulhat a gyűrűsférgek idegrendszeri mechanizmusainak alaposabb megértéséhez.

Az irodalmi adatok alapján megállapítottuk, hogy

1. a szenzillák és a magányos primer érzékhámsejtek eloszlási mintázatának meghatározása a különböző testrégiók totálpreparátumaiban;
2. a primer érzékhámsejtek morfológiai jellemzése, nyúlványrendszerük lefutásának pontos leírása;
3. az egyes testszelvényekben elhelyezkedő érzékhámsejtek központi idegrendszeri reprezentációjának feltárása;
4. a GABA-immunreaktív (GABA-IR) primer érzékhámsejtek azonosítása, eloszlási mintázatuk meghatározása, továbbá
5. azok centrális nyúlványai központi idegrendszeri reprezentációjának meghatározása

jelentős mértékben hozzájárulhat az *Oligochaeta* férgek szenzoros rendszere szerveződésének és működésének alaposabb megértéséhez.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok tartása és előkészítése

Kísérleteinkhez a trágyagiliszta *Eisenia fetida Savigny*, a közönséges földgiliszta *Lumbricus terrestris*, valamint a csővájó féreg *Limnodrilus hoffmeisteri* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae) egyedek ivarérett, kifejlett klitellummal rendelkező példányait használtuk, amelyeket standard laboratóriumi körülmények között tartottuk (lásd: 1. táblázat). Az ismertetett körülmények között az állatok intenzíven növekedtek és szaporodtak.

paraméter	<i>Eisenia fetida</i>	<i>Lumbricus terrestris</i>	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>
Hőmérséklet	20±1°C	20±3°C	15°C-os csapvíz
Nedvességtartalom	60%	40%	100%
Táptalaj összetétele	50% hansági tőzeg és 50% lótrágya	kerti virágföld	-
Légcsere	folyamatos	folyamatos	folyamatos
Megvilágítás	napi 12 órás	napi 12 órás	napi 12 órás

1. táblázat. A kísérleti állatok tartási körülményei.

Az állatokat szén-dioxiddal dúsított vízben narkotizáltuk (CO₂ tartalom 5,0 g/l). Az elbódított állatokat steril Sylgard alapú bonctálban rögzítettük, majd a bőrizomtömlőt a dorzomediális síkban felnyitottuk és azt a disszepimentumok átvágása után kiterítettük. A belső szerveket és a központi idegrendszert fiziológias sóoldatban (110 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃, 0,1 mM NaH₂PO₄) kiboncoltuk. A kísérletekhez az egyedek különböző testtájainak szelvényeit használtuk fel.

3.2. Pályajelölések

A pályajelölési kísérletek során két eltérő tulajdonsággal rendelkező festéket használtunk (2. táblázat). A lipofil kémiai karakterrel rendelkező fluoreszcens karbocianin festéket, a DiI-t használtuk elsőként a pályajelölésekhez. Ez az anyag a membrán síkjában képes diffundálni, így a jelölt sejt teljes nyúlványrendszerét képes jelölni. A festék használata mellett szól még azon tulajdonsága, hogy fixált anyagon is képes diffundálni (Honig és Hume, 1986).

A másik használt anyag a Lucifer sárga (Lucifer yellow, LY), amit iontoforézissel juttattunk a preparált ideggyökökbe. Ez az anyag kis molekulásúlyának köszönhetően az elektromos szinapszisokon, a gap junctionokon is képes áthatolni, így az egymással kapcsolatban lévő rostok által kialakított pályarendszerek megjelenítésére alkalmas (Warner és Lawrence, 1982).

tulajdonság	<i>DiI</i>	<i>Lucifer yellow</i>
Név	1,1' - Dioctadecyl - 3,3,3',3' - tetramethylindocarbocyanine iodide	6-amino-2-(hydrazinecarbonyl)-1,3-dioxobenzo[de]isoquinoline-5,8-disulfonate de dilithium
Molekulásúly	961,32	457,25
Gerjesztési hullámhossz (nm)	551	425-430
Emissziós hullámhossz (nm)	566	515-520, 540
Oldószer	dimetil-szulfoxid (DMSO)	vízbázisú oldószer

2. táblázat. Az alkalmazott fluoreszcens jelölőanyagok fontosabb tulajdonságai.

3.2.1. DiI-töltés

A kísérletek során centrális és perifériás jelöléseket egyaránt alkalmaztunk. Perifériás jelöléskor a kutikula eltávolítása után közvetlenül az epithél felszínre kristály halmazállapotú DiI-t helyeztünk.

Centrális jelölés esetén a gangliontokon ejtett haránt bemetszést követően a DiI mikrokristályokat egy kanül segítségével jutattuk a ganglion laterális részébe. A gangliont szeparáltuk a szomszédos ganglionoktól, majd egy alumíniumcsónakba helyeztük, hogy elkerüljük a környező szövetek esetleges szennyeződését.

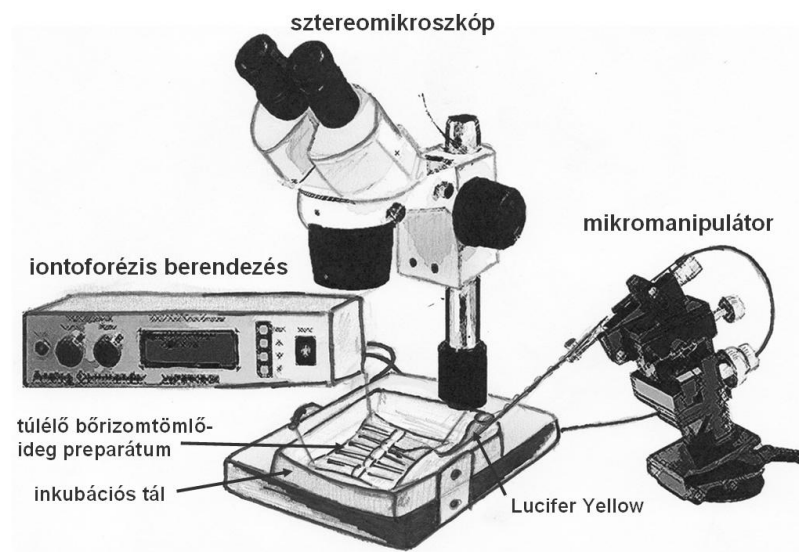
A DiI implantációt követően a preparátumokat hermetikusan lezárt Petri-csészében 4% paraformaldehidben 4 °C- on inkubáltuk. A jelölőanyag diffúzióját tömény dimetil-szulfoxid (DMSO) kezeléssel gyorsítottuk. Az alkalmazott inkubációs időtől függően (min. 3 hét, max. 8 hét) különböző szintű jelöléseket tudtunk detektálni.

A minták egy részét totálpreparátumként használtuk, a másik részt 5%-os agar oldatba ágyasztuk, majd vibratómmal (Technical Products Incorporation, St. Louis, Mo, USA) lemetszettük. A 20-30 µm-es sorozatmetszeteket egyesével 0,1%-os foszfátpufferbe (PBS) tettük, majd zselatinos tárgylemezre helyeztük.

A kiértékelést Olympus FV 1000 típusú (Olympus, America PA, USA) konfokális lézerszenning mikroszkópon végeztük, a háromdimenziós rekonstrukciókat pedig Imaris (version 7.2) háromdimenziós képalkotó program (Bitplane Saint Paul, MN, USA) segítségével készítettük.

3.2.2. Lucifer yellow-töltés

A primer érzékhámsejtek lokalizációjának, valamint a perifériáról a központba befutó centrális axonjainak azonosítására extracelluláris töltést alkalmaztunk. Az elbódított kísérleti állat központi idegrendszerét feltártuk, majd a vizsgálandó szegmentális ideget applesia ollóval átvágtuk. Az idegcsonkot platina kaccsal desztillált vízzel töltött extracelluláris elektródába helyeztük (8. ábra). Néhány perces hipozmotikus sokk után a desztillált vizet gilisztá-ringerben oldott 10 %-os Lucifer sárga (Lucifer yellow, LY, Sigma, Budapest) oldatra cseréltük ki. A festéket min. 3 órás iontoforézissel (negatív áram, 1 Hz, 600 nA, 500 msec) juttattuk be az idegcsonkba (Niida és mtsai, 1998). Az inkubációs idő alatt a túlélő bőrízomtömlő-ideg preparátumot inkubáló csészében, nedves kamrában, ringeroldatban tartottuk, amelyet folyamatosan cseréltünk. A szegmentális idegeket a hasdúc-lánc (centrális töltés), és a bőrízomtömlő (perifériás töltés) irányába is töltöttük. A töltést követően a preparátum jelölt struktúráit Nikon Ophiot-2 fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.



8. ábra. A Lucifer yellow töltés kísérleti összeállítása.

3.3. GABA immunhisztokémia

3.3.1. Pre-embedding immunhisztokémia

Preparációt követően a mintákat minuciatúkkal kifestítettük, majd 3 órán át fixáltuk frissen összeállított Boer-oldatban (3 ml cc. pikrinsav, 1 ml 25%-os glutáraldehid és 40 µl jégecet) szobahőmérsékleten, sötétben. A fixálás után a szöveteket többször váltott 70%-os alkoholban mostuk 1 órán át, majd több órán át PBS-ben, amíg a szövetek pikrinsav-tartalma kioldódott. Ezután PBS-ben oldott 1%-os Triton-X 100 oldatban inkubáltuk 7-10 napig 4 °C -on.

Ezt követően a mintákat hidrogén-peroxid-metanol-PBS 0,3:10:100 arányú keverékében inkubáltuk 20 percig, szobahőmérsékleten, az endogén peroxidázok semlegesítése érdekében. Ezután 2 órás, többször cserélt PBS-s mosást követően a szövetdarabokat az elsődleges antiszérum-oldatban inkubáltuk. Az anti-GABA primer antitestet (A2052, Sigma Chemical Company, Budapest, Hungary) 2% Triton X-100 pufferben oldva 1:500 hígításban alkalmaztuk. Az inkubációt 4 napon keresztül 4 °C -on végeztük.

Primer antitestünk specifitását GABA-preabszorpciós teszttel ellenőriztük. Ha az inkubálás során a primer antitestet kihagytuk a reakciósorból, a bőrízomtömlő sejtjeiben a hisztokémiai protokollokban szokványosan alkalmazott inkubációs idő alatt jelölődést nem tapasztaltunk.

Az immunreakció végeredményét avidin-biotin komplex (ABC) segítségével tettük láthatóvá, amihez nyúl ExtrAvidin kitért (DAB, Avidin-biotin-horseradish peroxidase method, Extravidin kit, Sigma Chemical Company, Budapest, Hungary) használtunk. Az elsődleges antitest-oldatban történő inkubálást követően a mintákat egy éjszakán át, többször cserélt PBS-ben mostuk, majd kecske anti-nyúl biotinilált PBT-ben (PBS-ben oldott 1% Triton-X 100) oldott IgG (1:100) oldatban inkubáltuk 6-8 órán át. PBT-ben történő 3-4 órás mosás után a mintákat avidin-biotin-tormaperoxidáz enzim oldatába (1:100, PBT-ben oldva) helyeztük át. Az egyéjszakai inkubációt és a 2 órás PBT-s mosást követően a reakció előhívásához 0,03% 3,3'-diaminobenzidin (DAB) és 0,01% hidrogén-peroxid (H₂O₂) keverékét alkalmaztunk (oldószer 0,1M foszfát puffer, /PB/). A reakciót PBS-es túlhígítással állítottuk le, majd ezt követően a preparátumokat 0,1M PBS-ben alaposan kimostuk. A minták egy részét glicerinen derítettük, a vizsgálatot zavaró szövetdarabokat mikroollóval és mikrocspeszsel eltávolítottuk, majd a tárgylemezre felvitt totálpreparátumokat 87%-os glicerinnel fedtük le.

A másik mintacsoportot víztelenítettük, műgyantába ágyasztuk és félvékony (1,5-2µm)

sorozatmetszeteket készítettünk belőlük. A Depex-el (Fluka, Budapest) állandósított metszeteket Spot (Diagnostic Instruments, Inc) digitális kamerával ellátott Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóppal értékeltük ki. A multispektrális felvételeket CRi NuanceTM multispektrális digitális kamerával (Cambridge Research & Instrumentation, Woburn, USA) felszerelt Zeiss Axio Imager Z1 mikroszkópon készítettük.

3.3.2. Post-embedding immunhisztokémia

Az Epoxi-gyantába ágyazott metszetsorozatok immunjelölésekor a tárgylemezre felvitt metszetekről az antigének szabaddá tételéhez nátrium-etanolát oldattal marattuk le a beágyazó médium egy részét. Ezután a mintákat desztillált vízben és NaCl-ot is tartalmazó pufferelt Tris-ben (TBS, pH= 7,6), majd TBS-ben oldott 0,5%-os Triton X-100 oldatban (TX) alaposan kimostuk. A 2,5%-os normál kecske szérummal történő előinkubációt követően a metszetekre anti-GABA szérumot vittünk fel és a mintákat nedves kamrában egy éjszakán át inkubáltuk. Az immunreakciót nyúl ExtrAvidin kittel fejeztük be. A reakció eredményét folyamatos mikroszkópos megfigyelés mellett, 0,03% DAB-oldatban oldott 0,01% H₂O₂ segítségével (oldószer: 0,1M PB) tettük láthatóvá. A metszeteket mosás, etil-alkoholos víztelenítés és xilolban történő derítés után Depex-el (Fluka, Budapest) állandósítottuk.

3.4. Szkenning elektronmikroszkópia

Az elbódított állatokból izolált szelvényeket 0,2 M-os foszfát-pufferrel hígított 2,5%-os glutáraldehidben rögzítettük 3 órán át. A mintákat alapos mosás után (6x15 perc PB) 1%-os pufferolt ozmium-tetroxidban rögzítettük 2 órán át 4 °C-on. Felszálló alkoholsorozatban (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, absz. alkohol) történő víztelenítést követően a mintákat amil-acetáttal itattuk át, majd szénsavval lefagyasztottuk és kritikus hőmérsékleten kiszárítottuk. Az alumínium tartóra ezüst-ragasztóval felerősített mintákat vákuumban vékony aranyréteggel fedtük be és JEOL-szkenning elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.5. Áttekintő és immun-elektronmikroszkópia

Elektronmikroszkópos mintáinkat először 4% PFA és 2,5% GA keverékében 3 órán át

szobahőmérsékleten sötétben rögzítettük, majd szacharóz tartalmú pufferban mostuk és 1%-os ozmium-tetraoxiddal utófixáltuk. A rögzített mintákat műgyantába ágyaztuk be, és 60 °C-on polimerizáltattuk. A blokkokból ultravékony metszeteket készítettünk, majd Nikkel gridekre felvitt ultravékony metszeteket, a gyantának a metszet felső rétegéből történő kivonását és deozmifikálást követően, 5%-os NGS (normal goat serum, normál kecske szérum) oldat (oldószer: PBS) cseppjében 30 percig előinkubáltuk. Ezután az immunjelölésre szánt grideket GABA antiszérum cseppjére helyeztük, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Többször cserélt PBS-ben történő mosást követően a grideket 2 órára 12 nm-es arany szemcse-konjugált anti-nyúl IgG szérumot tartalmazó oldat (1:30 PBS-ben oldva) cseppjére helyeztük át. A grideket ezután desztillált vízcseppekkel mostuk, majd telített uranil-acetáttal és Reynolds-féle ólom citráttal kontrasztosítottuk, majd JEOL 1200C transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.6. Az eredmények kiértékelése

A kvantitatív fénymikroszkópos adatfeldolgozáshoz totálpreparátumokat és félvékony sorozatmetszeteket használtunk. Az egyes szelvényekre jellemző átlagos GABA-IR sejtszámot 4-12 egyedből származó minták vizsgálata alapján határoztuk meg. Az eredmények kiértékeléséhez átlag- és szórás számítást, a statisztikai értékeléshez variancia (ANOVA) analízist használtunk felhasználva az SPSS 17.0 statisztikai programot (SPSS Inc., Chicago, USA).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az érzékszervek eloszlási mintázatának meghatározása

Az *Eisenia fetida* és a *Limnodrilus hoffmeisteri* bőrízomtömlőjében elhelyezkedő érzékszervek felszíni morfológiáját és eloszlási mintázatát pásztázó elektronmikroszkópos technika segítségével határoztuk meg. A mikrofotókat denzitástopográfiai felületkonverziót követően háromdimenzióssá alakítottuk.

4.1.1. Érzékszervek felszíni vizsgálata

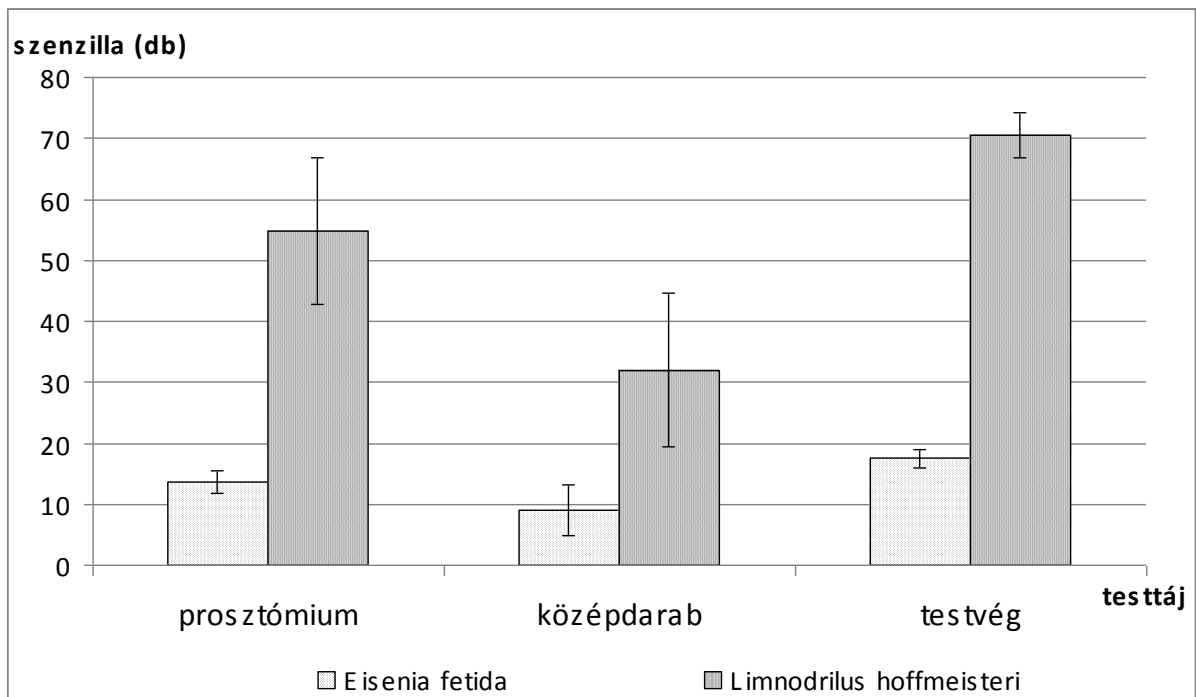
A szkennung elektronmikroszkópos vizsgálataink során a proztómium, a középdarab- és a testvég szelvények (utolsó 3 szelvény) felszínét tanulmányoztuk. Az epithélium felülete mindkét fajban árkokkal, barázdákkal sűrűn tagolt, ezek morfológiailag igen heterogének voltak a vizsgált testszelvényekben.

A penetratív primer érzékhámsejtekből felépülő érzékszervek, mint a testfelszín kitüremkedései könnyen azonosíthatóak voltak az alkalmazott módszerrel (9A-E; 10A-F. ábra). Ezek jellemzően a felszín árkokkal körülvevett mélyedéseiben helyezkedtek el. Nagyobb nagyításon a penetratív érzéksejtek csillói is láthatóak voltak (9B; 10B. ábra). A szenzillák eloszlási mintázatát meghatároztuk a vizsgált testrégiókban.

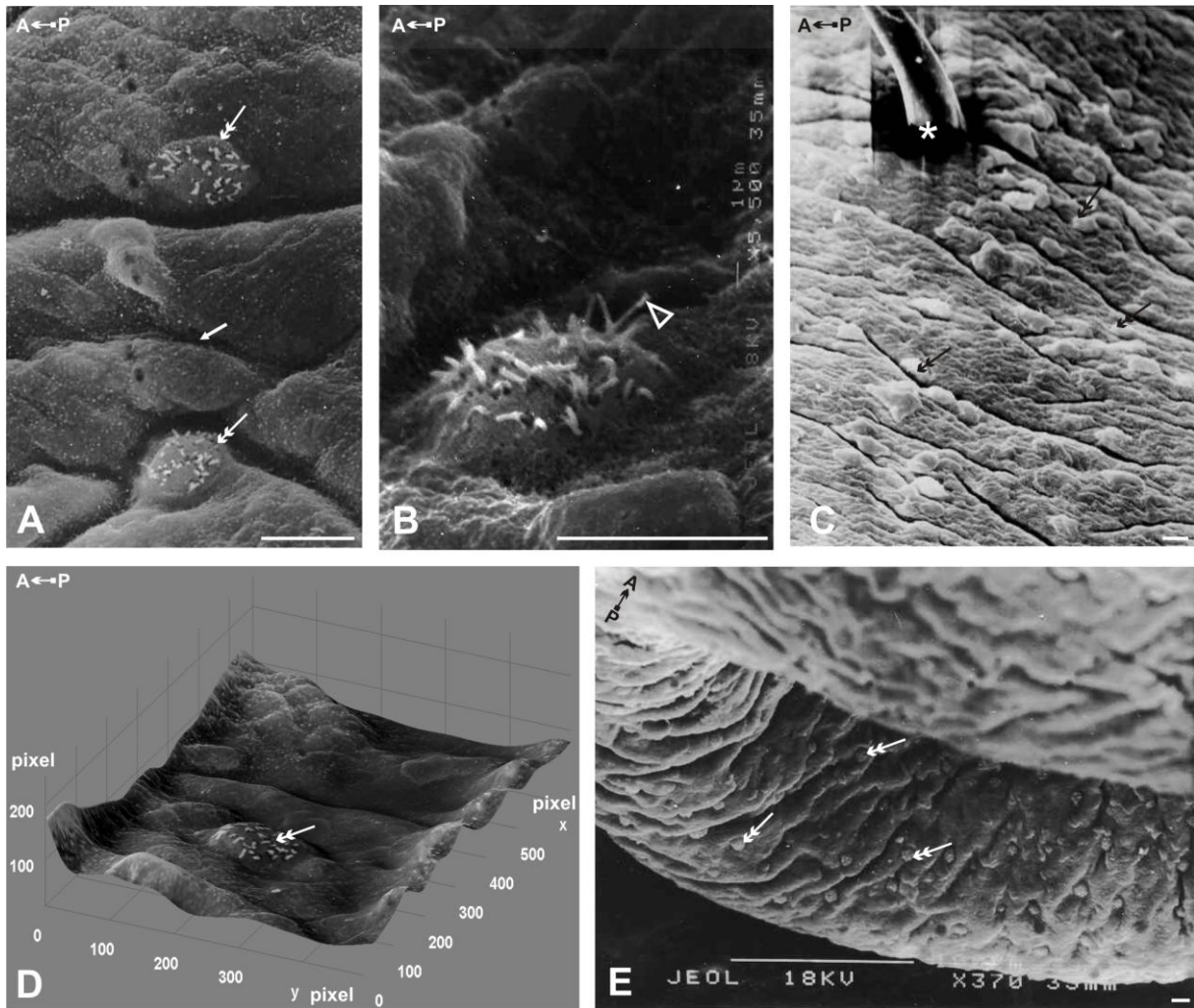
Az *Eisenia fetida* testfelületének vizsgálata során a proztómium ($n=2$) területén nagy számban találtunk szórtan, egymáshoz közel -átlagban $15 \mu\text{m}$ ($\pm 7,25 \mu\text{m}$)- elhelyezkedő érzékbimbókat. Ezek szabályos félgömb morfológiával jellemezhetőek, az átmérőjük átlagosan $8 \mu\text{m}$ ($\pm 2,38 \mu\text{m}$). Az érzékszervek penetratív csillókban gazdagok voltak, amelyek $1-3 \mu\text{m}$ -re emelkedtek ki a kutikula síkjából, eloszlásuk a szenzillák apikális részén teljesen egyenletes volt. A proztómiális lebeny egész területén az érzékbimbók egyenletesen helyezkedtek el. Lokális érzékszervcsoportosulást egyik vizsgált mintán sem tapasztaltunk. A test rosztrokaudális tengelyén haladva az érzékszervek mintázata egyre kifejezettebbé vált. A szenzillák a középdarab szelvényeiben ($n=5$) szabályosan ismétlődő eloszlási mintázatot mutattak. A legnagyobb számban a szelvények közepén végighúzódo sertesorban voltak megtalálhatóak. Az epithél síkjából kiemelkedő érzékbimbók ezen a területen olyan sűrűn helyezkedtek el, hogy az egyes szenzillák identifikálása számos esetben gondot okozott, az elmosódo érzékszervhatárok miatt. Nagyobb nagyítást alkalmazva megállapítottuk, hogy a

legtöbb érzékszervet a serték közvetlen közelében, a sertetokok mentén találjuk (9C. ábra). A sertesortól anterior és poszterior irányba haladva a szenzillák száma folyamatosan csökkent egészen a szelvényhatárokig. Ezeken a területeken a sertesorra jellemző érzékszerv csoportosulás nem volt jellemző. A középdarab szelvényeiben előforduló érzékszervek kerek alakúak voltak, azonban jellemzően előfordultak ovális morfológiával rendelkezők is. Az eloszlási mintázatukat vizsgálva nem találtunk az egyes típusokra jellemző speciális eloszlást, a két típus random módon volt jelen a testfelszínen. Az átlagos szenzillaátmérőt $10\ \mu\text{m}$ -nek (min.: $6\ \mu\text{m}$, max.: $12,5\ \mu\text{m}$, $\pm 2,3\ \mu\text{m}$; $n=16$) találtuk. Az érzékbimbót alkotó penetratív primer érzékhámsejtek csillói jól láthatóan a szenzilla tetején szórtan helyezkednek el. Az érzékszervenkénti csillószámot posztklitelláris szelvények szenzilláiban ($n=13$) határoztuk meg, kalkulációink alapján az érzékszervek átlagosan 38 db csillót tartalmaztak (min.: 25 db, max.: 63 db, $\pm 12,39\ \mu\text{m}$). A kaudális testszelvényekben ($n=3$) ismét megnőtt az érzékszervek száma, a sertesor egysége itt már nem olyan kifejezett (1. grafikon). Az utolsó testszelvényben, a pygidium területén pedig már szórt eloszlási mintázatot találunk (9E. ábra) és a prosztómiumra jellemző kisméretű, kerek érzékszervtípus volt az általános. A középdarabra jellemző csoportosulások nem voltak jellemzőek, az egyes érzékszervek könnyen azonosíthatóak voltak. A szenzillák ezeken a területeken is a hosszan elhúzóódó epithéliális hasadékok mentén helyezkedtek el.

Hasonló eloszlási mintázatot találtuk a *Limnodrilus hoffmeisteri* érzékszerveinek vizsgálata során (1. grafikon). Az igen hosszú, $3-4,5\ \mu\text{m}$ -es apikális csillónyúlványokkal rendelkező érzékszervek a prosztómium területén random eloszlási mintázatot mutattak (10A, B. ábra). Az elülső és a hátulsó testvég szelvényeiben nagy számban találtunk kisméretű ($2-3\ \mu\text{m}$ átmérőjű) csillós szenzillát. A középdarab szelvényeiben két érzékszervtípust tudtunk elkülöníteni: csillós és csilló nélküli szenzillát. A könnyen beazonosítható csillós típusú érzékszervek a szelvények közepén, a sertesorban tömörültek, míg a csilló-mentes típus általában a szelvények hátsó területein fordultak elő (10C, D. ábra). A testvég szelvényeiben az anterior szelvényekre jellemző szórt eloszlási mintázat volt megfigyelhető (10E, F. ábra).

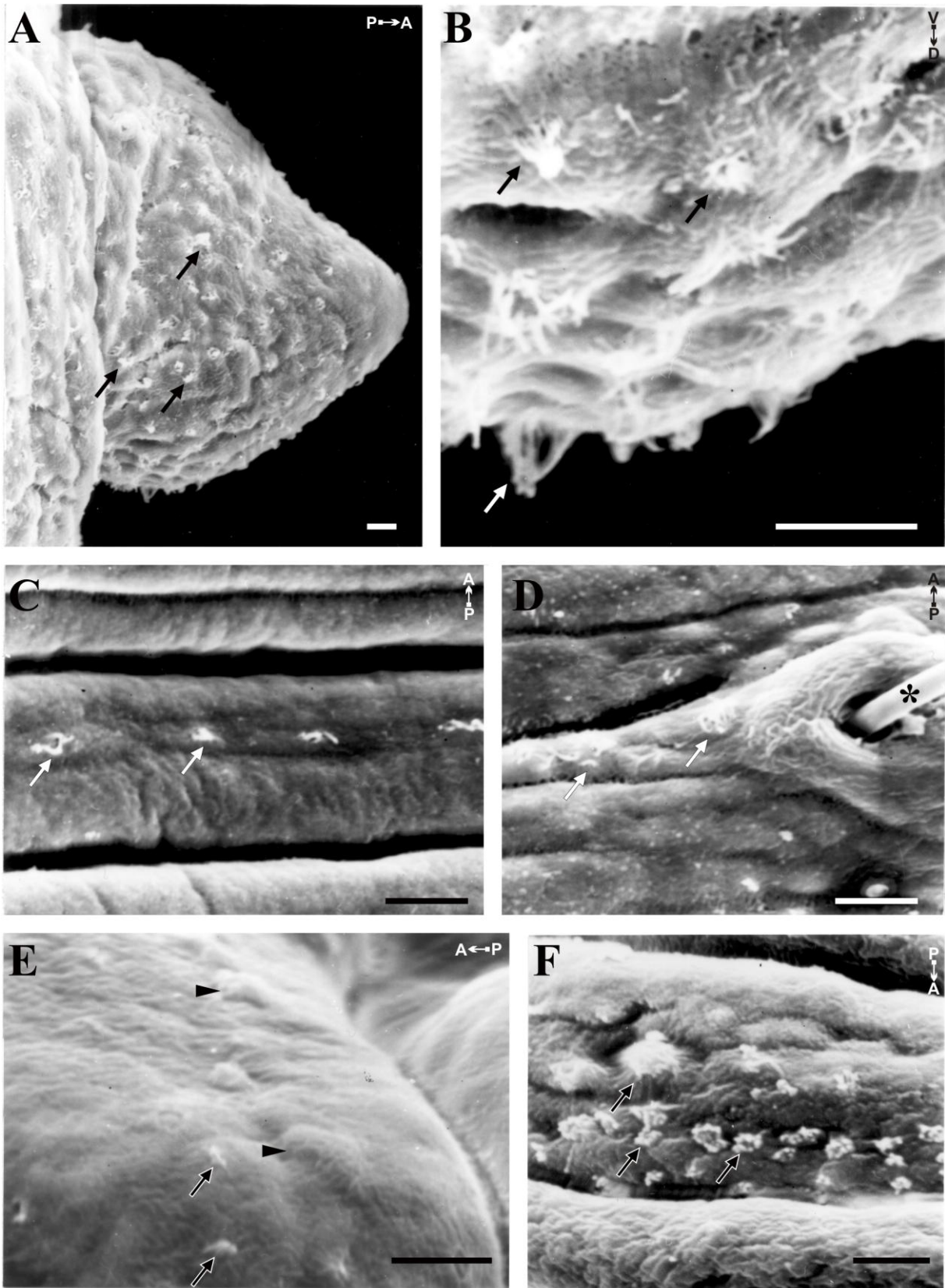


1. grafikon. Az érzékszervek eloszlási jellegzetességei *Eisenia fetida* és *Limnodrilus hoffmeisteri* egyes testrégióiban (szkenning elektronmikroszkópos felvételek kiértékelései alapján). A szenzillák darabszáma $100 \mu\text{m}^2$ egységterületre vonatkoztatva értendő. A prosztóriumok ($n=2$) mindegyikén 5 db, a középdarab szelvényeken ($n=5$) 16db, míg a testvégen ($n=3$) 8db, $100 \mu\text{m}^2$ -os terület eredményeit használtuk fel.



9. ábra Szkenning elektronmikroszkópos felvételek az *Eisenia fetida* bőrizomtömlőjéről. **A-B.** Az epidermisz síkjából kiemelkedő érzékszerveken a penetratív érzéksjtek csillói jól kivehetők. **C.** A sertesorban, valamint a sertetek körül rendeződött érzékszervek. **D.** Intenzitástopográfiai háromdimenziós rekonstrukció az *Eisenia fetida* bőrizomtömlőjéről. **E.** A testvég szkenning szenzilláinak eloszlási mintázata. Nyíl: felületi hasadék, kettős fejű nyíl: érzékszerv, üres nyílhegy: a penetratív érzéksjtek csillói, csillag: sertetek, A-P: anterior-posterior irány.

Aránymérték: 10 μm



10. ábra Szkenning elektronmikroszkópos felvételek a *Limnodrilus hoffmeisteri* testfelszínéről. **A-B.** A prostómium érzékszerveinek eloszlási mintázata. **C-E.** Érzékszervek elhelyezkedése a közepdarab szelvényekben. **F.** A testvég érzékbimbói nagy nagyítású képen. Nyilak: csillós érzéksajt, nyílhegy: érzékszerv, csillag: serte, A-P: anterior-poszterior irány.

Aránymérték: 10 μ m

4.2. Szenzoros rendszer vizsgálata pályajelöléssel

Ezeket a vizsgálatokat kifejezett *Lumbricus terrestris* egyedeken végeztük.

4.2.1. DiI-töltések eredményei

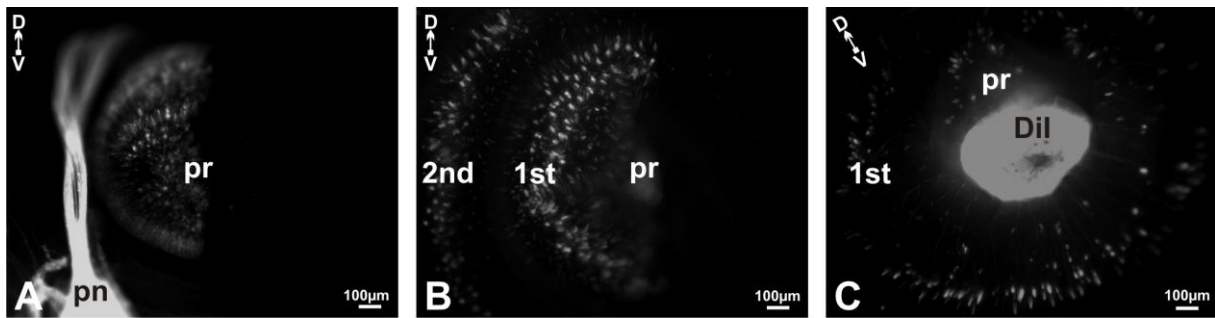
A DiI-töltést követően a bőrízomtömlő és a hasdúclánc jelölt szenzoros struktúráit vizsgáltuk totál, illetve keresztmetszeti preparátumokon, nagy felbontású, kompenzált konfokális képalkotást alkalmazva.

4.2.1.1. Perifériás szenzoros struktúrák

4.2.1.1.1. A prosztómium és az orális régió (1-3. testszelvény)

Izolációs preparálást követően a prosztómiális ideget töltöttük DiI-al. A testfelszín vizsgálva erősen fluoreszkáló sejttesteket találtunk az epidermisz síkjában, amelyeket primer érzékhámsejteként azonosítottuk. A fluoreszcens jelek jellemzően a vizsgált szelvények egyik -a töltött prosztómiális ideggel megegyező- oldalára korlátozódtak, így meg tudtuk határozni az egy prosztómiális ideghez tartozó szenzoros régió területét (11A. ábra). Hosszabb inkubációs időt alkalmazva, jelölt sejtalakok jelentek meg a szelvények szemközti oldalán, azonban lényegesen kisebb számban (11B. ábra). Az érzéksejtek nagyobb érzékbimbókba csoportosultak, amelyek palack alakú morfológiával és átlagosan $30\ \mu\text{m}$ ($\pm 8\ \mu\text{m}$) átmérővel voltak jellemezhetőek. Az egész prosztómium területén egységes eloszlást mutattak, a területegységre vonatkoztatott átlagos sűrűségük $7/100\ \mu\text{m}^2$, $\pm 1,5\ \mu\text{m}$ ($n=15$) volt. A sok esetben túlszaturált fluoreszcens jelek ezekben a szelvényekben nem tették lehetővé az érzékszervek részletes tanulmányozását.

DiI jelölést alkalmazva közvetlenül a prosztómiális epithél felszínén primer érzékhámsejtek és azok nyúlványrendszere volt látható az első néhány szelvényben. A sejteloszlás ezeken a területeken is szórt mintázatot mutatott, a jelölt sejtek azonban jóval kisebb számban voltak jelen, mint a prosztómium területén (11C. ábra).



11. ábra. Jelölt szenzoros sejtek a *Lumbricus terrestris* anterior szelvényeiben. **A.** DiI-al jelölt primer érzékhámsejtek a prosztómium epithéljében a jobb oldali prosztómiális ideg töltését követően. A töltött idegcsonk izolálás után ki lett emelve a testüregből. **B.** A jelölt szenzoros sejtek eloszlási mintázata a prosztómium és az első két szelvény területén az egyik oldali prosztómiális ideg töltése után. Ez a kép 25 optikai réteg átlagos intenzitáson alapuló összevonásának eredménye. **C.** Szenzoros sejtek az első szelvényben. A DiI kristályt ebben az esetben közvetlenül a prosztómiális epithélre helyeztük. pr: prosztómium, pn: prosztómiális ideg, 1st: első testszelvény, 2nd: második testszelvény, DiI: DiI kristály, D-V: dorzo-ventrális irány.

Aránymérték: 100 μm

4.2.1.1.2. A középdarab és a testvég

A kísérlet során DiI kristályt injektáltunk a VNC ganglion laterális részébe, majd megfelelő inkubációs időt alkalmazva a szelvények epidermális felszínét tanulmányoztuk. Két jelölt szenzoros struktúrát sikerült megfigyelnünk, amelyek a következők voltak: szabad idegvégződés (12A. ábra) és primer érzékhámsejt (12B. ábra).

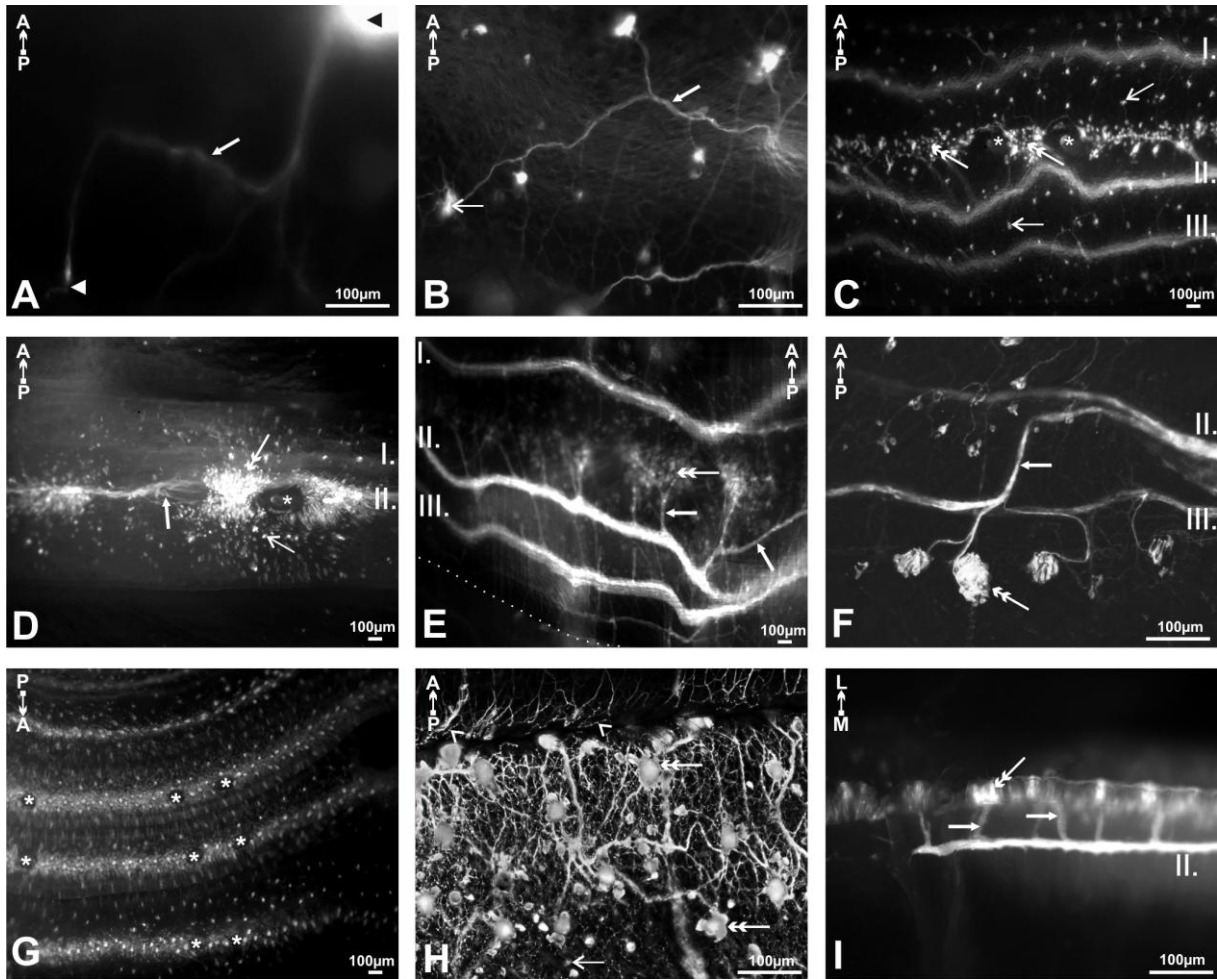
Az epidermisz támasztó és mirigysejtjei között vékony, hosszan húzódó rostok jelölődtek, amelyeket szabad idegvégződésként azonosítottunk. Kimutattuk, hogy ezek a struktúrák közvetlen összeköttetésben vannak a szegmentális idegekkel. Viszonylag kis darabszámban, átlagosan 3-5 db/100 μm^2 fordultak elő a vizsgált szelvényekben, de egyes régiókban (amelyek szintén 100 μm^2 területűek voltak) akár 20 darabot is meg tudunk számolni. A szenzoros sejtek 8-10 μm átmérőjűek voltak, a legtöbbjük érzékszervekbe csoportosulva a szelvény közepén húzódó sertesorban helyezkedett el (12C, D. ábra).

Ezekben a szelvényekben a szenzillákat nagy morfológiai heterogenitás jellemezte. Egy átlagos nagyságú (450000 μm^2) középdarab szelvényben előfordultak 50 μm átmérőjűtől

egészen a 300 μm átmérőjüig. A szenzillák nagysága erős korrelációt mutatott a szenzillát alkotó sejtek számával. A kisméretű szenzillák, amik elszórtan az egész szelvény területén megfigyelhetőek voltak, jellemzően kevés számú, 5-10 darab szenzoros sejtet tartalmaztak. A nagyméretű érzékszervek, amelyek a sertesorba tömörültek (3-5 szenzilla 100 μm -enként), akár 30-40 érzéksejtet is magukba foglalhattak (12D. ábra).

A sertesor szenzoros struktúráinak elhelyezkedése egybeesett a II. szegmentális ideg pozíciójával (12 E, C, F, I. ábra). A háromdimenziós szkennelés lehetővé tette számunkra, hogy nagy felbontásban tudjuk vizsgálni a mélyebb szinten elhelyezkedő jelölt struktúrákat. Kimutattuk, hogy a szelvények első harmadában elhelyezkedő szenzoros sejtek központi nyúlványai az I. szegmentális, míg a sertesorban elhelyezkedők a II. szegmentális idegen keresztül léptek be a ventrális dúcokba. A III. szegmentális ideg a szelvények hátulsó harmadában lokalizálódó szenzoros sejtek nyúlványait gyűjti össze. Az itt jellemzett eloszlási mintázat az állat legtöbb szelvényére jellemző volt.

Az állat hossztengelyén kaudális irányba haladva a poszterior szelvényekben a jelölt sejtek sűrűségének növekedése, és ezzel párhuzamban a sertesor dominanciájának fokozatos felbomlása volt megfigyelhető. Az utolsó (3-4) szelvényekben a sertesor már nehezen, vagy egyáltalán nem volt azonosítható. A poszterior szelvények sejteloszlási mintázata az anterior szelvények mintázatához volt hasonló (12G. ábra).



12. ábra. Detektált szenzoros elemek a közepdarab és a testvég szelvényeiben DiI töltést követően. **A-B.** Szabad idegvégződés, primer szenzoros sejt és ezek nyúlványai a testfal epithél rétegében. **C.** A primer érzékhámsejtek jellegzetes eloszlási mintázata a közepdarab szelvényekben. Jól látható, hogy a szenzoros sejtek a szegmentális idegek pozíciójának megfelelően rendeződnek. **D.** A szenzoros sejtek érzékszervekbe csoportosulnak a serték körül. **E-F.** Szenzillák szerkezete és nyúlványrendszerük, illetve azok pozíciói a szegmentális idegekhez viszonyítva. **G.** Tipikus eloszlási mintázat a testvég szelvényeiben. **H.** Konfokális felvétel a szubepidermális plexus rostjairól. **I.** Keresztmetszeti preparátum, jelölt szenzoros struktúrákkal: szenzilla érzéksejtek nyúlványai és a II. szegmentális ideg. Fehér nyílhegy: szabad idegvégződés, fekete nyílhegy: a kettős szegmentális ideg részlete, hegyes nyíl: primer érzéksejt, nyíl: érzéksejt nyúlványa, I. II. III.: a szegmentális idegek pozíciója, dupla fejtű nyíl: érzékszervek, csillag: serte, A-P: anterior-poszterior irány, L-M: laterális-mediális irány.

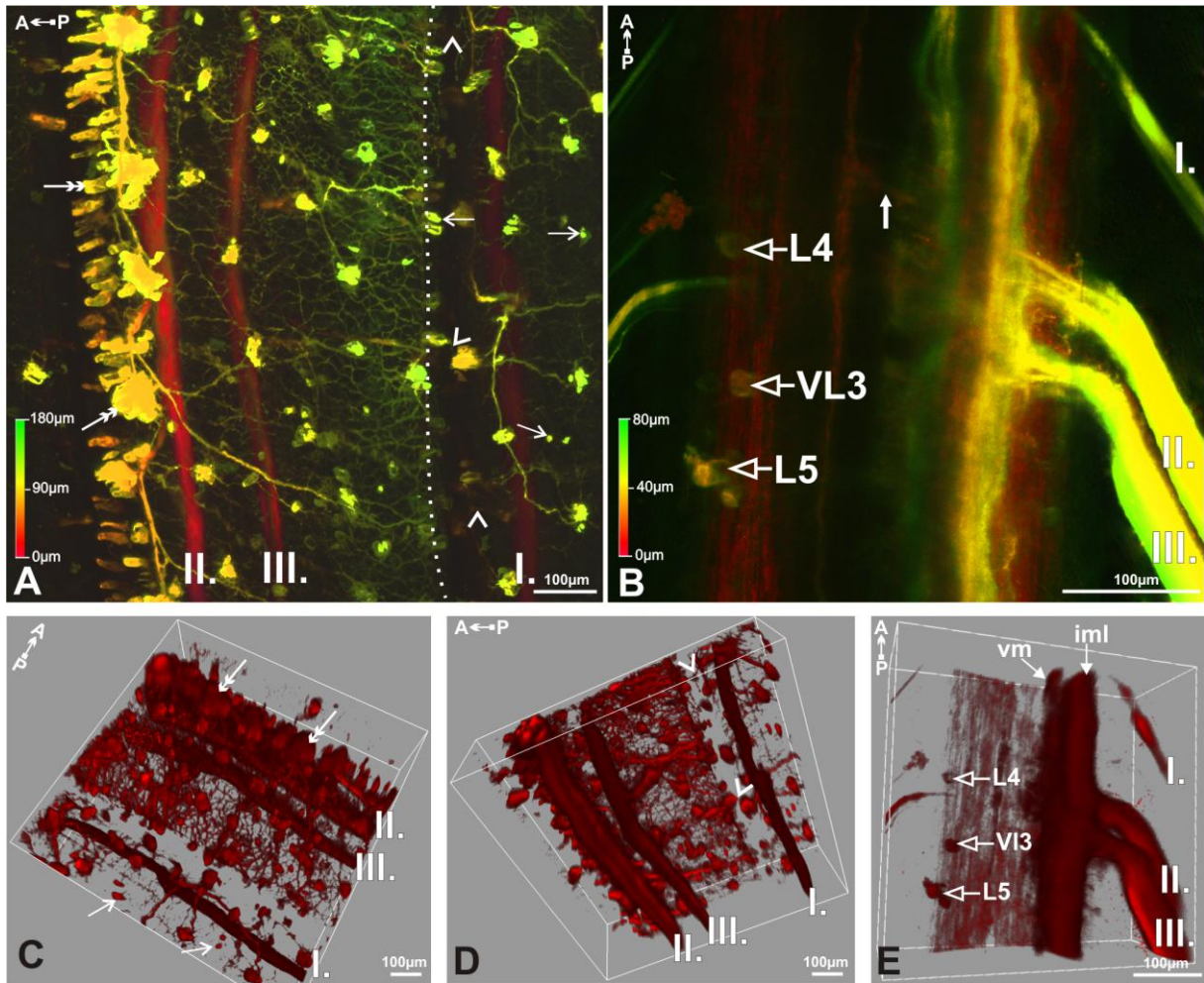
Aránymérték: 100 μ m

4.2.1.1.3. A szubepidermális plexus rostjai

A legtöbb esetben a szenzoros sejtek nyúlványai egy sűrű hálózatot alkottak a hám és az izomréteg határán. Ebben a struktúrában találtunk rostokat, amelyek szenzoros sejtek vagy érzékszervek között biztosítottak kapcsolatot, illetve szabad idegvégződésenként az epidermisz különböző szintjein végződtek. Ezt a hálózatot szubepidermális plexusként azonosítottuk, amelyet a szenzoros sejtek perifériás nyúlványai alkotnak. A plexus rostjai körülvették az epidermisz támasztó, illetve mirigysejtjeit, amelyeket a jellegzetes sejtalakjuk és a sejtmagjaik elhelyezkedése alapján tudunk beazonosítani. Követve a rostok lefutásait, nagyobb nagytárasan a szenzoros sejtek lehetséges kapcsolódási helyeit is sikerült beazonosítanunk.

Az érzékszervek centrális nyúlványai vastagabb, erős fluoreszcens jelet reprezentáló idegágakba szedődtek össze. A sertesor szenzilláinak nyúlványrendszerét vizsgálva kimutattuk, hogy egy karakterisztikus fágszerű anatómiai struktúrát képezve (12E; 13A, C, D. ábra) vastagabb rostokba szedődnek össze, majd a II. szegmentális ideg irányába futnak tovább.

A szegmentális idegek elhelyezkedését és elágazódásait több preparátumon vizsgáltuk. Az egyes szegmentális idegek között vékony haránt-összeköttetéseket sikerült kimutatnunk. Némelyek ezek közül a szomszédos szelvény területeire is áthúzódtak (12F, H. ábra).



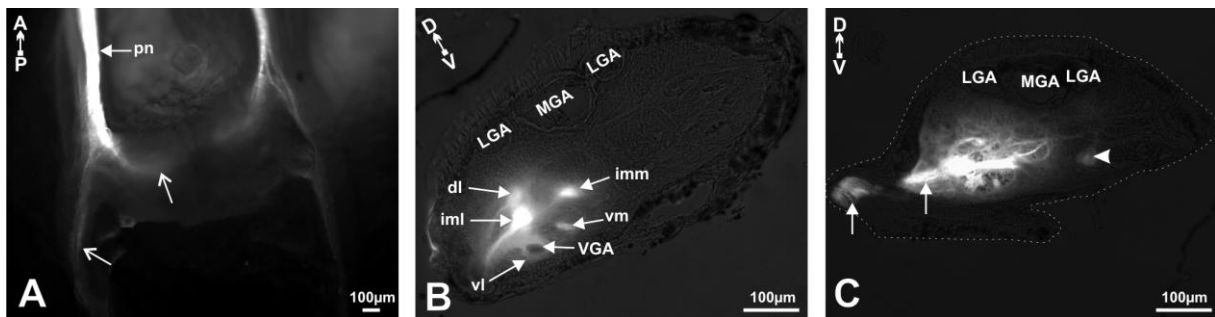
13. ábra. **A, C, D.** Háromdimenziós konfokális felvételek két szomszédos szelvény határán elhelyezkedő szenzoros struktúrákról. Interszegmentálisan futó jelölt rostokat csak kis számban találtunk. **B, E.** A szenzoros rendszer központi reprezentációja. Laterálisan, közvetlenül a ganglionok alatt jelölt centrális sejteket azonosítottunk. A centrális neuropilben kereszteződő rostokat is kimutattunk retrográd töltést alkalmazva. I. II. III.: a szegmentális idegek pozícióit jelöli, hegyes nyílhegy: interszegmentális rostok, VL3, L4, L5: azonosított centrális sejtalakok, dupla fejű nyíl: érzékszervek, nyíl: centrális neuropilben kereszteződő rostok, A-P: anterior-poszterior irány.

Aránymérték: 100 μm

4.2.1.2. Szenzoros struktúrák a központi idegrendszerben

4.2.1.2.1. Szenzoros reprezentáció az agyban

DiI-jelölést alkalmazva közvetlenül a prosztómiális felszínen a szenzoros sejtek nyúlványrendszerét sikerült láthatóvá tenni. Követve a rostokat megfigyeltük, hogy az azonos oldali prosztómiális idegen keresztül az agyi ganglionokba futnak. Az inkubációs idő alatt elsőként a prosztómiális idegek jelölődtek, majd később fluoreszcens rostok jelentek meg mindkét agyi hemiganglion anterior régiójában. Néhány rost közvetlenül a ganglion neuropil régiójába futott és a ganglion elülső részén végződött. Más rostok keresztülfutottak a ganglion laterális oldalán és elágazódás nélkül az oesophageális ganglion irányában futottak tovább (14A. ábra).



14. ábra. A-C. Jelölt szenzoros struktúrák a központi idegrendszerben. **A.** A prosztómium érzékszeteiből eredő nyúlványok reprezentációja az agyban. Jelölt rostok láthatóak a prosztómiális idegben, az agy bal oldali hemiganglionjában és a garatkonnectívumban. **B-C.** DiI jelölt rostok a hasdúc ganglionjaiban. A ganglion másik felében -szemközt a jelölt ganglionféllel- festődött sejtesteket detektáltunk. pn: prosztómiális ideg, hegyes nyíl: jelölt rostok, pontozott vonal: a ganglion határa, VGA: ventrális óriásaxon, MGA: mediális óriásaxon, LGA: laterális óriásaxon, dl: dorzolaterális köteg, iml: intermedio-laterális köteg, imm: intermedio-mediális köteg, vm: ventromediális köteg, vl:ventrolaterális köteg, nyílhegy: jelölt centrális sejt, A-P: anterior-poszterior irány, D-V: dorzális-ventrális irány.

Aránymérték: 100 μ m

4.2.1.2.2. Jelölt rostok a hasdúcláncban

A posztklitelláris szelvények hámrétegének felső részén alkalmazott DiI jelölést követően a szenzoros rendszer központi reprezentációját vizsgáltuk. A hasdúclánc ganglionjaiba a jelölt szenzoros rostok a három pár szegmentális idegen keresztül érkeztek, majd ezt követően a beszájadzások után közvetlenül az idegyökér magasságában, a ganglion laterális részén T-alakban elágazódtak (13B, E. ábra). A ventrális ganglionok keresztmetszeti preparátumait tanulmányozva öt pár jelölődött hosszanti axonköteget sikerült kimutatnunk a neuropil régióban, amelyeket pozícióik alapján szenzoros kötegekként azonosítottunk. Ezek az intermedio-laterális, intermediális, ventrolaterális, ventromediális és a dorzális kötegek voltak. Erős fluoreszcencia szignált mutattunk ki a ventrális óriásaxon közvetlen közelében a ventrolaterális és a ventromediális axonok körül (14B. ábra). A rostok mellett sejtalakok is jelölődtek, amelyeket centrális szenzoros sejtekként azonosítottunk. Ezek a sejtek a legtöbb esetben közvetlenül a jelölt axonkötegek mentén helyezkedtek el, vagy a jelölt rostokkal szemközti ganglionfélben. A jelölődött központi struktúrák anatómiai leírásakor a Günther (1971) által a *-Lumbricus terrestris* VNC ganglionjára- bevezetett nomenklatúrát alkalmaztuk. A jelölt sejttestek és nyúlványok pozícióját mind totálpreparátumokon (13B, E. ábra), mind pedig egymást követő sorozatmetszeteken tanulmányoztuk (14B, C. ábra). A konfokális felvételeken jól látszik, hogy a jelölődött sejtek a ganglion ventrolaterális ill. laterális régióira korlátozódtak. A sejttestek, amelyek a ventrolaterális régióban, a III. szegmentális ideg magasságában helyezkedtek el VL3-as neuronokként lettek azonosítva (13B, E. ábra). Ezeket a sejteket a kisméretű szóma (5-8 μm) és vékony, rövid lefutású nyúlvány jellemezte, amely a centrális neuropilbe futva a longitudinális, interganglionális pályák kialakításában vett részt. A ganglionok laterális régiójának jelölt sejtjei kisméretű, kerek sejttesttel voltak jellemezhetőek, pozíciójukat tekintve a II. és III. szegmentális idegyökerek között (L4), illetve a III. szegmentális ideg beszájadzása alatt (L5) helyezkedtek el. A sejtek varikozitásokban gazdag nyúlványai az interganglionális rostkötegekhez csatlakoztak. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a rostkötegek keresztmetszete ganglionról ganglionra változatlan, állandó maradt. A rostok lefutásuk során mindvégig megtartották kontinuitásukat, megszakításokat nem detektáltunk sem a ganglionok, sem pedig a konnektívumok területén. A legtöbb rost longitudinális elhelyezkedésű volt, de találtunk néhány kereszteződő rostot, a dorzális régióban, a I. és a II. szegmentális idegyökér magasságában (13B. ábra).

Izolált ganglion töltésekor fluoreszcens jelet detektáltunk mind a három szegmentális idegben. A testfal vizsgálatai során azt tapasztaltuk, hogy a jelölt érzékhámsejtek többsége egy -a töltött ganglionhoz tartozó- szelvényre koncentrálódott. Vékony, interszegmentálisan futó rostokat is sikerült kimutatnunk a szelvényhatároknál, de csak igen kis számban (13A, D. ábra).

4.2.2. Lucifer yellow-töltések eredményei

A töltéseket preparált, túlélő bőrizomtömlő-ideg mintákon végeztük. A mintákat epifluoreszcens fénymikroszkóppal értékeltük ki közvetlenül az iontoforézist követően.

4.2.2.1. Perifériás szenzoros struktúrák

Tapasztalataink alapján a töltési idővel egyenes arányban nőtt a jelölődött struktúrák száma, így igyekeztünk hosszú töltési időket alkalmazni (min. 3, max. 6 óra). A túlzottan hosszú töltés gyakran az ideg beszáradásához vezetett, így az iontoforézis optimális idejét mindig az aktuális preparátum fiziológiai állapotának megfelelően választottuk meg.

4.2.2.1.1. A prosztómium és a középdarab

Az izolált prosztómiális ideg töltését követően az epithél felületét vizsgáltuk az anterior testszelvényekben. A prosztómium és az első testszelvény területén jelölt primer érzékhámsejteket detektáltunk. A jelölt sejtek követték a szelvényekre jellemző jellegzetes eloszlási mintázatot. Az egyoldali prosztómiális ideg töltését követően a prosztómium és az első szelvény teljes területén tapasztaltunk jelölődést (15A. ábra). Különböző idejű iontoforézist alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy elsőként a szelvények dorzális oldalán elhelyezkedő sejtek jelölődtek, majd fokozatosan a laterális és a ventrális régiókban levők.

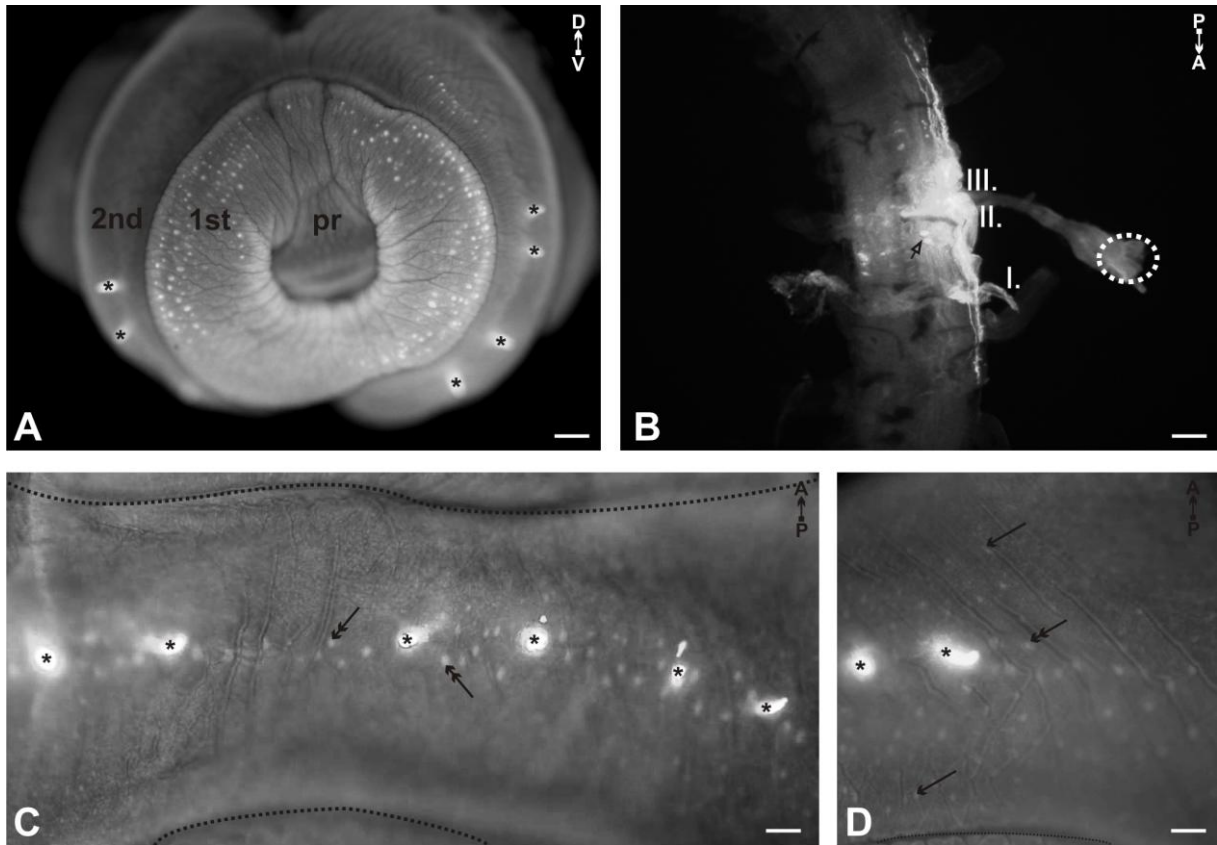
A középdarab szelvényeiben, az izolált szegmentális ideg perifériás töltését követően a régióra jellemző eloszlási mintázatot találtunk. A preparátumokon a sertesor dominanciája jól detektálható volt (15C. ábra). Szenzála csoportosult és magányos sejtalakokat egyaránt ki tudtunk mutatni (15D. ábra). A középdarab szelvények iontoforézisét megnehezítette a túlélő preparátum nehézkes anesztéziája. A töltés alatt felébredő motoros aktivitás miatt sok esetben fel kellett függesztenünk a kísérletet.

4.2.2.2. Szenzoros struktúrák a hasdúcláncban

A ventrális gangliontól izolált, szegmentális idegcsont, központ felé irányuló töltését követően hosszanti lefutású rostok és centrális idegsejtek egyaránt jelölődtek.

A rostokat pozíciójuk alapján az intermedio-laterális és a dorzális érzőpályákként azonosítottuk. A vizsgálataink során az első szegmentális ideget önállóan, a második és harmadik szegmentális ideget anatómiai közelségük miatt együtt emeltük a töltőkanülre. Megállapítottuk, hogy az első szegmentális idegben futó axonok a ganglionban dorzokontralaterálisan, ill. ventromediálisan elhelyezkedő perikarionokból indulnak ki. Ezek a sejtestek relatíve kisméretűek voltak (20-25 μm), de előfordultak nagyobb (35 μm) sejthalakok is. A második és harmadik szegmentális ideghez tartozó neuronok elhelyezkedésük alapján kontralaterálisak, mediális helyzetűek vagy ipszilaterálisak lehetnek. Ezek között találtunk igen nagy (40 μm) átmérővel rendelkező sejthalakokat is (15B. ábra).

Mindhárom szegmentális ideg töltése során mind az előtte, mind a mögötte elhelyezkedő szomszédos ganglionokban találtunk jelölt neuronokat. Az anterior irányban fekvő szomszédos ganglionban a neuronok a második és harmadik szegmentális ideg vonalában ventromediálisan, valamint az ipszi- és kontralaterális oldalon ventrálisan és ventrolaterálisan helyezkedtek el. A poszterior irányban elhelyezkedő ganglionban az első szegmentális ideg eredésénél, az ipszilaterális oldalon, ventrálisan és ventrolaterálisan találtunk jelölődött szómákat. Az azonosított neuronok alapján megállapítottuk, hogy minden szegmentális idegben fut olyan axon, amelynek perikarionja valamely szomszédos ganglionban található.



15. ábra A-B. Lucifer yellow-al töltött szenzoros elemek. **A.** A jobb oldali szegmentális ideg töltését követően jelölt szenzoros sejteket detektáltunk a prosztómium, illetve az első valamint -kis számban- a második anterior testszelvényekben. **B.** A második és a harmadik szegmentális idegek töltését követően szenzoros rostok és centrális sejttestek egyaránt jelölődtek. **C-D.** Jelölt szenzoros sejtek a középdarab sertesorában. pr: prosztómium, 1st: első testszelvény, 2nd: második testszelvény, I. II. III.: szegmentális idegek pontozott vonal: töltött idegcsomk, üres nyíl: centrális idegsejt, nyíl: magányos érzékejt, kettős nyíl: érzékejt, csillag: serték pozíciója, A-P: anterior-poszterior irány, D-V: dorzális-ventrális irány.

Aránymérték: 50 μ m

4.3. Ultrastrukturális vizsgálatok

4.3.1. Konvencionális elektronmikroszkópia

Konvencionális elektronmikroszkópos vizsgálataink során részletesen vizsgáltuk az *Eisenia fetida* szenzoros rendszerének különböző részeit.

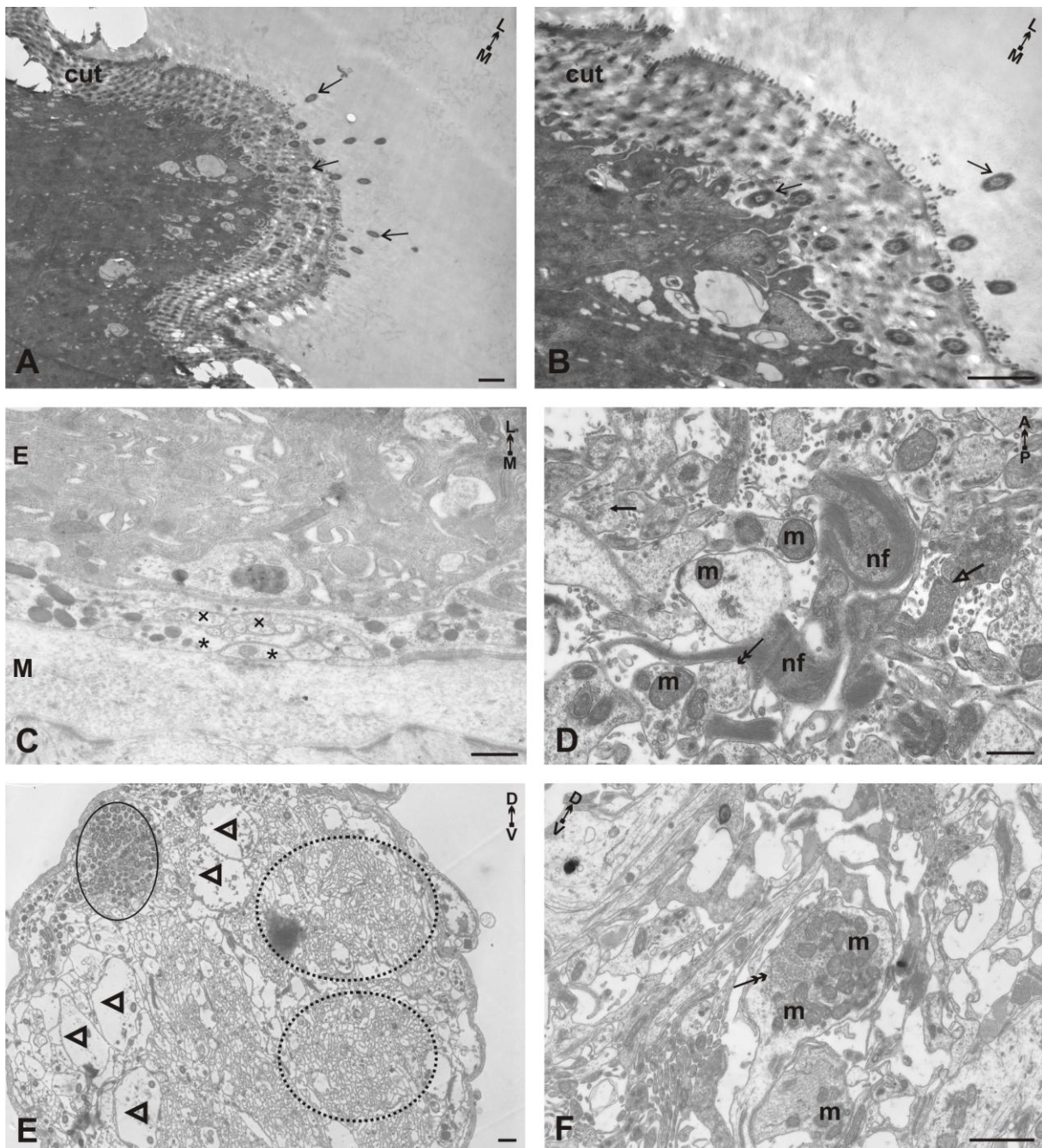
4.3.1.1. A primer érzékhámsejtek ultrastrukturális morfológiája

Mint azt korábbi vizsgálataink eredményei alapján megállapítottuk az érzékszervek eloszlási mintázatuk és morfológiai sajátosságuk alapján testtájanként különböznek. A test elülső és hátsó részén az érzékszervek nagyon hasonló anatómiai karakterrel rendelkeznek, míg az ettől eltérőek a posztklitelláris szelvényekben találhatóak. Ennek megfelelően az elektronmikroszkópos vizsgálatainkat proztómium, illetve középdarab szelvények sertesorából készült metszeteken végeztük. A bőrízomtömlő keresztmetszeti áttekintésekor a támasztó és mirigysejtek között elhelyezkedő primer érzékhámsejtek fejlett apikális csillózatuk alapján könnyen beazonosíthatóak voltak. A szenzállákban az érzéksejtek multiciliárisak voltak, uniciliáris sejteket nem sikerült detektálnunk az általunk vizsgált régiókban. A magányos sejtek között penetratív és non-penetratív sejthalakokat egyaránt találtunk, ez utóbbi azonban lényegesen ritkább volt.

Non-penetratív sejtek jellegzetesen a kutikula alsó harmadában, a sejt apikális felszínével párhuzamosan futó csillókkal rendelkeztek. Az általunk vizsgált sorozatmetszeteken ezeknek a sejteknek mindig csak egy kis része volt reprezentálva a metszési síkban, így nem tudtunk kellő részletességű ultrastrukturális jellemzést készíteni erről a sejttypusról.

A proztómium területén a penetratív sejthalakok nagy számban fordultak elő, szinte mindig érzékszervekbe tömörülve (16A. ábra). A sejtek morfológiai jellegzetességeit vizsgálva megállapítottuk, hogy az apikális oldalon kiszélesedő sejthalak volt általános. A csillók keresztmetszeti képén jól látható a szabályos 9+2-es csillószerkezetet eredményező mikrotubuluselrendeződés jól kivehető volt, valamint a hosszmetseteti képeken a csillók alapi részénél elhelyezkedő bazális test és a csillógyökér is (16B. ábra). A sejtek citoplazma szerkezete homogénnek mutatkozott, a marginális területeken kissé sötétebb, elektrondenz zónákkal. A nucleus minden esetben a környezetétől jól elkülöníthető, sötét, homogén szerkezetű, szabályos alakú volt. Sejtorganelumokat -hosszú, elnyúlt alakú

mitochondriumokat és igen fejlett Golgi rendszert- a sejtek bazális régióiban (16D, F. ábra), valamint a sejtmag közvetlen közelében sikerült kimutatnunk. Közvetlen a mag közelében sűrűn elhelyezkedő kisméretű autophag vezikulákat, valamint nagyobb méretű, denz belső tartalommal rendelkező szabad riboszómákat is sikerült kimutatnunk. A sejtek között -a tipikusan előforduló- zonula adherens sejtkapcsolatok mellett dezmoszómás kapcsolatokat is találtunk.



16. ábra. A bőrízomtömlő szenzoros elemeinek ultrastruktúrája. **A-B.** Az epidermisz síkjából kiemelkedő szenzilla keresztmetszetén, az apikális részen egy primer érzékhámsejt dendritikus nyúlványa látható a kutikulát áttörő érzékcillókkal. **C-D.** A szubepidermális plexus ultrastruktúrája. **C.** A kötőszövet és a hámréteg határán, egymás mellett futó szenzoros és motoros rostok. A szenzoros rostok agranuláris vezikulákat tartalmaznak. **D.** A hámréteg tangenciális metszetén a szubepidermális plexus részlete látható. Több idegrost és végződés átmetszete reprezentálja a plexus hálózatos szerveződését. A dense core és agranuláris (clear) vezikulákat tartalmazó idegvégzódések az ábrán jól láthatóak. Szinaptikus kapcsolatra utaló jeleket is találtunk, az ábrán két agranuláris vezikula tartalmú rost kapcsolata látható. **E.** Az egyes szegmentális ideg keresztmetszete. Jól látható, hogy a kis átmérőjű szenzoros rostok és a kis és nagy átmérőjű motoros rostok kötegekbe rendeződve az idegen belül elkülönülve futnak. **F.** A ventrális ganglion laterális neuropiljében elhelyezkedő szenzoros rostok agranuláris vezikulákat tartalmaztak nagy számban. E: epidermisz, M: izomréteg, cut: kutikula, hegyes nyíl: érzékcilló, kereszt: szenzoros rost, csillag: motoros rost, nyíl: dense core vezikula, kettős nyíl: clear vezikula, m: miktokondriumok, nf: neurofilamentum, üres nyíl: szinaptikus kapcsolat, pontozott kör: szenzoros rostok, kör: kis átmérőjű motoros rostok, üres nyílhegy: nagy átmérőjű motoros rostok, L-M: laterális-mediális irány, D-V: dorzális-ventrális irány.

Aránymérték: 1 μm

4.3.1.2. A szenzoros rostok ultrastruktúrája

Közvetlenül a bazális membrán alatt, a hám-izom határon a szubepidermális plexus rostjainak ultrastruktúráját tanulmányoztuk, különböző metszési síkot alkalmazva. Az érzékhámsejtek bazális oldala mentén nagy számban találtunk rostokat, amelyek a bazális membránnal párhuzamosan futottak (16C, D. ábra). A rostok szorosan egymás mellett egy kötegbe rendeződtek.

Keresztmetszeti preparátumokon a plexus rostjainak morfológiáját vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a rostok méret (0,3 μm -tól 2,7 μm -ig) és alak szempontjából igen heterogének. A nagy átmérőjű rostok feltételezhetően efferens motoros, míg a kis átmérővel rendelkezők szenzoros rostok keresztmetszetei voltak (16C. ábra). A rostokban vezikulafelhalmozódásokat is megfigyeltünk, amelyek különböző morfológiával rendelkeztek. A rostok között szinaptikus kapcsolatokra utaló struktúrákat is megfigyeltünk, ezek azonosítása a vezikulák felhalmozódása alapján volt általában lehetséges, mert a gerincesekre jellemző membrán-specializációk, elváltozások ritkán figyelhetők meg a gyűrűsféreg idegrendszerében. A nagy átmérőjű, feltehetően motoros axonokban ún. dense core és nagyméretű agranuláris vezikulák, míg a 0,5-1 μm vastagságú szenzoros axonokban kisméretű agranuláris vezikulák fordultak elő (16C. ábra).

A szegmentális idegek átmetszetét tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy a hasonló morfológiájú rostok az ideg egy adott részén elkülönülve kötegekbe rendeződnek (16E. ábra). Ennek megfelelően el tudtunk különíteni kis átmérőjű szenzoros, valamint kis és nagy átmérőjű motoros rostokat. Míg ez utóbbiak általában a szegmentális ideg centrális régióiban lokalizálódtak, a szenzoros rostok elhelyezkedése mind a középső, mind pedig a marginális területekre volt jellemző.

A központban a szenzoros rostokat tiszta, áttetsző citoplazma, valamint kisméretű (25-35 nm) clear vezikulafelhalmozódás jellemezte (16F. ábra). A különböző rostok a ganglion neuropil régiójában szorosan egymás mellett futottak, ugyanakkor szinapszisokat a vizsgált metszeteken nem sikerült regisztrálnunk.

4.4. GABA-immunreaktivitás a szenzoros rendszerben

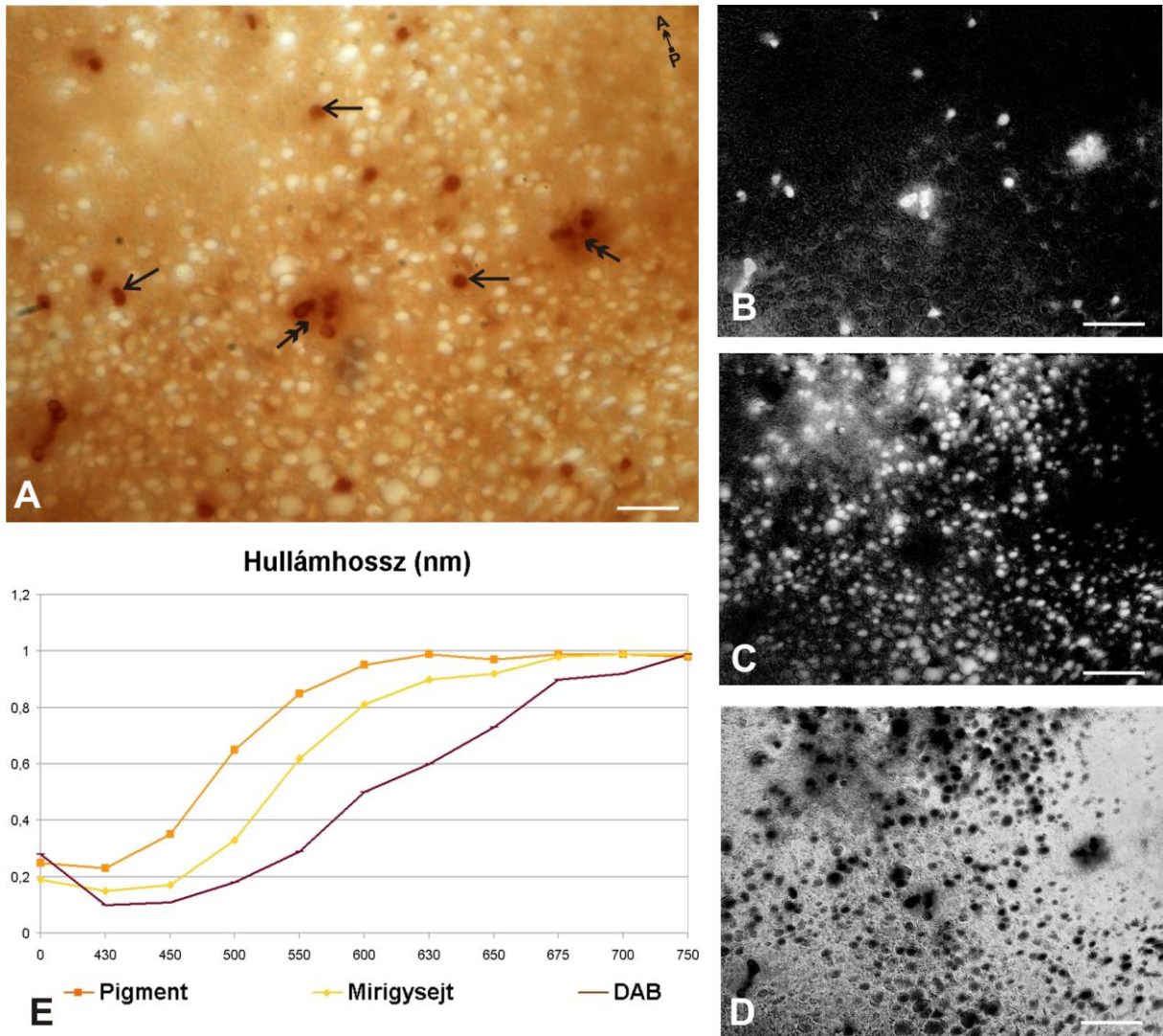
4.4.1. Fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémia

A festést követően erősen jelölt struktúrákat sikerült beazonosítanunk az *Eisenia fetida* és a *Limnodrilus hoffmeisteri* egyedek szenzoros rendszerének különböző szintjein. A festődés minden egyes régióban jól reprodukálható volt.

4.4.1.1. A GABA-IR érzékhámsejtek eloszlási mintázata a bőrízomtömlőben

A bőrízomtömlőben erősen festődő GABA-IR sejteket találtunk, amelyeket morfológiai jellegzetességeik alapján primer érzékhámsejtekként azonosítottuk. A jelölt sejtek anatómiai viszonyainak részletes leírását totálpreparátumok és a belőlük készült sorozatmetszetek tanulmányozása alapján ismertetjük. A totálpreparátumokon az immunreakció kiértékelését a bőrízomtömlő relatíve magas pigmenttartalma nehezítette, ezért a jelölt sejtek detektálását multispektrális felvételeken végeztük. A multispektrális képeken meghatároztuk a DAB spektrumát (430 nm), majd elkülönítettük a pigment spektrumától (17A-E. ábra). Az eloszlási mintázatot és a sejszámot a DAB spektrumkép alapján határoztuk meg.

Azt tapasztaltuk, hogy a jelölt sejtek mindkét vizsgált faj esetében követték -a korábban már neuronális töltési technikával meghatározott- az érzéksejtekre jellemző eloszlási mintázatot.



17. ábra. Multispektrális felvétel az *Eisenia fetida* bőrizomtömlőjéről GABA immunjelölést követően. **A.** A hámrétegben magányos és érzékszervekbe tömörült érzéksejteket egyaránt találtunk. Meghatároztuk az immunjel (DAB) spektrumát, majd az ennek megfelelően előállított spektrális képen (**B.**) beazonosítottuk a jelölt sejteket. A spektrális szegmentálás során a mirigysejteknek (**C.**) valamint a pigmentnek (**D.**) megfelelő spektrumot is beazonosítottuk (**E.**), ezeket negatív kontrollként alkalmaztuk. Hegyes nyíl: magányos érzéksejt, kettősfejű nyíl: érzékszervekbe tömörült érzéksejt, DAB: diaminobenzidin, A-P: anterior-poszterior irány.

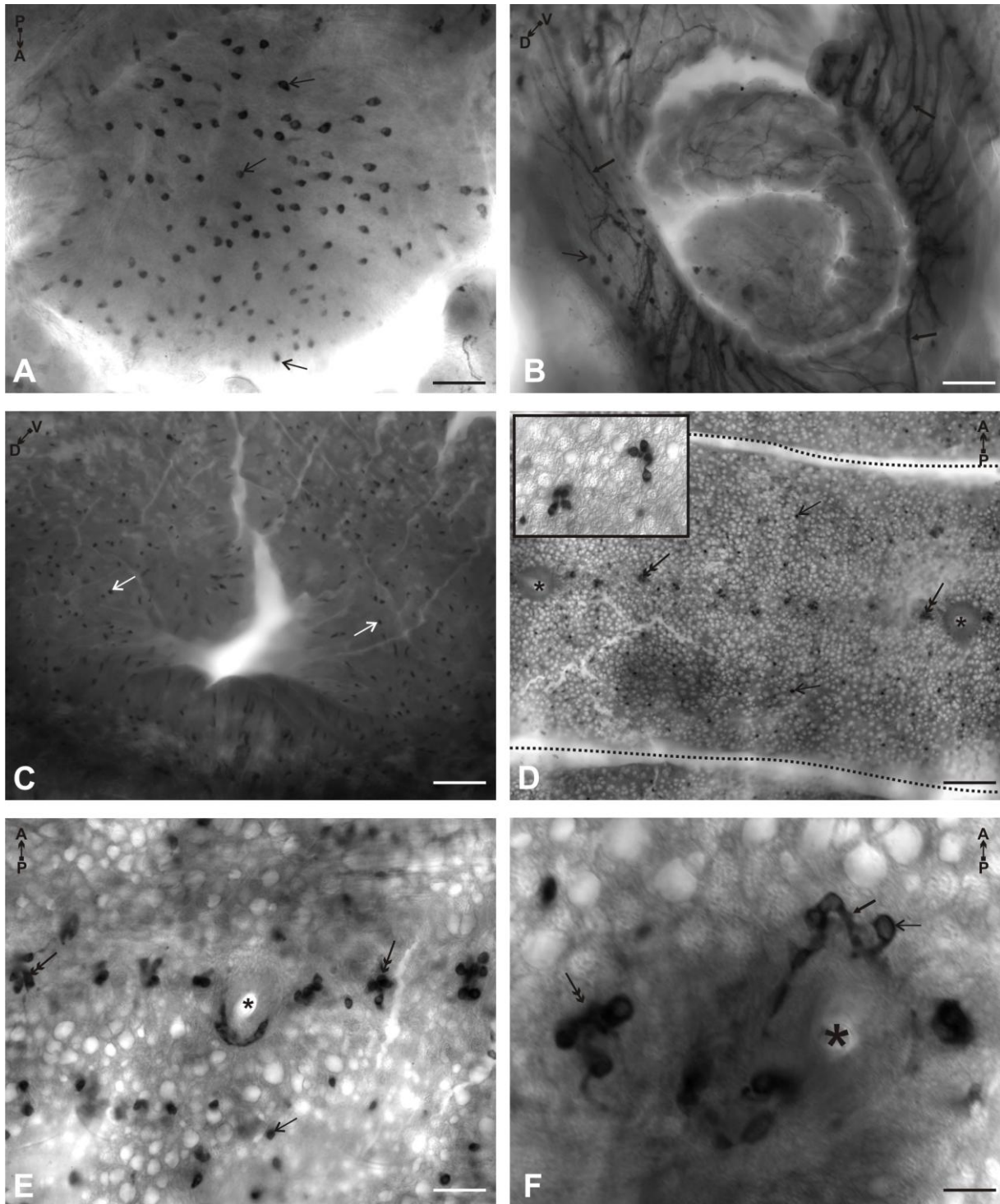
Aránymérték: 50 μm

4.4.1.1.1. Az *Eisenia fetida* GABAerg érzéksejtjei

Az orális régióban a prosztómium területén a jelölt sejtek kerek alakúak voltak és egyenletesen szórta helyezkedtek el (18A. ábra). A szájnyílás környékén a sejtsűrűség megnőtt és az ajkak peremterületein már az ovális sejtalak vált uralkodóvá (18C. ábra). A száj belső hámrétegében a szájüreg kezdeti szakaszán kisméretű jelölt sejtalakokat és igen gazdag nyúlványrendszert találtunk. A nyúlványok nagy része az állat hossz tengelyével párhuzamosan a rosztrokaudális, illetve kaudorosztrális irányba futott. A nyúlványokon kis varikozitásokat detektáltunk (18B. ábra).

A posztklitelláris szelvények közepén végighúzódnak –az állatot övszerűen körülölelő– sertesorban elhelyezkedő nagyobb méretű szenzillák 4-6 db GABA-IR sejtet tartalmaztak (18D. ábra). Az érzékszerveket alkotó sejtek nyúlványait is sikerült azonosítani. A szenzillán belül egy adott sejt nyúlványa a szomszédos sejtek irányába futott. A serte közvetlen közelében lévő jelölt sejtek gyakran szabályos kört formázva, övszerűen a serte körül helyezkedtek el (18E, F. ábra). A sertesor előtt és mögött elhelyezkedő kisebb méretű érzékszervek is tartalmaztak jelölt sejteket. GABA-immunreaktívnak bizonyult számos magányos érzéksejt is.

Meghatároztuk az egyes testtájakra jellemző GABA-IR sejtszámot, illetve néhány szelvényre jellemző sejtsűrűséget. A prosztómiumban 600 db (± 52 , $n=4$), az első testszelvényben 530 db (± 40 , $n=5$), a posztklitelláris szelvényekben átlagosan 800 (± 65 , $n=12$), a kaudális szelvényekben 300db (± 17 , $n=5$) jelölt sejt volt.

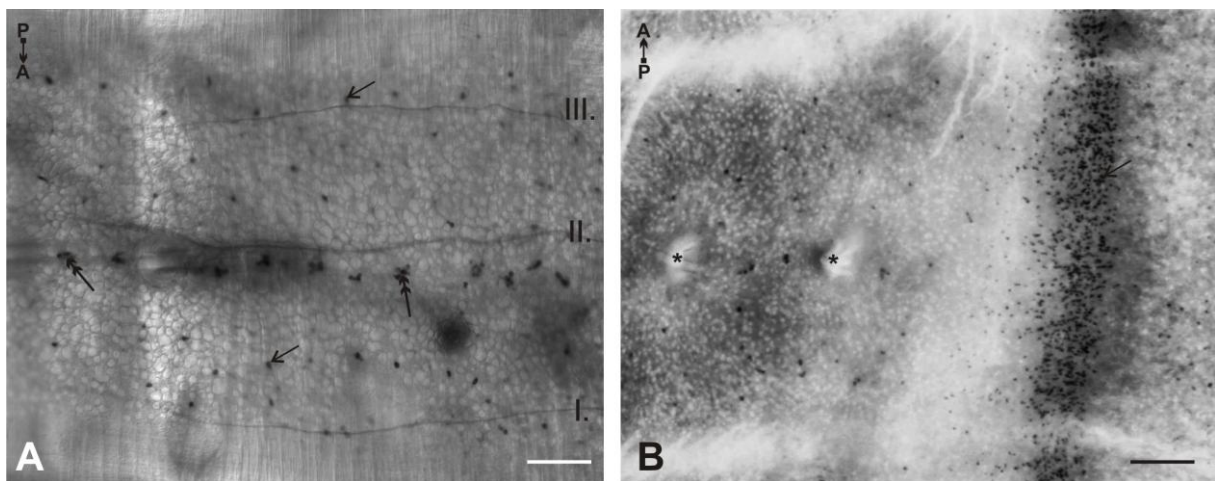


18. ábra. GABA immunreaktív struktúrák az *Eisenia fetida* különböző testrégióiban. **A.** A prosztómialis lebeny jelölt sejtjeinek eloszlási mintázata. **B-C.** A szájnyílás és az ajak régió GABA-IR struktúrái. **D.** Egy közepdarab szelvény GABA-IR primer érzékhámsejtjeinek tipikus eloszlási mintázata, indexképben a szenzillák kinagyított képe. **E-F.** A sertesorban elhelyezkedő GABA-IR sejteket tartalmazó szenzillák. Csillag: sertetokok, hegyes nyíl: magányos jelölt érzéksejt, dupla nyíl: szenzillába csoportosult GABA-IR primer érzékhámsejtek, fekete nyíl: sejtnyúlvány, A-P: anterior-poszterior irány, D-V: dorzális-ventrális irány.

Aránymérték: A, B, C, D, E: 100 μ m; F: 10 μ m

Néhány esetben a GABA-IR rostok a szegmentális idegek pozícióit is kijelölték. Jól látható volt, hogy a jelölt sejtek az idegek mentén helyezkednek el. Számos esetben a sertesor szenzilláit alkotó sejtek nyúlványait egész a II. szegmentális idegig tudtuk követni (19A. ábra).

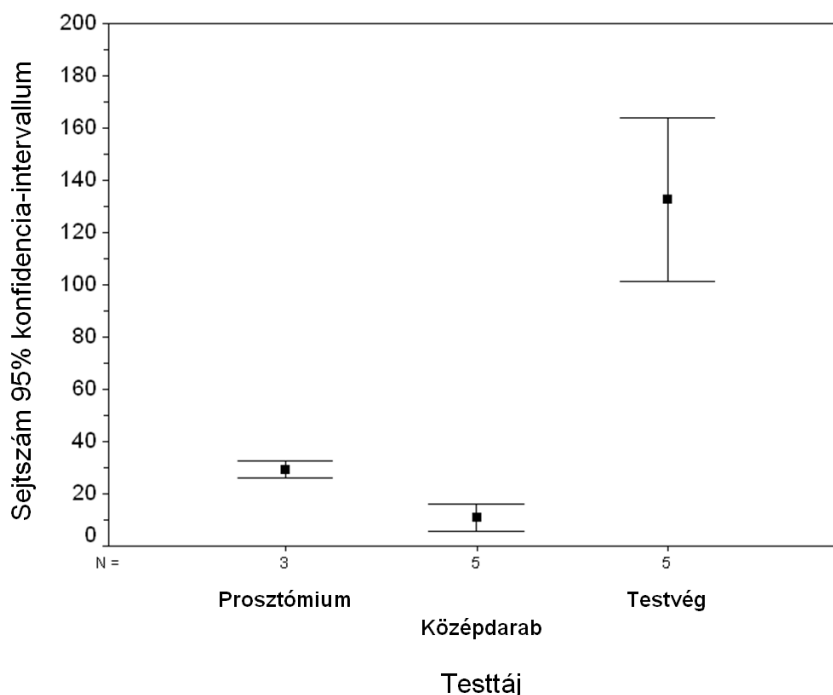
A klitellumban, jellegzetes eloszlási mintázatot találtunk. A sejtek többsége az állat két oldalán dorzolaterálisan elhelyezkedő serdülési dudorok területén szabályos sávban tömörült. Ezek a sejtek kis átmérőjű (5-8 μm) kerek sejttesttel rendelkeztek és igen sűrűn, egymáshoz közel helyezkedtek el (19B. ábra). A nyereg más területein jelölt sejteket nagyon kis számban találtunk. Ezek látszólag szabálytalan elrendeződésű, magányos sejtek voltak, több sejtből álló érzékbimbókat ritkán figyelhattunk meg. A serdülési dudorokban kicsi szómájú, intenzíven festődő sejtek helyezkedtek el, szinte az egész serdülési dudor területét kitöltve. Egy - egy serdülési dudor 1300 db (± 72 n=5) GABA-IR sejtet tartalmazott.



19. ábra. GABA immunreaktív primer érzékhámsejtek eloszlási mintázata. **A.** Egy középdarab szelvény GABA-erg primer érzékhámsejtjeinek eloszlása és a jelölt szegmentális idegek pozíciója. **B.** A nyereg jellegzetes sejt mintázata. Hegyes nyíl: egyedül álló GABA-IR érzékesajt, dupla nyíl: szenzillába csoportosult jelölt primer érzékhámsejtek, I. II. III.: szegmentális idegek, csillag: sertesok, A-P: anterior-poszterior irány.

Aránymérték: 100 μm

A területegységre vonatkoztatott sejtszámot adott referenciaterületre ($5000 \mu\text{m}^2$) határoztuk meg a prosztómium, a középdarab és a testvég szelvényeire (2. grafikon).



2. grafikon. GABA-IR sejtek megoszlása a különböző testrégiókban.

A jelölt sejtek egy szelvényen belüli eloszlási mintázatát a posztklitelláris szelvényekben határoztuk meg. A dorzális oldalon a jelölt sejtek mintegy 40%-a, a ventrális oldalon 25%-a, ventrolaterális részen pedig 35%-a lokalizálódott.

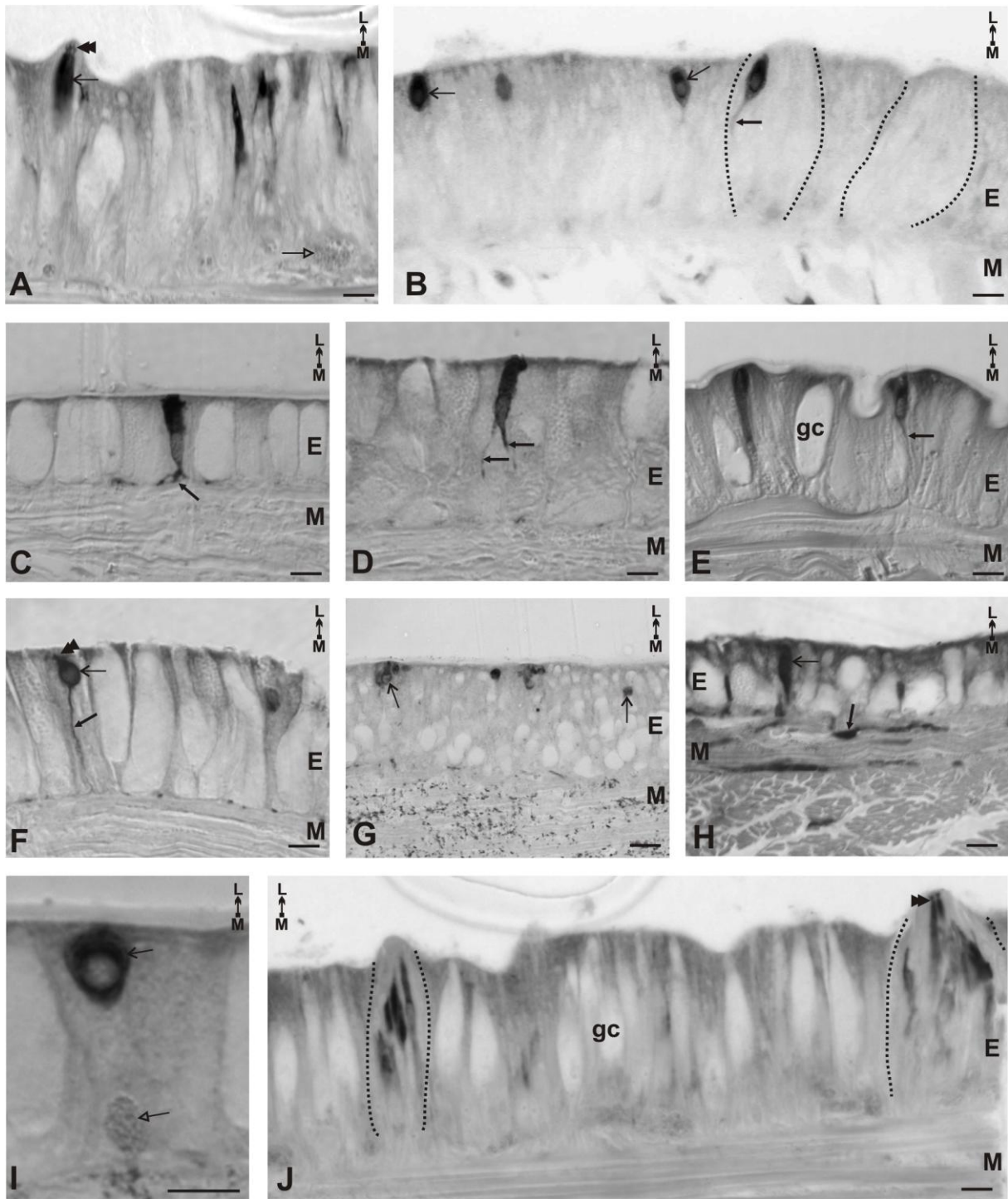
A sorozatmetszetek vizsgálata megerősítette a totálpreparátumok tanulmányozásával nyert eredményeket: a primer érzékhámsejteknek csak egy része GABA-IR. Megállapítottuk, hogy a fotoreceptorként ismert faoszómás sejtek nem festődtek, míg a szenillákban található sejtek közül több jelölődött (20A, I. ábra).

A megfestett sejtek alaktani szempontból heterogének voltak még egy szenillán belül is, de különösen nagy különbséget tapasztaltunk a különböző testrégiók jelölt sejtjeinek anatómiai tulajdonságaiban. A keresztmetszeti preparátumok kiértékelése során megállapítottuk, hogy az immunreakciót követően a GABA-IR sejtek esetén az egész szóma homogéne festődött és az egyes sejtek között sem találtunk intenzitásbeli különbséget. Ennek megfelelően az immunreakció denzitásának analizisétől eltekintettünk.

A prosztómium szenzilláiban hosszú, megnyúlt GABA-IR sejtek fordultak elő nagy számban, amelyek fejlett centrális nyúlványokkal bírtak. A sejtek kerek centrális sejtmaggal rendelkeztek és az apikális részen rövid dendritikus nyúlvánnyal, amely az epidermális felszín felé irányult. Ezen a testrégióban a sejtek dendritikus nyúlványai jellemzően behatoltak a kutikula rétegébe. A centrális (axonális) nyúlványok elágazódtak a szubepidermális plexusban, majd vastagabb idegágakba összeszedődve a prosztómiális idegekbe futottak (20A. ábra).

A posztklitelláris szelvények szenzilláiban a jelölt sejtek heterogénebb felépítésűek voltak (20J. ábra), de néhány alaptípust azonosítani tudtunk.

- I. Az első típusra a viszonylag kisméretű, a hámréteg apikális részében elhelyezkedő, közel gömb alakú szóma volt jellemző. A sejtmag centrális elhelyezkedésű volt és kitöltötte szinte az egész sejttestet. A centrális nyúlvány néhány elágazása a szubepidermális plexusba lépett be, míg a legvastagabb ág a szegmentális idegbe futott (20B, G. ábra).
- II. A második típusba morfológiailag igen heterogén számával rendelkező sejtek tartoztak. A sejtmagjuk bazális lokalizációjú volt, nyúlványaik eredésüket követően, közvetlenül a sejttest alatt gazdagon elágazott, legtöbbjük egy rövid perifériás és egy hosszú centrális nyúlvánnyal rendelkezett. Az utóbbi lényegesen vastagabb volt, mint a többi érzéksejté és vizsgálataink szerint elágazódás nélkül, közvetlenül a szegmentális idegbe lépett be (20C, D. ábra).
- III. A harmadik sejttípus általában a szenzillák közepén helyezkedett el, átért a hám teljes vastagságát és a hasáb alakú szómából kilépő centrális nyúlvány számos, a plexusban végződő rostra bomlott szét (20E, H. ábra).
- IV. A kis számban előforduló magányos érzéksejtek egy része vastag, elágazódás nélküli centrális nyúlvánnyal bírt, amely közvetlenül a szegmentális idegbe lépett be (20F. ábra). Ez a sejttípus centrális elhelyezkedésű sejtmaggal rendelkezett, amit egy igen keskeny citoplazma sáv övezett. A sejtek apikális részén rövid dendritikus nyúlvány volt megfigyelhető, amely a kutikula irányába futott. Ez a sejttípus jellemzően a szelvények anterior és poszterior részeiben - közel a szelvényhatárokhoz - fordult elő (3 db/100 μm^2). Érzékszervek ezeken a területeken ritkán és szórtan elhelyezkedve voltak jelen (20A, F, I. ábra).

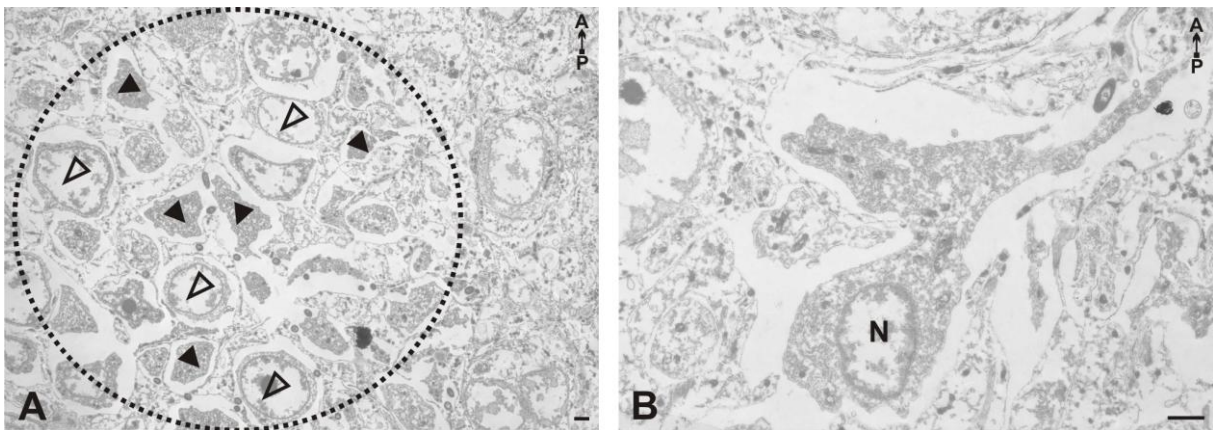


20. ábra. GABA-IR primer érzékhámsejtek típusai. **A.** A prosztómium megnyúlt szómával rendelkező jelölt sejtjei. Jól látható, hogy a bazális lokalizációjú faoszómális sejtek nem festődtek. **B.** Kisméretű, a hámréteg apikális részében elhelyezkedő I. sejtípus gyakran szenzillákban is előfordult. **C-D.** Nyúlványos, II. típusú sejt. **E, H.** Hasáb alakú III. sejtípus. Magányosan álló: **F, I** és érzékszervbe tömörült: **G.** apikális érzéksejtek. **H.** GABA immunreaktív rostok a szubepidermális és az izomplexus szintjén. **J.** Szenzillába szerveződött heterogén sejtpopuláció. Hegyes nyíl: sejttest, kettős nyílhegy: dendritikus nyúlvány, nyíl: axonikus sejtnyúlvány, üres nyíl: faoszómális sejtek, pontozott vonal: szenzillák határa, E: epidermisz, M: izomréteg, gc: mirigysejt, L-M: laterális-mediális irány.

Aránymérték: 10 µm

Immunelektronmikroszkópos mintákon vizsgáltuk az érzékszervek és azok alkotásában részt vevő érzéksejtek ultrastrukturális morfológiáját. A szenzillát hasáb alakú támasztósejtek övszerűen határolták, amelyek az érzékbimbó peremének kialakításában is részt vettek. A szenzillákban a sejtek szorosán egymás mellett tömörültek, emiatt a kisebb érzékszerveket alkotó sejtek azonosítása nem minden esetben volt egyértelmű. A közepdarab szelvények sertesorában elhelyezkedő nagyméretű, $\sim 80 \mu\text{m}$ átmérőjű, min. 20 db, max. 40 db. sejtet tartalmazó szenzillában- a sejteknek több, mint a fele GABA-IR-nak bizonyult (21A. ábra). A GABA-IR sejtek alaktani szempontból nem különböztek el a szomszédos, nem GABA pozitív érzéksejtektől. A vizsgált érzékbimbók területén belül kitüntetett régiókat nem tudtunk beazonosítani, a jelölt sejtek random helyezkedtek el.

A bőrízomtömlő GABAerg magányos érzéksejtjeit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy ezek a sejtek morfológiai szempontból nem különböznek a szenzillát alkotó sejtektől (21B. ábra).

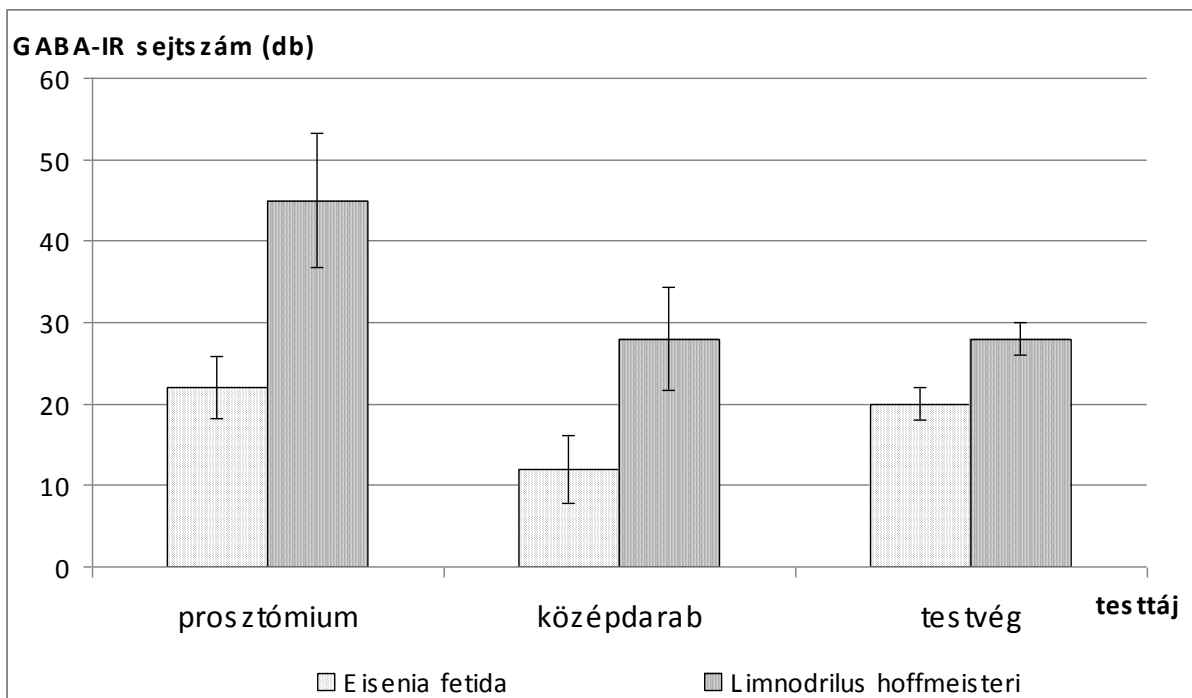


21. ábra. Jelölt primer érzékhámsejtek lokalizációja az *Eisenia fetida* hámrétegében. **A.** GABA-IR sejtek eloszlása egy szenzillán belül. **B.** Egy jelölt sejt kinagyított képe a sejtmaggal. Pontozott kör: egy érzékszerv határa, nyílhegy: immunpozitív sejtek, üres nyílhegy: nem immunreaktív sejtek, N: sejtmag, A-P: anterior-poszterior irány.

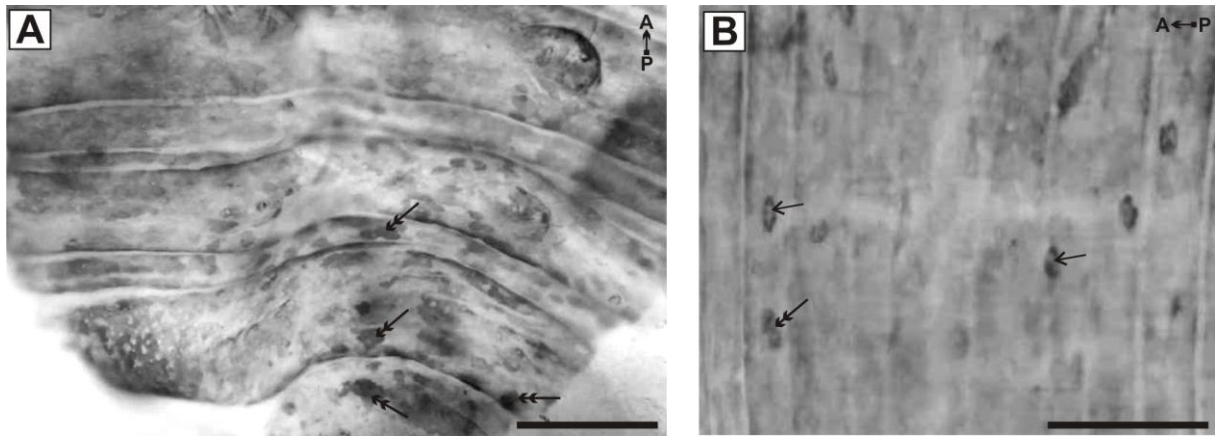
Aránymérték: $1 \mu\text{m}$

4.4.1.1.2. A *Limnodrilus hoffmeisteri* GABAerg érzéksejtjei

Azonos immunfestési protokolt alkalmazva a *Limnodrilus hoffmeisteri* egyedekben halványabb festődést kaptunk a bőrízomtömlőben. A jelölt primer érzékhámsejtek könnyen azonosíthatóak voltak, azonban a nyúlványrendszerük már kevésbé volt követhető. Az érzéksejtek eloszlási mintázata megegyezett az *Eisenia foetida*-ban leírtakkal, azonban a $100\ \mu\text{m}^2$ területegységre eső immunreaktív sejtek száma lényegesen nagyobb volt (3. grafikon). Érzékszervekbe tömörült és magányos sejtalakokat egyaránt sikerült beazonosítanunk (22A, B. ábra).



3. grafikon. GABA-IR primer érzékhámsejtek száma $1000\ \mu\text{m}^2$ egységterületre vonatkoztatva *Eisenia fetida* és *Limnodrilus hoffmeisteri* különböző testtájain. Az *Eisenia fetida* mérési eredményei prosthodium (n=5), középdarab (n=15) és testvég (n=8) területek mindegyikén 3 db $1000\ \mu\text{m}^2$ -os mintaterületek adataiból származnak. *Limnodrilus hoffmeisteri* prosthodium (n=3), középdarab (n=7) és testvég (n=3) 2 db $1000\ \mu\text{m}^2$ -os mintaterülete lett kiértékelve.

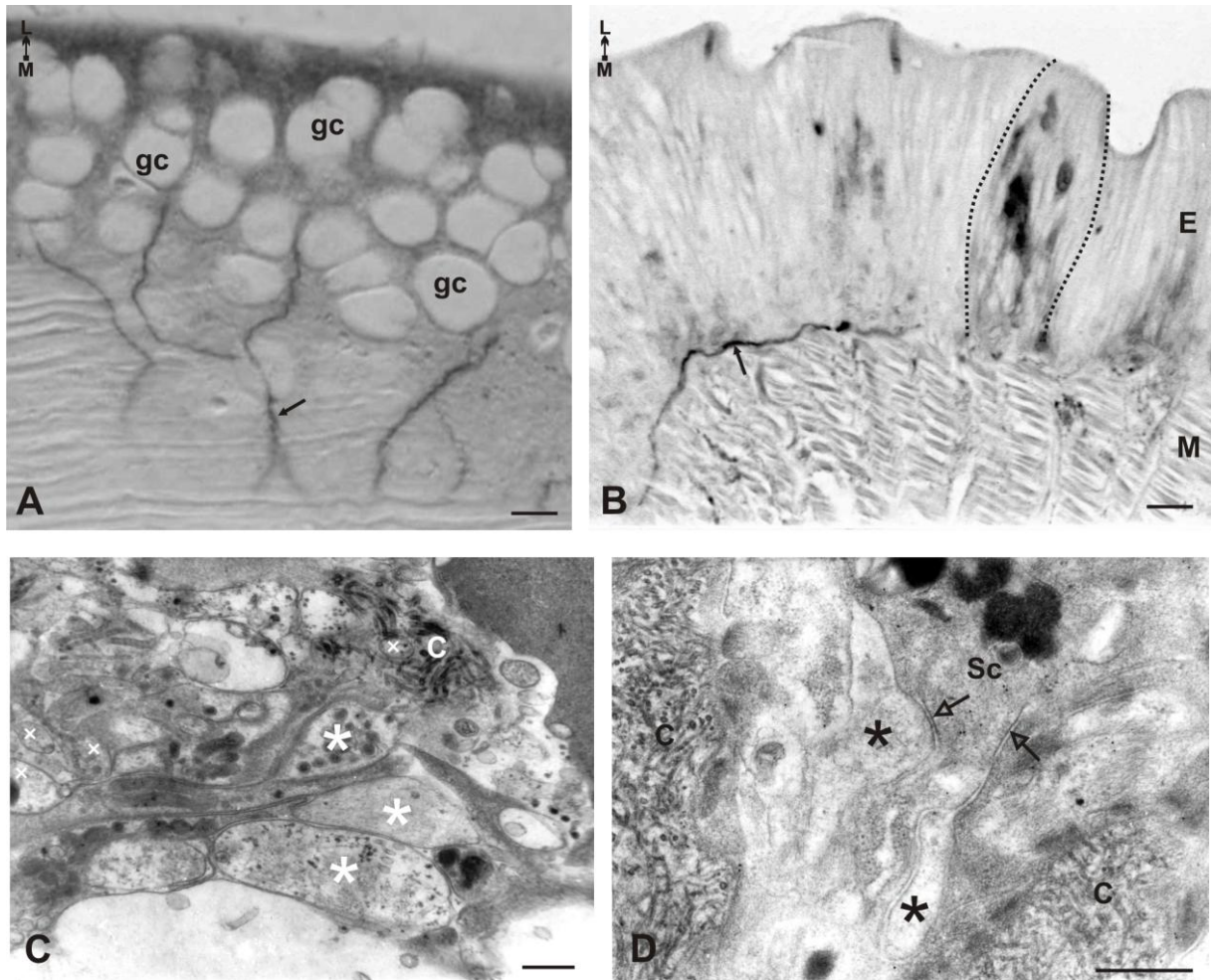


22. ábra. GABAerg jelölt érzékhámsejtek eloszlási mintázata a *Limnodrilus hoffmeisteri* bőrizomtömlőjében. **A.** Jelölt érzékszervek eloszlási mintázata a testvég szelvényeiben **B.** Magányos jelölt érzékszejtek egy posztklitelláris szelvényben. Hegyes nyíl: egyedül álló GABA-IR érzékszejt, dupla nyíl: szenzillába csoportosult jelölt primer érzékhámsejtek, A-P: anterior-poszterior irány.

Aránymérték: 100 μ m

4.4.1.2. A szubepidermális plexus GABA immunreaktív elemei

A szubepidermális plexus vizsgálatát *Eisenia fetida* egyedeken végeztük. A plexusba belépő varikózus GABA-IR centrális nyúlványok, illetve azok oldalági könnyen azonosíthatók voltak a sorozatmetszetekben (23A, B. ábra). Számos esetben megfigyelhető volt az egyik szenzillától a másik érzékbimbóig futó rost. A plexus keresztmetszeti képén sok szenzoros rost átmetszetet találtunk (23C. ábra). Immuncitokémiai vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a GABA-IR szenzoros sejtek centrális nyúlványai gyakran az egyazon szenzillában elhelyezkedő nem GABA-IR érzékszejtek nyúlványaira adtak bemeneteket (23D. ábra), de gyakran találtunk GABA-IR profilokat a GABA-ra egyáltalán nem festődő szenzillák alatt elhelyezkedő plexusokban is.



23. ábra. A szubepidermális plexus GABA-IR rostjai. **A-B.** Jelölt rostok a plexusban. **C.** A plexus ultrastruktúrája. **D.** GABA-IR centrális nyúlvány a plexusban. Nyíl: jelölt rostok, gc: mirigysejt, pontozott vonal: érzékszerv határa, csillag: motoros axon, kereszt: szenzoros axonok, Sc: szenzoros sejt, C: kollagén fibrillák, üres nyíl: szinaptikus kapcsolatra utaló jelek, L-M: laterális-mediális irány.

Aránymérték: A, B: 10 μ m; C, D: 500 nm

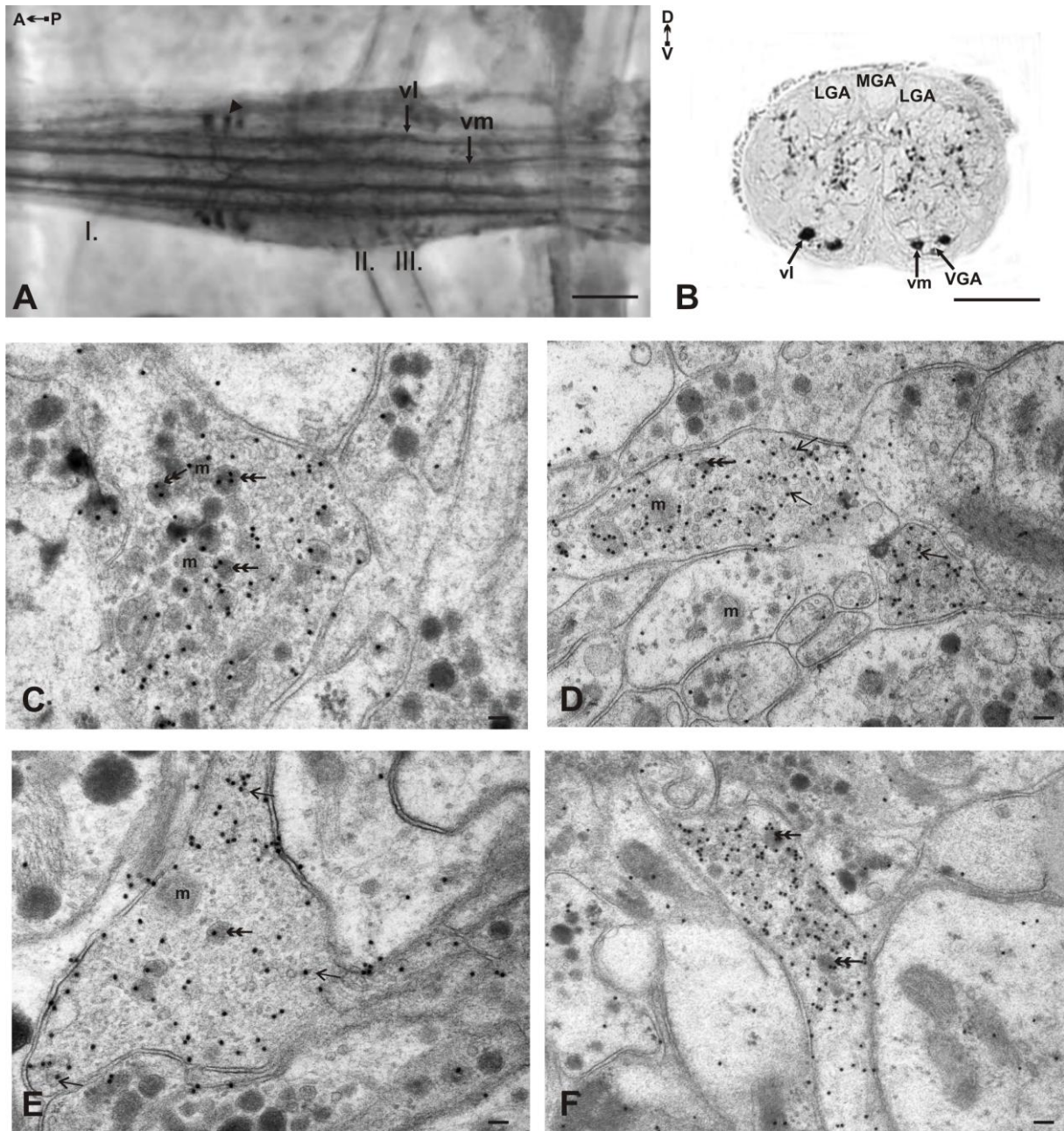
4.4.1.3. A GABA-IR szenzoros rostok reprezentációja a központi hasdúclánc ganglionjaiban

A jelölt szenzoros rostok lefutását a szegmentális idegekben és a központi idegrendszerben totálpreparátumokban és a belőlük készült félvékony sorozatmetszetekben

egyaránt nyomon követtük *Eisenia fetida* egyedekben (24A, B. ábra). Megállapítottuk, hogy az öt pár hosszanti szenzoros axonköteg közül csak két párban, nevezetesen a ventrolaterális és a ventromediális axonkötegek tartalmaztak GABA-IR rostokat. A rostok gazdag arborizációt mutattak. Feltűnő volt a ventrális óriásaxonokat körülvevő ventrolaterális axonköteg intenzív festődése (24B ábra).

A hasdúcláncban jelölt centrális sejtalakokat is kimutattunk. Ezek többnyire laterálisan, közvetlenül a gangliontok alatt, egymás mellett szorosan helyezkedtek el. A sejttestjeik 20-30 μm átmérőjű, kerek, vagy kissé megnyúlt volt. A sejtek varikozitásokban gazdag nyúlványai elhagyva a szómát a centrális neuropilbe futottak, ott kereszteződtek, majd valamelyik ellenoldali hosszanti szenzoros axonköteg rostjaihoz csatlakoztak.

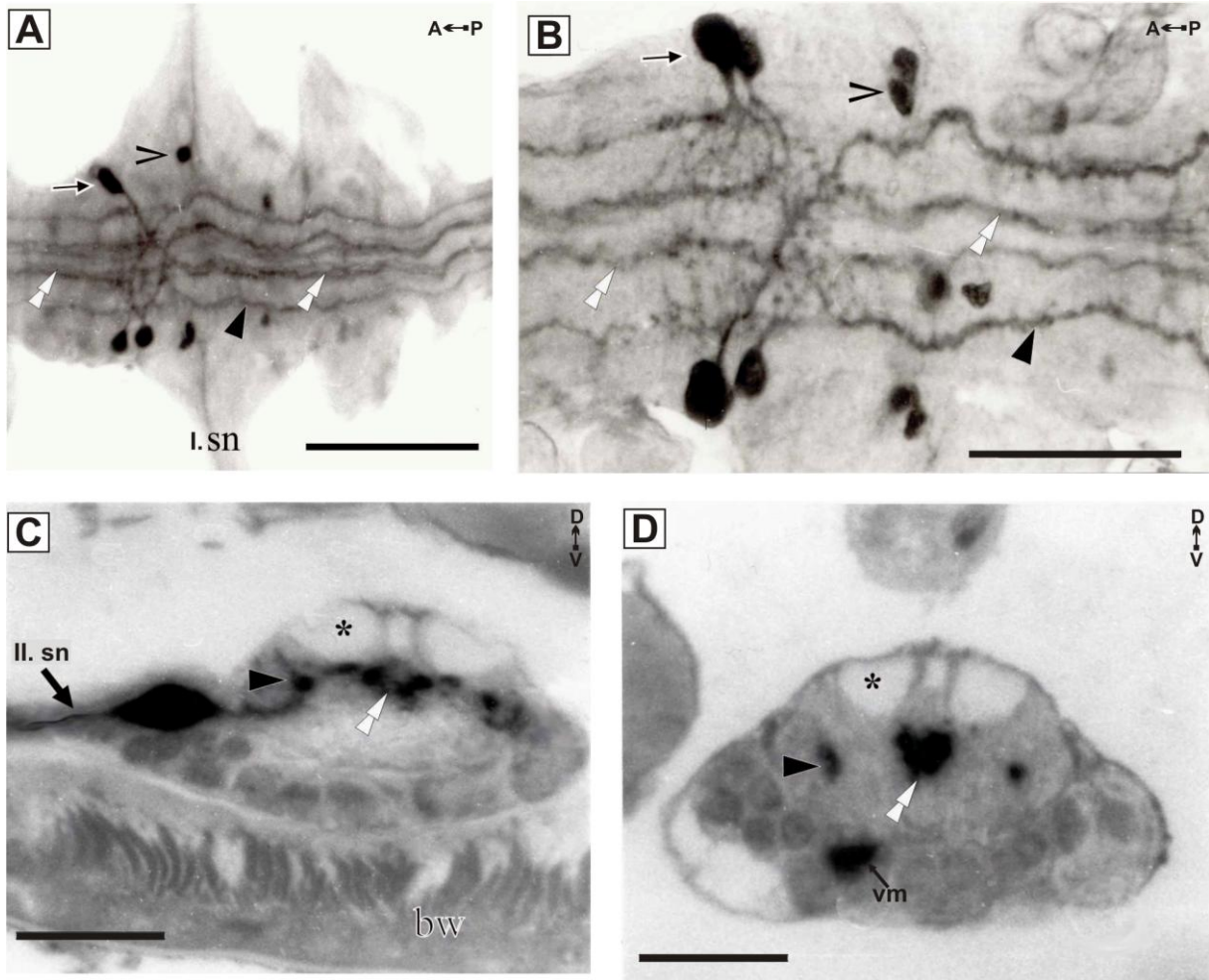
A GABA-IR axonprofilok ultrastrukturális morfológiáját a ventrális dúcok neuropiljében tanulmányoztuk. A ventrolaterális (24C, D. ábra) és a ventromediális (24E, F. ábra) axonkötegekbe jelölődött rostokat sikerült kimutatnunk, amelyek egyértelműen elkülönültek a szomszédos, nem jelölt rostoktól. A jelölt sejtek citoplazmájában az immunreakciót reprezentáló aranyszemcsék egyenletesen szórtan voltak jelen. A citoplazma mellett a rostokban nagy számban előforduló mitokondriumok is jelölődtek. Megállapítottuk, hogy a GABA-IR profilok morfológiailag heterogének lehetnek; az átlagosan 25 nm átmérőjű pleomorf aglanurális vezikulumok mellett nagyméretű -30-50 nm-átmérőjű- dense-core vezikulákat is találtunk. Ez utóbbiak jóval kisebb számban fordultak elő az általunk vizsgált profilokban.



24. ábra. GABAerg szenzoros rostok és érzéksejtek elhelyezkedése *Eisenia fetida* ventrális dúcában whole mount **A.** és keresztmetszeti **B.** képen. Posztembedding immunogolddal jelölt GABA-IR axon profilok ultrastruktúrája a ventrális ganglion ventrolaterális **C-D.** és ventromediális **E-F.** hosszanti szenzoros axonkötegeiben. A varikozítások kisméretű agranuláris vezikulák mellett kisebb számban denz, granuláris vezikulát is tartalmaztak. Nyílhegy: jelölt centrális sejt, I. II III.: szegmentális idegek, MGA: mediális óriásaxon, LGA: laterális óriásaxon, VGA: ventrális óriásaxon, vl: ventrolaterális köteg, vm: ventromediális köteg, hegyes nyíl: agranuláris vezikula, kettős fejű nyíl: granuláris vezikula, m: mitokondrium, A-P: anterior-poszterior irány, D-V: dorzális-ventrális irány.

Aránymérték: A, B: 100 μ m; C, D, E: 100 nm

Limnodrilus hoffmeisteri egyedek ganglionjait vizsgálva hasonló eredményeket, kaptunk, mint az *Eisenia fetida*-ban. A legkifejezettebb struktúrák a mediális és a laterális páros poliszegmentális rostkötegek voltak (25A, B. ábra). A neuronok, amelyek a poliszegmentális interneuronális kötegek képzésében vesznek részt az egyes szegmentális idegyökéknél a ganglion laterális és dorzolaterális részén helyezkedtek el (25A, B, C. ábra). Az interneuronális rostok mellett sikerült szenzoros rostokat is beazonosítanunk, így a ventromediális és ventrolaterális hosszanti szenzoros kötegekben erős jelölést találtunk (25D. ábra).



25. ábra. GABAerg jelölt struktúrák a *Limnodrilus hoffmeisteri* ventrális ganglionjaiban. **A-B.** GABA-IR struktúrák a ventrális ganglionban. Az ipszi- és kontralaterális interneuronális kötegek jelölődtek. **C-D.** GABAerg rostok lokalizációja keresztmetszeti preparátumokon. Bipoláris neuron a második szegmentális ideg magasságában **C.**, valamint az erősen jelölődött ventromediális szenzoros köteg **D.** Hegyes nyíl: egyedül álló GABA-IR érzéksejt, dupla nyíl: szenzillába csoportosult jelölt primer érzékhámsejtek, hegyes nyílhegy: bipoláris neuron, nyílhegy: laterális polisegmentális rostköteg, dupla nyílhegy: mediális polisegmentális rostköteg, sn: szegmentális ideg, bw: testfal, csillag: laterális óriásaxon, vm: ventromediális hosszanti szenzoros axonköteg, A-P: anterior-poszterior irány, D-V: dorzális-ventrális irány.

Aránymérték: A, C, D: 100 μm ; B: 50 μm

5. DISZKUSSZIÓ

Vizsgálataink során *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* és *Limnodrilus hoffmeisteri* kifejlett egyedeinek perifériás és centrális idegrendszerének szenzoros elemeit tanulmányoztuk. Mivel a kísérletekben résztvevő fajok hasonló anatómiai szerveződéssel rendelkeznek, így a kapott eredményeket általános érvényűnek tekinthetjük az *Oligochaeta* férgekre. Részletes anatómiai leírást adtunk a szenzoros struktúrák morfológiáját, azok elhelyezkedését és eloszlási mintázatát illetően. Eredményeink alátámasztják és kiegészítik a korábbi kísérleti adatokat, így alapul szolgálhatnak a jövőbeni anatómiai és elektrofiziológiai kísérletekhez.

A modellállatokat mindig az adott kísérletnek megfelelően választottuk, így az elektronmikroszkópos és immuncitokémiai vizsgálatokat a kisebb méretei miatt egyszerűbben kezelhető trágyagiliszta illetve csővájó féreg, míg a neuronális töltéseket földigiliszta egyedeken végeztük a nagyobb, könnyebben izolálható és manipulálható idegkötegek miatt.

5.1. Az érzékszervek szerveződése a testfalban

Amint azt korábbi anatómiai leírásokból tudjuk, a gyűrűsférgek köztakarójában, különösen a prosztómium és az első szelvény területén szabad idegvégződéseket, magányosan álló és érzékszervekbe csoportosult érzéksejtek (Retzius, 1892; Langdon, 1895; Ogawa, 1939), valamint fényérzékelő fotoreceptorsejtek (Hess, 1925b) találhatóak. Az elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok feltárták az egyes sejtípusok részletes ultrastruktúráját (Jamieson, 1981). Jelen munkában konvencionális elektronmikroszkópos, transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) és szkennings elektronmikroszkópos (SEM), technikákkal vizsgáltuk a bőrízomtömlőben elhelyezkedő érzékszervek és primer érzékhamsejtek morfológiai jellegzetességeit.

Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek segítségével *Eisenia fetida* valamint *Limnodrilus hoffmeisteri* egyedek kitüntetett testtájaiban -anterior régió, középdarab, poszterior régió- tanulmányoztuk az érzékszervek eloszlási mintázatát. A két faj esetében az érzékszervek eloszlási mintázatában nem találtunk különbséget. Az anterior szelvényekben a már Aros (1978) által szkennings elektronmikroszkópos tanulmányában leírt eloszlási mintázatot találtuk. Ezeket a korábbi vizsgálatokat kiegészítve egyéb testtájak szelvényeivel,

meghatároztuk az állatok egyes testtájaira jellemző érzékszerv eloszlási mintázatot. Eredményeink megerősítették, hogy a szenzoros érzékszervek a legnagyobb számban és a legsűrűbben a prosztómium területén fordulnak elő, továbbá ez a mintázat tipikusan jellemző volt az I. és a II. elülső testszelvényekre, valamint a három utolsó testszelvényre egyaránt. Számításaink alapján az érzékszervek legsűrűbben a prosztómium és a pygidium területén az anális pórus körül helyezkedtek el (1. grafikon). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy ezen testtájaknak igen fontos szerepe lehet a szenzoros funkciókban. Az állatok talajlakó, fűró életmódja megköveteli, hogy az érzékelést a test elülső, illetve hátulsó régióira összpontosítsa.

Az anterior és poszterior szelvényektől mind méretben, mind pedig eloszlási sűrűségben különböztek a vizsgált posztklitelláris szelvények. Itt a jóval nagyobb érzékszervek jóval ritkábban állva helyezkedtek el. Kivétel volt a szelvényen belül a sertesor sávja, ahol az érzékszervek igen sűrű tömörülése volt jellemző. Ebből az eloszlási mintázatból -ami az állatok legtöbb testszelvényére jellemző volt- arra következtethetünk, hogy a sertesor kitüntetett szereppel bír a szenzoros érzékelésben.

A mérési eredményeket összevetve, a vizsgált két faj érzékszerveinek különbségeire is rámutattunk. A egyedekben a területegységre $-100 \mu\text{m}^2$ - jutó érzékszervek száma ugyanabban a testrégióban nagyobb volt, mint az *Eisenia fetida* esetében (1. grafikon). Nagy nagyítású fotókat tanulmányozva szembetűnő volt, hogy az érzékcillók is jóval hosszabbak voltak a *Limnorilus hoffmeisteri* érzékszerveiben. Feltételezhetően ezek az anatómiai különbségek a két faj eltérő életkörülményeire vezethető vissza, a vízi életmódot folytató *Limnodrilus hoffmeisteri* a környezetéből oldott formában -kisebb koncentrációban- jut hozzá a kémiai ingerekhez ami kifinomultabb érzékelést igényel.

Az érzékszervek részletes morfológiai vizsgálatát *Eisenia fetida*-ból készült keresztmetszeti TEM minták analízisével egészítettük ki. Ezek a vizsgálatok kimutatták, hogy az érzékszervek nagy számban tartalmaznak penetratív multiciliális sejteket, uniciliális sejtalakokat vizsgálataink során nem sikerült detektálni. Ebből arra következtethetünk, hogy az uniciliális sejtek jóval kisebb mennyiségben fordulnak elő. Feltételezhetően érzékenyebbek, mint a multiciliális sejtek, viszont az ingerlokalizáció detektálásuk felbontóképessége rosszabb.

Az ultrastruktúrális vizsgálatainkat kiterjesztettük a szubepidermális plexus szintjére is. A plexus keresztmetszeti tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a szenzoros és motoros rostok szorosan egymás mellett vannak jelen. A rostokban különböző morfológiával rendelkező vezikulákat is megfigyeltünk. Ez a morfológiai heterogenitás arra utal, hogy a plexusban különböző neurokémiai tulajdonságú neurális struktúrák rostjai helyezkednek el. A

rostok között szinaptikus kapcsolatokra utaló struktúrákat is sikerült kimutatnunk. Ezzel újabb bizonyítékként szolgálhatunk a plexus lehetséges integratív funkciójának alátámasztásához.

5.2. A szenzoros rendszer szerveződése

A neurontöltések és pályajelölések napjainkban már az immunhisztológia térhódítása miatt háttérbe szorult hisztotechnikai módszereknek tekinthetők, holott a -különböző fizikokémiai tulajdonsággal rendelkező- nyomjelző molekulák széles tárháza áll a kutatók rendelkezésére. A részletes, háromdimenziós felbontást eredményező képalkotó laboratóriumi berendezések elterjedésével ezen anyagok és módszerek új virágkorukat élhetik.

Ebben a munkában kombináltuk a tradicionális neurontöltés technikákat a modern konfokális lézerszkennung mikroszkópiával, hogy feltárjuk a *Lumbricus terrestris* idegrendszerének háromdimenziós szerveződését.

Kísérleteinkben fluoreszcens nyomjelző anyagokat, a DiI-t, és a Lucifer yellow-t alkalmaztuk.

DiI-t, mint post mortem nem specifikus jelölő anyagot már a korábbiakban is sikeresen alkalmazták neuronális anatómiai kísérletekben, gerincesekben (Honig és Hume, 1986) és gerinctelenekben (Perruccio és Kleinhaus, 1996; Boris és mtsai, 1998) egyaránt. Az anyag fizikokémiai tulajdonságai -lipofil karaktere- lehetővé teszik, hogy a sejtmembrán síkjában diffundáljon akár nagy távolságokra is, így sejttesteket, valamint azok nyúlványrendszerét egyaránt képes feljelölni. További sajátossága, amely szintén a kémiai karakteréből adódik, hogy nem képes áthaladni a szinapszisokon.

A töltéseket követően megfigyeltük, hogy elsőként a vékony sejtnyúlványok, majd ezt követően a vastagabb idegágak jelölődtek. Mivel a DiI diffúziója függ a távolságtól, az alkalmazott inkubációs időtől, valamint a koncentrációtól (Lukas és mtsai, 1998), feltételezhetően az interszegmentális rostok halvány jelölése ezekre a fizikokémiai jelölési sajátosságokra vezethető vissza (12H, 13A, C, D. ábra). A minták tanulmányozása során nem találtuk jelét annak, hogy valamely sejt, vagy sejtpopuláció nem megfelelően jelölődött volna. Az alkalmazott jelölési technika ezen tulajdonságai lehetővé tették, hogy a jelölt ganglionhoz tartozó összes -mind a szenzoros, mind pedig motoros- rostot detektálni tudjuk.

Az anterior és poszterior szelvényekben talált érzéksejtek eloszlási mintázata megerősítette az *Eisenia fetida*-n elvégzett szkennung elektronmikroszkópos kísérleteink eredményeit.

Meghatároztuk egy prosztómiális ideghez tartozó receptív mezőt, amely az állatra jellemző bilaterális szimetriaviszonyoknak megfelelően az anterior szelvények egyik, a töltött ideggel azonos oldalára korlátozódott. Ehhez hasonló szerveződést már rovarokban leírtak (Tyler és Altman, 2004).

A középdarab szelvényekben a legtöbb érzéksertet a sertesor szenzilláiban találtuk, különösen nagy számban közvetlenül a sertetokok környékén. A szenzillák vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy az érzékszervekbe csoportosult primer érzéksjtek morfológiailag igen heterogének, mind alak, mind méret, mind pedig elhelyezkedés tekintetében. A korábbi immuncitokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy az érzéksjtek hisztokémiaailag igen heterogének lehetnek (Curry és mtsai, 1989; Gesser és Larsson, 1986; Lengvári és mtsai, 1994; Reglődi és mtsai, 1997a,b, 1999, 2000; Ehinger és Myhrberg, 1971; Myhrberg, 1967, 1971; Rude, 1966; Spörhase-Eichmann és mtsai, 1997, 1998; Telkes és mtsai, 1996; Csoknya és mtsai, 2005). Feltételezhető, hogy az alakbeli különbségek és az immunreaktivitás között összefüggés lehet. Ennek igazolására további, szisztematikus a bőrízomtömlő több régiójára kiterjesztett immuncitokémiai vizsgálatok elvégzése szükséges.

Munkánk során elsőként tártuk fel a szenzoros primer érzékhámsejtek és nyúlványrendszerük háromdimenziós szerveződését. A sejtek centrális nyúlványát követve azt tapasztaltuk, hogy ezek közvetlenül, elágazódás nélkül futnak a legközelebbi szegmentális idegbe. Ez azt mutatja, hogy a szegmentális idegek lefutását a középdarab szelvényekben a primer érzéksjtek pozíciói erősen determinálják. A szenzoros rendszert elektrofiziológiai módszerekkel Knapp és Mill (1967) vizsgálta kellő részletességgel. Kimutatták, hogy a szenzoros mezők egy szelvényen belül átfednek és átnyúlhatnak a szomszédos szelvények területeire is. Vizsgálataink során -kis számban ugyan- sikerült kimutatnunk interszegmentális összeköttetéseket, amelyek a szelvényhatárokon áthúzódva részt vehetnek két szelvény szenzoros rendszerének összekapcsolásában. Nagyon valószínű, hogy a földigilisztában egy adott testszelvény egy szenzoros egységnek feleltethető meg és a szomszédos szelvények érzékelésének összehangolásában nagyobb szerep tulajdonítható a központi idegrendszernek.

Másik lehetőség, hogy a szomszédos szenzoros struktúrák szinapszissal, vagy gap junction-el kommunikálnak. Mivel ezek a celluláris struktúrák gátolják a DiI diffúzióját így ezekben kísérletekben kimutatásukra nem volt lehetőség. A Lucifer yellow ellenben kis molekulatömege miatt képes átmenni a gap junction-on. Ha összehasonlítjuk a két töltés eredményeit, azt kapjuk, hogy a Lucifer yellow-al valóban több sejt jelölődött. A prosztómiális idegtöltéseket összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy Lucifer yellow töltést követően a prosztómiális epithél teljes területén, míg DiI-al csak a prosztómium egyik -a

töltött ideggel megegyező- oldalán jelölődtek primer érzéksjtek (11A, B, 14A. ábra). Kimutattuk tehát, hogy a gap junction-nak kitüntetett szerepe lehet a szelvények közötti kommunikációban.

A DiI töltésekkel a szegmentális idegeket összekötő haránt rostokat is sikerült láthatóvá tenni. Ezek a struktúrák kapcsolatot teremtve a szegmentális idegek között, feltételezhetően a perifériás idegrendszer kontinuitását hivatottak fenntartani.

Perifériás DiI jelöléseket alkalmazva kimutattuk, hogy a prosztómiális felület csillóval rendelkező, a külső környezettel közvetlen kapcsolatban lévő uni- és multiciliáris érzéksjtjei akkumulálták a festéket. A sejtek jelölődött centrális nyúlványai a prosztómiális idegen keresztül a cerebrális ganglion frontális, anterior részeiben végződtek, vagy az agy laterális részén az oesophageális gyűrű oldalsó garatkonnektívumán keresztül a suboesophagiális ganglion irányába futottak. Ezen eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az anterior érzékelésben a központi idegrendszer több színje is részt vesz. A legfontosabb primer szenzoros feldolgozó rész az agyi ganglionok elülső részén található, de a szenzoros információk a lejjebb lévő idegrendszeri struktúrákhoz is közvetlenül eljutnak.

A középdarab szelvényeiben perifériás jelölést követően a rostok a szegmentális idegeken keresztül a ventrális ganglionba futottak. A beérkezett rostok közvetlenül a szegmentális ideg beszájadásánál T-alakban elágazódtak, fel és leszálló idegpályákat képezve a ganglion ventrolaterális részén. Ebből a szerveződésből arra következtethetünk, hogy a szenzoros sejtek centrális nyúlványai nemcsak egy ganglion aktivitását módosíthatják, hanem szerepet játszhatnak a ganglionok működésének összehangolásában is. Ezt megerősítik a laboratóriumunkban korábban elvégzett pályajelölési kísérletek adatai, amelyek szerint a centrális nyúlványok a ganglionokban 4 egymás utáni dúcban nyomon követhetők (Zsombok, 2002).

A szenzoros rostok központi reprezentációja már korábbi anatómiai leírásokból ismert (Retzius, 1892; Dorsett, 1978). Ezek a hisztológiai munkák sorozatmetszetek elemzése alapján rekonstruálták a szenzoros pályák szerveződését. Munkánk során konfokális képalkotást használva lehetővé vált a központi szenzoros rostjainak háromdimenziós, torzításmentes vizsgálata. A ventrolaterális és ventromediális szenzoros axonkötegek közvetlenül a ventrális óriásaxon mellett, azt körülölelve helyezkedtek el. Az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a ventrális óriásaxon az efferens motoros mintázat kialakításában vesz részt (Büsches és Manira 1998). A perifériáról érkező szenzoros információk megváltoztathatják a központi ritmusgenerátor, a VNC frekvenciáját és ezen keresztül befolyásolhatják az efferens motoros mintázat manifesztálódását. A szenzoros axonkötegek és

a ventrális óriásaxon közötti kapcsolat fontos szerepet kaphat a gyors bőrreflexek kialakításában.

5.3. GABA-immunreaktivitás az *Eisenia fetida* és a *Limnodrilus hoffmeisteri* szenzoros rendszerében

Eredményeink szerint az *Eisenia fetida* szenzoros rendszerében a primer érzékhámsejtek egy része GABA-IR. Mivel a preabszorpciós teszt elvégzése után, illetve a negatív kontrollokban soha nem kaptunk festődést, feltételezhetjük, hogy valóban GABA-tartalmú sejteket és rostokat festettünk meg. Az általunk használt szérum specifitását több laboratórium tesztelte mind gerinctelen (Spörhase-Eichmann, 1997) mind gerinces fajokban (Meza, 1998) és specifikus festődést értek el vele.

A jelölődött struktúrák egységesen festődtek, az immunpozitív sejtek között nem tapasztaltunk intenzitásbeli különbséget. Ebből arra tudunk következtetni, hogy az általunk alkalmazott többlépcsős immunfestés érzékenysége nem megfelelő ezen mérések kivitelezéséhez. Ennek megfelelően a továbbiakban eltekintettünk az immunreakció denzitás analizisétől, és a relatív GABA-tartalom különbségek meghatározásától.

A GABA, mint közismerten gátló neurotranszmitter (Sepherd, 1994) előfordulása nem szokványos a receptorsejtekben, bár akadnak irodalmi adatok, amelyek szerint a gerincesek szervezetében is előfordulnak GABAerg szenzoros sejtek, amelyek az érzetek finom modulálásában játszhatnak szerepet (Meza, 1998). Az *Eisenia fetida*-ban, a *Limnodrilus hoffmeisteri*-ben és feltehetően a többi *Oligochaeta* fajban is a GABA-IR sejtek eloszlása, a sejtek morfológiai vizsgálata, valamint kapcsolatainak elemzése adhat magyarázatot a GABA érzékelésben játszott lehetséges szerepére.

Munkánk során meghatároztuk a GABA-erg érzéksejtek eloszlási mintázatát, valamint a sejtek morfológiai jellegzetességeit.

A GABA-IR sejtek eloszlása követte a neuronális töltésekkel már korábban meghatározott eloszlási mintázatot, preferált testtájakat, illetve szelvény régiókat -a nyereg szelvényein kívül- nem találtunk. Feltehetően a nyereg serdülési dudoraiban nagy számban előforduló, direkt lefutású centrális nyúlvánnyal bíró GABA-IR sejtek a párzási viselkedés kialakításában, a partner testfelszínének érzékelésében vesznek részt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a GABA egy -a szenzoros rendszerben- általánosan jelen lévő transzmitter.

Viszonylag egyszerűen magyarázható a GABA-IR magányos érzékszervek funkciója, amelyekről korábbi anatómiai és fiziológiai kísérletek eredményei alapján feltételezték, hogy a bőrízomtömlő hámjának túlfeszülését akadályozzák meg, azaz feszülési receptorként működnek (Edwards és Kuffler, 1959; Craelius és Fricke, 1981). Eredményeink részben összhangban vannak ezzel a feltételezéssel, mert kimutattuk, hogy a jelölt magányos érzékszervek többségének centrális nyúlványa közvetlenül a ventrális ganglionokba projiciál anélkül, hogy a szubepidermális plexussal szinaptizálna.

A ventrális ganglionokban a GABA-IR rostok csak két szenzoros kötegbe (ventrolaterális és ventromediális) koncentrálódtak, nyilvánvaló hogy a központi idegrendszer meghatározott rostkötegeivel alakítanak ki szinaptikus kapcsolatokat. A ventrolaterális szenzoros köteg vastag hüvelyt képez a mozgáskoordinációban kiemelkedő szerepet játszó ventrális óriásaxonok körül (Mill, 1982) és azokkal szinaptizál. A ventrális óriásaxonok az ún. óriás motoneuronokkal szinaptizálnak, azok aktivitásának szabályozásával befolyásolja a bőrízomtömlő hosszanti izmainak összehúzódásait (Jamieson, 1981; Mill, 1978). Feltételezhető, hogy a GABA-IR bemenetek a ventrális óriásaxonok gátlása révén direkt módon befolyásolhatják az óriás motoneuronok aktivitását és így a bőrízomtömlő izomzatának kontrakcióját.

Az *Oligochaeta* fajok központi szenzoros rendszerének neurokémiai heterogenitása jól ismert jelenség, de a GABA-IR rostok kivételével a többi transzmitter-specifikus érzőrost reprezentációja nem korlátozódik a ventromediális és ventrolaterális érzőkötegekre. Így a nitrogén-monoxid szintáz hisztokémiai markereként ismert NADPH-diaforáz aktivitás mind az öt pár szenzoros kötegben megfigyelhető, a peptiderg rostok főleg a dorzális és a ventrolaterális kötegekben futnak (Solt és mtsai, 2001; Zsombok, 2002).

Nehezebben értelmezhető a szubepidermális plexus GABA-IR végződéseinek funkciója. Korábbi vizsgálataink szerint a plexusba főleg a szenzillákba tömörült sejtek nyúlványai projiciáltak. A szenzillák, jelen ismereteink szerint főleg penetratív uni- és multiciliáris sejteket tartalmaznak, amelyek a fiziológiai vizsgálatok adatai szerint főleg a kemorecepcióban játszanak szerepet (Laverack, 1963; Mill, 1978, 1982).

A szenzillák GABA-IR sejtje feltehetően nemcsak a központi idegrendszer egyes struktúráinak működését gátolják, hanem a szenzoros sejtek egy részének aktivitását is befolyásolhatják, így szerepet játszhatnak az érzékelési folyamatok finom modulálásában, esetleg a bőrízomtömlő receptív mezőinek kialakításában. Laverack összefoglaló munkájában (1963) a plexus excitátoros és inhibitoros aktivitású struktúráiról számolt be. Elektrofiziológiai vizsgálatok (Mill, 1982), valamint jelen tanulmány töltési kísérletei a

bőrízomtömlő hámjában elkülönült receptív mezőket azonosítottak. Ezek alátámasztják azt a feltételezést, miszerint a plexusnak integratív szerep tulajdonítható. Ennek a működésnek a háttérében pedig lehetséges moduláló transzmitterként szerepelhet a GABA.

Az ultrastrukturális vizsgálatok során kimutattuk, hogy a jelölt preszinaptikus profilok nagy számban tartalmaztak kisméretű pleomorf, aglanuláris vezikulumokat. Ez a morfológiai megállapítás korrelál a gerinces (Somogyi és Soltész, 1986; Ottersen és mtsai, 1988; Gábriel és Straznicky, 1995), valamint a gerinctelen (Watson, 1988; Telkes és mtsai, 1996, Ganeshina és Menzel, 2001) központi idegrendszerben már jellemzett GABA-IR profilokkal.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az immunciokémiai vizsgálataink egyértelműen bizonyítják, hogy a GABA a szenzoros mechanizmusok egy lehetséges transzmittere. A GABA-erg neuronok anatómiai szerveződése alapján feltételezhetően szabályozó funkciót látnak el ezen sejtek. Ahhoz, hogy a GABA modulálás szerepét tisztán egyértelműen meghatározzuk további fiziológiai, farmakológiai és szinaptológiai vizsgálatok elvégzése szükséges. Jelen munka egzakt adatai remélhetően hozzájárulnak a *Oligochaeta* szenzoros rendszer GABA szabályozásának megértéséhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Három kevéssertéjű gyűrűsféreg, a földigiliszta (*Lumbricus terrestris* L.), a trágyagiliszta (*Eisenia fetida* Sav.) és a csövájó féreg (*Limnodrilus hoffmeisteri* Clap.) szenzoros rendszerének anatómiai szerveződését tanulmányoztuk fény- és elektronmikroszkópos módszerek, hisztokémiai és pályajelölési eljárások alkalmazásával.

Az érzékszervek eloszlási mintázatát pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokkal határoztuk meg az *E. fetida* és *L. hoffmeisteri* egyedek bőrizomtömlőjében. A legelső és legutolsó 3-5 testszelvény nagy számban tartalmaz érzékszerveket, ti. ezek a menekülési és visszahúzó reflex kiváltásában játszanak szerepet.

Nyomjelző molekulákat (DiI és LY) és konfokális lézerszenning mikroszkópiát alkalmaztunk az érzékszervek és nyúlványaik azonosítására *L. terrestris*-ben és elsőként rekonstruáltuk a szenzoros rendszer háromdimenziós szerveződését egy oligochaeta fajban. Kimutattuk, hogy a perifériás szenzoros rendszer nem szegmentális szerveződésű, mert a szomszédos szelvények között interszegmentális összeköttetések találhatók és egy hasi dúcba több szelvényből származó szenzoros rostok futnak be. Valószínű, hogy a hasi dúcok több szelvény működését szabályozó integratív egységek.

Fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémiai eljárásokkal tanulmányoztuk a szenzoros rendszer GABA-immunreaktív struktúráinak eloszlási mintázatát az *E. fetida* és a *L. hoffmeisteri* fajok különböző testrégióiban (prosztómium, közepdarab, testvég). A jelölt sejteket csoportosítottuk morfológiai sajátosságaik (a szóma mérete, alakja), valamint a nyúlványaik lefutása alapján. A szubepidermális plexusban interszegmentálisan futó GABA-IR rostokat azonosítottunk. Az ultrastrukturális vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a GABA-IR rostok nem GABA-s rostokra adnak bemeneteket a szubepidermális plexusban, ami arra utal, hogy a plexusban a szenzoros rostok egymás aktivitását befolyásolhatják. A ventrális ganglionok interszegmentális szenzoros axonkötegei közül csak a ventrolaterális és a ventromediális kötegekben futottak GABA-IR rostok. A ventrolaterális szenzoros köteg a ventrális óriásaxon körül helyezkedik el, arra ad bemeneteket. A ventromediális axonköteg a dorzális óriásaxonok szómáinak kollaterálisával szinaptizálnak, azok működését befolyásolják.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a szenzoros rendszer GABA-IR struktúrái a központi idegrendszer óriás interneuronjainak (ventrális és dorzális óriásaxonok) aktivitását modulálva befolyásolják a motoros válaszreakciók kialakítását és a szelvények működésének összehangolását.

7. SUMMARY

The anatomical organisation of the sensory system of three *Oligochaetes* (*Lumbricus terrestris* L., *Eisenia fetida* Sav., *Limnodrilus hoffmeisteri* Clap.) was observed by means of light and electron microscopic methods, histochemical and neural tracing processes.

We investigated the distribution pattern of sensory organs of the body wall of *E. fetida* and *L. hoffmeisteri* with scanning electronmicroscopical techniques. The first and the last 3-5 body segments contained sensory organs in high numbers, these could play role in the escape and withdrawal reflexes.

Neuronal tracers (DiI and LY) and confocal laserscanning microscopy were applied to determine primary sensory cells and their processes in *L. terrestris*. For the first time in this study the three-dimensional organization of the sensory system of an *Oligochaeta* species was reconstructed. We showed that the peripheral sensory system was not segmental in its arrangement, because between the neighbouring segments intersegmental connections were found and sensory fibres from several segments run into one ventral ganglion. Presumably the ventral ganglia have integrative functions regulating the activity of more segments.

By means of light- and electronmicroscopical immunocytochemistry the distribution pattern of GABA-IR structures of the sensory system of *E. fetida* and *L. hoffmeisteri* was observed in different body regions (prostomium, midbody and caudal segments). The labelled primary sensory cells were classified according to morphological features (the size and shape of the soma) and the running of their processes. We identified intersegmental GABA-IR fibres in the subepidermal plexus.

Using ultrastructural methods we showed that the GABA-IR fibres gave inputs to the non GABA-IR fibres in the subepidermal plexus suggesting the sensory fibres modulate one another activity in the plexus. From the intersegmental sensory axonbundles of the ventral ganglia there were GABA-IR fibres only in the ventrolateral and in the ventromedial bundles. The ventrolateral sensory bundle is located around the ventral giant axon and gives inputs as well. The ventromedial axon bundle has synaptic connections with the collaterals of soma of the dorsal giant axon and influences its activity.

According to our results we can assume the GABA-IR structures of the sensory system mediated in the motor reactions and segment synchronization by modulating the activity of giant interneurons (ventral and dorsal giant axons) of the central nervous system.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Aros B, Röhlich P, Vigh B. 1971a. Fine structure of the peripheral sensory cells in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. I. The solitary sensory cells. Acta Biol Hung 22:141-153.
- Aros B, Röhlich P, Vigh B. 1971b. Fine structure of the peripheral sensory cells in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. II. The epidermal sensory organs. Acta Biol Hung 22:443-456.
- Aros B, Vigh-Teichmann I, Vigh B, Kovács J. 1978. Scanning electronmicroscopy of the prostomium and anterior segments of the Earthworm (*Lumbricus terrestris* L., *Eisenia foetida* Sav.). Z Mikrosk Anat Forsch 92:753-769.
- Boris IJ, Irin VS, Lester RGC. 1998. Sensory cells in the sucker of *Craspedella pedum* (Plathelminthes, Temnocephalida): in vivo staining with DiO and SEM and TEM observations. Zoomorphology 118:61-68.
- Brusca RC, Brusca GJ. 1990 Invertebrates. Sunderland, Massachusetts. pp 879-889
- Bullock TH. 1945. Functional organization of the giant fiber system of *Lumbricus*. J Neurophysiol 8:55-71.
- Büschges A, El Manira A. 1998. Sensory pathways and their modulation in the control of locomotion. Curr Opin Neurobiol 8:733-739.
- Clark RB. 1960a. Habituation of the polychaete *Nereis* to sudden stimuli. I. General properties of the habituation process. Anim Behav 8:83-91.
- Coggeshall, RE. 1965. A fine structural analysis of the ventral nerve cord and associated sheath of *Lumbricus terrestris* L. J Comp Neurol. 125:393-438.
- Coonfield BR. 1932. The peripheral nervous system of earthworm. J Comp Neurol 55:7-14.
- Curry WJ, Fairweather J, Johnston CF, Haoton DW, Buchanan KD. 1989. Immunocytochemical demonstration of vertebrate neuropeptides in the earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida, Oligochaeta). Cell Tissue Res 257:577-586.
- Craelius W, Fricke RA. 1981. Release of ³H-gamma-amino-butyric acid (GABA) by inhibitory neurons of the crayfish. J Neurobiol 12:249-258.
- Csoknya M, Lengvári I, Benedeczky 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, Barna J, Bánvölgyi T, Hiripi L, Eckert M, Hámori J, Elekes K. 1997. Octopamine-containing neurons in the alimentary tract of the earthworm (*Eisenia fetida*). *Brain Res* 778:414-417.
- Csoknya M, Takács B, Koza A, Dénes V, Wilhelm M, Hiripi L, Kaslin J, Elekes K. 2005. Neurochemical characterisation of nervous elements innervating the body wall of earthworms (*Lumbricus*, *Eisenia*): immunohistochemical and pharmacological studies. *Cell Tiss Res.* 321: 479-490.
- Delcomyn F. 1980. Neural basis of rhythmic behaviour in animals. *Science* 210:492-498.
- Dorsett DA. 1978. Organization of the nerve cord. In: Mill PJ, editor. *Physiology of Annelids*. Academic Press, London. p 115–159.
- Edwards C, Kuffler SW. 1959. The blocking effect of γ -aminobutyric acid (GABA) and the action of related compounds on single nerve cells. *J Neurochem* 4:19-30.
- Ehinger B, Myhrberg E. 1971. Neural localisation of dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in the central and peripheral nervous system of *Lumbricus terrestris* L. *Histochem Cell Biol* 28:265-275.
- Friesen WO, Chang J. 2001. Sensory and central mechanisms control of intersegmental coordination. *Curr Opin Neurobiol* 11:678-683.
- Ganeshina O, Menzel R. 2001. Gaba-immunoreactive neurons in the mushroom bodies of the honeybee: an electron microscopic study. *J Comp Neurol* 473:335-349.
- Gábríel R, Straznický C. 1995. Synapses of optic axons with GABA- and glutamate-containing elements in the optic tectum of *Bufo marinus*. *J Brain Res* 36:329-340.
- Gesser BP, Larsson LI. 1986. Enkephalins may act as sensory neurotransmitters in earthworms. *Cell Tissue Res* 246:33-37.
- Grillner S, Graybiel AM. 2006. *Microcircuits: The interface between neurons and global brain function (Dahlem Workshop Reports)* MIT Press.
- Günther J, Walther JB. 1971. Funktionelle Anatomie der dorsalen Riesenfaser-Systeme von *Lumbricus terrestris* L. (Annelida, Oligochaeta). *Z Morphol Tiere* 70:253-280.
- Günther J. 1972. Giant motor neurons in the earthworm. *Comp Biochem Physiol.* 42:967-973.

- Günther J, Schürmann FW. 1973. Zur Feinstruktur der dorsalen Riesenfaser-system im Bauchmark des Regenwurms. II. Synaptische Beziehungen der proximalen Riesenfaserkollateralen. *Z Zellforsch.* 139:369-396.
- Hess WN. 1925a. Nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *J Morph Physiol.* 40:235-259.
- Hess WN. 1925b. Photoreceptors of *Lumbricus terrestris*, with special reference to their distribution, structure and functions. *J Morphol* 41:235-260.
- Honig MG, Hume RI. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long term cultures. *J Cell Biol* 103:171-187.
- Jamieson BGM. 1981. The ultrastructure of the Oligochaeta. Academic Press, London. p 211-267.
- Knapp MF, Mill PJ. 1967. Chemoreception and efferent sensory impulses in *Lumbricus terrestris* linn. *Comp Biochem Physiol* 23:263-276.
- Knapp MF, Mill PJ. 1971. The fine structure of ciliated sensory cells in the epidermis of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Tissue Cell* 3(4):623-36.
- Koza A, Csoknya M. 2004. Embryogenesis of GABAergic elements in the nervous system of *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Acta Biol Hun.* 55:323-333.
- Langdon FE. 1895. The sense organs of *Lumbricus agricola* Hoffm. *J Morphol* 11:193-23.
- Laverack MS. 1963. The physiology of earthworm. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris.
- Lengvári I, Csoknya M, Lubics A, Szeliér M, Hátori J. 1994. Proctolin immunoreactive elements in the nervous system of earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Acta Biol Hung* 45:337-345.
- Lukas JR, Aigner M, Denk M, Heinzl H, Burian M, Mayr R. 1998. Carbocyanine post-mortem neural tracing: influence of different parameters on tracing distance and combination with immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 46:901-910.
- Marder E, Calabrese RL. 1996. Principles of rhythmic motor pattern production. *Physiol Rev* 76:687-711.
- Meza G. 1998. GABA as an afferent neurotransmitter in the vestibular sensory periphery of vertebrates. *Neurobiol.* 6:109-125.
- Mill PJ. 1975. The organisation of the nervous system in annelids. In: Usherwood PNR & Newth DR, editors. "Simple" Nervous Systems. Arnold, London. p 211-264.

- Mill PJ. 1978. Sense organs and sensory pathways. In: Mill PJ, editor. Physiology of Annelids. Academic Press, New York. p 63-114.
- Mill PJ. 1982. Recent developments in earthworm neurobiology. *Comp Biochem Physiol* 73A:641-661.
- Miller JA, Ting HP. 1949. The role of the subepidermal nervous system in the locomotion of the earthworm. *Ohio J Sci* 49:109-114.
- Moment GB, Johnson JE. 1979. The structure and distribution of external sense organs in newly hatched and mature earthworms. *J Morphol.* 159:1-6.
- Myhrberg HE. 1967. Monoaminergic mechanisms in the nervous system of *Lumbricus terrestris* L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 81:311-343.
- Myhrberg HE. 1971. Ultrastructural localization of monoamines in epidermis of *Lumbricus terrestris* L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 117:139-154.
- Myhrberg HE. 1979. Fine structural analysis of the basal epidermal receptor cells in the earthworm (*Lumbricus terrestris* L.). *Cell Tissue Res* 203:257-266.
- Niida A, Iwasaki M, Yamaguchi T. 1998. Functional role of the N-cells as anterior thoracic stretch receptors in a terrestrial isopods (*Armadillidium vulgare*). *Israel J. Zool.*, 44, 487-500.
- Ogawa F. 1939. The nervous system of earthworm (*Pheretima communissima*) in different ages. *Sci Rep Tohoku Univ, Ser. IV*, 13:395-488.
- Ottersen OP, Matsen S, Storm-Mathisen J, Somogyi P, Scopsi L, Larson LI 1988. Immunocytochemical evidence suggest that taurine is colocalized with GABA in the Purkinje cell terminals, but that the stellate cell terminals predominantly contain GABA: a light- and electronmicroscopic study of the rat cerebellum. *Exp Brain Res* 72:407-416.
- Perruccio L, Kleinhaus AL. 1996. Anatomical pathways connecting lip sensory structures and central nervous system in hirudinid leeches visualized by carbocyanine dyes and laser scanning confocal microscopy. *Invertebr Neurosci* 2(3):183-188.
- Prosser CL. 1935. Impulses in the segmental nerves of the earthworm. *J Exp Biol* 12:95-104.
- Reglődi D, Lubics A, Slezák, S, Szelier M, Lengvári I. 1997a. Substance P immunoreactive elements in the nervous system of earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Acta Biol Hung.* 48:189-200.
- Reglődi, D., Lubics, A., Szelier, M., Lengvári, I. 1997b. Serotonin immunoreactivity in the peripheral nervous system of Oligochaeta. *Acta Biol Hung.* 48:439-451.

- Reglódi, B., Slezák, S., Lubics, A., Szelier, M., Elekes, K., Lengvári, I. 1997c. Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of *Lumbricus terrestris*. *Cell Tissue Res.* 288:575-582.
- Reglódi D, Lubics A, Szelier M, Lengvári I. 1999. Gastrin and cholecystokinin-like immunoreactivities in the nervous system of the earthworm. *Peptides* 20:569-577.
- Reglódi D, Lengvári I, Szelier M, Vigh E, Arimura A. 2000. Distribution pattern of PACAP-like immunoreactivity in the nervous system of Oligochaeta. *Peptides* 21:183-188.
- Retzius G. 1892. Das Nervensystem der Lumbricinen. *Biol Unters N F*, 3:1-16.
- Robertson HA, Osborne NN. 1979. Putative neurotransmitters in the annelid central nervous system: presence of 5-hydroxy-tryptamine and octopamine-stimulated adenylate cyclases. *Comp Biochem Physiol* 64c:7-14.
- Röhlich P, Aros B, Virágh S. 1970. Fine structure of photoreceptor cells in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 104:345-357.
- Rude S. 1966. Monoamine-containing neurons in the nerve cord and the body wall of *Lumbricus terrestris* L. *J Comp Neurol* 128:397-412.
- Smallwood WM. 1926. The peripheral nervous system of the common earthworm, *Lumbricus terrestris*. *J Comp Neurol* 42:35-55.
- Solt Zs, Zsombok A, Pollák E, Molnár L. 2001. Transmitter specific sensory pathways of lumbricid earthworms: a histochemical study with functional correlations. *Proc. 28th Göttingen Neurobiol. Conference*, George Thieme Verlag, Stuttgart, Vol. II. 478.
- Somogyi P, Soltész I. 1986. Immunogold demonstration of GABA in synaptic terminals of intracellularly recorded, horseradish peroxidase-filled basket cells and clutch cells in the cat's visual cortex. *Neurosci* 19:1051-1065.
- 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 nerve 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. Rostal and caudal ganglia. *Cell Tissue Res* 249:625-632.
- Spörhase-Eichmann U, Winkler M, Schürmann FW. 1997. GABAergic, dopaminergic and peptidergic sensory cells in the epidermis of earthworms. *Soc Neurosci* 23:388-393.
- Spörhase-Eichmann U. 1998. Dopaminergic sensory cells in the epidermis of the earthworm. *Naturwissenschaften* 85:547-550.

- Sepherd GM. 1994. Neurobiology. 3rd edition. Oxford University Press, New York- Oxford.
- Teichmann I, Aros B, Vigh B. 1966. Histochemical studies on Gömöri-positive substances. III. Examination of the earthworm's neurosecretory system (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida*). Acta Biol Hung. 17:329-357.
- Telkes I, Csoknya M, Buzás P, Gábríel R, Hámori j, Elekes K. 1996. GABA-immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Annelida). Cell Tiss Res. 285:463-475.
- Tyler NM, Altman JS. 2004. Motor and sensory flight neurones in a locust demonstrated using cobalt chloride. J Comp Neurol 157:117-138.
- Vining EP, Drewes D. 1985. Restoration of sensory and motor function in earthworm escape reflex pathways following ventral nerve cord transplantation. J Neurobiol 16:301-315.
- Warner AE, Lawrence PA. 1982. Permeability of gap junction at the segment border; in insect epidermis. Cell 18:243-252.
- Watson AHD. 1988. Antibodies against GABA and glutamate label neurons with morphologically distinct synaptic vesicles in the locust central nervous system. Neurosci 26:33-44.
- Zsombok, A. 2002 NOS/NADPH-diaforáz pozitív neuronok anatómiája és fiziológiai tulajdonságai gerinctelen modell-állatokban. PhD értekezés, Pécs..

9. PUBLIKÁCIÓK

9.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk jegyzéke

Kiszler G, Várhalmi E, Berta G, Molnar L. (2012) Organization of the sensory system of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida, Clitellata) visualized by DiI. *J Morphol*

IF: 1,7

Molnár L, **Kiszler G**, and Pollák E. (2006) Identification and pattern of primary sensory cells in the body wall epithélium of the tubificid worm, *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Hydrobiologia*, 564: 45-50. **IF: 1,201**

Molnár L, **Kiszler G**, Pollák E, and Deres L. (2006) Distribution pattern of γ -amino butyric acid immunoreactive neural structures in the central and peripheral nervous system of the tubificid worm, *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Hydrobiologia*, 564: 33-43. **IF: 1,201**

9.2. A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások és posztterek jegyzéke

Kiszler G, Boros Á, Pollák E, Solt Zs, Molnár L. (2007) A GABAerg szenzoros rendszer anatómiája, mintázata és fejlődése *Eisenia fetida*-ban (Annelida, Oligochaeta). XI. MITT Konf. Szeged. Poszter-absztrakt.

Kiszler G, Várhalmi E, Pollák E, Molnár L, (2008) Organisation of the sensory system of the earthworm body wall: a DiI tracing study. IBRO Konf. Debrecen. Poszter-absztrakt.

Kiszler G, Várhalmi E, Berta G, Molnar L. (2009) Anatomical and neurochemical organization of the sensory system of the earthworm *Lumbricus terrestris*. 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience society, Göttingen, Germany, 25-29 March 2009. Poster Abstract.

9.3. Egyéb tudományos közlemények jegyzéke

Boros A, Herbert Zs, **Kiszler G**, Németh J, Reglődi D, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Shioda S, Matsuda K, Pollák E, and Molnár L. (2008) Changes in the expression of PACAP-like compounds during the embryonic development of the earthworm *Eisenia fetida*. Journal of Molecular Neuroscience, DOI: 10.1007/s12031-008-9102-6. **IF: 1,735**

Várhalmi E, Somogyi I, **Kiszler G**, Németh J, Reglődi D, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Pollák E, Molnár L, (2008) Expression of PACAP-like compounds during the caudal regeneration of the earthworm *Eisenia fetida*. Journal of Molecular Neuroscience, DOI: 10.1007/s12031-008-9125-z. **IF: 1,735**

Krecsák L, Micsik T, **Kiszler G**, Krenács T, Szabó D, Jónás V, Császár G, Czuni L, Gurzó P, Ficsor L, Molnár B. (2011) Technical note on the validation of a semi-automated image analysis software application for estrogen and progesterone receptor detection in breast cancer. Diagnostic Pathology, 6:6 **IF: 1,390**

Krenacs T, Zsakovics I, Micsik T, Fonyad L, Varga SV, Ficsor L, **Kiszler G**, Molnar B. (2011) Digital microscopy – the upcoming revolution in histopathology teaching, diagnostics, research and quality assurance. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Microscopy: Science, Technology, Application and Education. Book Series, Volume 2 ISBN (13): 978-84-614-6190-5

9.4. Egyéb konferencia előadások jegyzéke

Varhalmi E, Somogyi I, **Kiszler G**, Pollak E, Lubics A, Reglodi D, Shioda S, Molnar L. (2007) Does PACAP influence invertebrate nervous system regeneration? 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides, Manchester, Vermont (USA). 3-8 September 2007. Poster Abstract.

Boros Á, **Kiszler G**, Pollák E, Reglődi, D, Molnár L. (2007) PACAP expression during embrionic development of *Eisenia fetida*. 8th International Symposium for VIP, PACAP

and Related Peptides, Manchester, Vermont (USA). 3-8 September 20007. Poster Abstract.

Varhalmi E, Somogyi I, **Kiszler G**, Pollak E, Lammel K, Lubics A, Reglodi D, Nemeth J, Molnar L. (2008) Possible role of PACAP in regeneration of the ventral nerve cord ganglia of the earthworm: a biochemical and immunohistochemical approach. International IBRO workshop, Debrecen, Hungary, 24-26 January 2008. Poster Abstract.

Krecsák L, **Kiszler G**, Micsik T, Krenács T, Ficsor L, Szabó D, Jónás V, Molnár B. (2010) A preliminary validation study of NuclearQuant and MembraneQuant applications for immunostain detection in breast cancer. Pathology Visions 2010. San Diego, California, USA Poster Abstract.

Kiszler G, Sápi Z, Krenács T. (2011) Fluorescent digital microscopy: Multilayer-multichannel scanning for accurate FISH signal analysis. 23rd European Congress of Pathology, Helsinki, Finland 27 August-1 September 2011. Presentation.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm mindazoknak a segítségét, akik lehetővé tették a dolgozat elkészítését. Elsőként Dr. Molnár Lászlónak, a témavezetőmnek és az Álattan Tanszék többi munkatársának: Várhalmi Eszternek, dr. Pollák Editnek, Solt Zsuzsának és Pozsgay Évának.

Köszönet Dr. Seress Lászlónak és ifj. Dr. Kellermayer Miklósnak a módszertani támogatásért.

A legtöbb köszönet a családomat illeti, mivel az ő támogatásuk nélkül nem született volna meg ez a munka. Ezért külön köszönöm feleségemnek, Tücsöknek, szüleimnek és nagyapámnak.

És természetesen a cimboráimnak.