

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Peptiderg rendszerek reorganizációja
az *Eisenia fetida* agyregenerációja során

PhD tézisek

Bánvölgyi Tamás

Pécs, 2004

Bevezetés

Az összehasonlító neurobiológiai kutatások sarkköve mind a mai napig a gerinctelen állatokon, ill. egyes kitüntetett fajain folyó vizsgálatok. Számos gerinctelen állatfaj idegrendszere modellként szolgált/szolgál a neuronális szabályozás eseményeinek, továbbá az összetett szabályozó és integrációs folyamatok celluláris és idegrendszeri alapjainak tanulmányozására. Amikor regenerációról beszélünk, legtöbbször számunkra a folyamat elsősorban elvesztett testrészek pótlását jelenti. A regeneráció azonban sokkal tágabb jelentéssel bír és több formája is ismert. Néhányat ezek közül megemlíthetünk a teljesség igénye nélkül, pl. fiziológias- (sejtmegújulás), rekonstrukciós- (elvesztett testrészek pótlása), helyreállításos regeneráció (morfallaxis, epimorfózis) és aszexuális szaporodás (bimbózás, hasadás). Látható, hogy a regeneráció fogalma is összetett és nehéz egyértelműen és pontosan meghatározni.

Az alacsonyabbrendű gerinctelen állatok jó modellként használhatók a regenerációs vizsgálatokhoz, a viszonylag kisszámú neuront tartalmazó idegrendszerük miatt, mivel a neuronok könnyebben nyomonkövethetők valamint jellemezhetők a gangliogenezis folyamatában.

Viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre az *Eisenia fetida* idegrendszerének regenerációjáról. E részleges ismeretek miatt munkacsoportunk tagjai a gyűrűsférgék regenerációjában megjelenő és szerepet játszó transzmitterek - GABA, 5-RT, TH. - lehetséges szerepét már korábban leírták.

Mivel a peptidoknak a férgek regenerációjában betöltött szerepe is csak részben ismert ezért vizsgálatom a eNS-ben előforduló egyes peptidtartalmú neuronok gyakoriságát, a regenerációs szakaszokbeli megjelenését és megoszlását kívánta tisztázni. E peptidek közül az FMRFamidről ismert, hogy planáriák epimorfikus regenerációjában hegeképző hormonnak szerepel, ezért a regeneráció korai szakaszában a heg formálódásában játszhat szerepet. Az NPY-ről tudjuk, hogy szerepe van a rovarok idegrendszeri metamorfózisban. A pentapeptid proktolint, ma már számos gerinctelen állatban azonosították, Oligochaeták esetében napjainkig csak a CNS-ből ismert előfordulása, regenerációbeli szerepe nem tisztázott.

Célkitűzés

A gyűrűsférgék közül a kevéssertéjűek osztályához tartozó *Eisenia fetida* és *Lumbricus terrestris* régóta használják a regenerációs vizsgálatokban modell-állatként (Stéphan-Dubois, 1954; Blackshaw, 1987). Ezért az elmúlt néhány évben mi is végeztünk hasonló vizsgálatokat főleg a CNS regenerációjával kapcsolatban.

Mindezek előtt immunhisztokémiai vizsgálatokkal akartuk megismerni a két faj eNS-ében levő neuronok kémiai természetét. Tekintettel arra, hogy az Oligochaeták központi idegrendszerének neuronjait csak részben, a regenerációs folyamatok, és az azokat irányító szignál molekulák pedig kevéssé ismertek, ezért e tanulmány kiterjedt:

1./ Ép állatokon végzett vizsgálatokra:

1a./ Az *Eisenia fetida* agydúcában levő neuronok számának meghatározására;

1b./ A proktolin-, FMRFamid-, NPY-IR idegelemek azonosítására és pontos előfordulási térképeinek elkészítésére,

1c./ A kémiaiilag különböző neuronok kvantitatív és kvalitatívanalízisére;

2./ Regenerációs vizsgálatokra, melynek során meg kívánjuk ismerni;

2a./ Az agyregeneráció szakaszait;

2b./ Az egyes szakaszokban az említett peptid tartalmú neuronok megjelenését ill. a folyamat során bekövetkező számszerű változásait;

2c./ A neuronoknak a dúcokon belüli elrendeződését és a fő neuroncsoportok kialakulásának sorrendjét;

2d./ A regenerálódó agyban az újonnan képződött idegsejtek eredetét.

Anyag és módszer

Eisellia fetida fajok ivarérett példányait használtuk. Regenerációs vizsgálatainkhoz agyírtást végeztünk.

A vizsgálat céljainak megfelelően 5., 10., 24., posztoperatív órában, ill. 3., 7., 10., 12., 28., 35., 42., 48., 56., 63., 72., 80., 86. posztoperatív napokon a test elülső 8 szelvényét amputáltuk és fixáltuk.

A vizsgálatokhoz ép ill. különböző mértékben regenerálódott agyú állatok feji végét fixáltuk. Az általános hisztológiai festési eljárások közül a hematein-eozin kettős festést, valamint a Nissl-féle festést használtuk. A fixáló elegyek: Nissl-festéshez 10%-os formalint, proktolin immuncitokémia festéshez GPA-, FMRFamid detektáláshoz Zamboni, NPY festéshez 4% PFA fixálót használtunk. Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz proktolin esetében 1 :500 - , FMRFamidnál 1: 1000 -, míg NPY esetében 1 :2000 hígítású primer szérumotkat használtunk. A beágyazott anyagból 7 J.1m vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, melyet zselatinos tárgylemezre vettük fel.

Fénymikroszkópos immunhisztokémia során a használt antitestek specifikusát gerinctelen állatokban már megvizsgálták. Negatív kontrollként a primér anti szérumot elhagytuk. A festési procedurát követően jelölt sejteket nem tudtunk megfigyelni.

Kvantitatív fénymikroszkópia során a Nissl-festést követően a neuronok számát computeres képanalizáló program segítségével végeztük el. Mivel a metszestvastagság nagyobb volt, mint a magvacska átmérője (1,7 Z 0,2 11m), így ugyanaz a magvacska nagy valószínűséggel csak egy metszeten volt látható. A statisztikai kiértékeléseknél számtani átlagot, a szórás (z) standard hibáját vettük figyelembe. Aszövegszerkesztési műveleteket, a grafikák és képek feldolgozását az ingyenes Linux operációs rendszer részét képező programokkal végeztem el.

A földigiliszták központi idegrendszere

Az *Eisenia fetidánál*, az idegrendszer már a testüregben található és a centralizáció minden formája megfigyelhető. Ez jelenti egyrészt a páros dúcláncoknak (has dúc) a test középvonalában történt összeolvadását, valamint a test elülső részében levő agydúc, ill. a garatalatti dúc-komplexum kialakulását.

A központi idegrendszere két részből, a garatideggyűrüből, és a hasdúcláncból áll. A garatideggyűrű a garat feletti agydúcra a garatalatti dúcra, valamint ezeket a garat két oldalán összekötő garatkonnektívumokra tagolható. Az agydúc nagyrészt tagolatlan, makroszkóposan agyszakaszokat nem lehet rajta elkülöníteni.

A cerebrális gangliont egy tok borít, mely hármass rétegzettségű. Az agydúcban elhelyezkedő neuronok a tok alatt több csoportba rendeződve találhatóak. A 60-as évek közepéig összegyűlt ismereteket a saját megfigyeléseinkkel összehasonlítottuk s a neuronok lokalizációja és immunreaktivitása alapján újra osztályoztuk és csoportosítottuk, valamint az eltéréseket leírtuk. A neuronok alatt van a neuropil, mely közel centrális helyzetű, finom varikózus rostokat is tartalmaz. A rostok az agyban kommisszúrát formálnak, mely részben a két agyfél között létesít kapcsolatot, ill. olyan rostok haladnak benne, amelyek az agyfeleket a garatalatti dúccal kapcsolják össze.

Eredmények

Ép állatokon végzett vizsgálatok eredményei:

Regenerációs vizsgálatainkat megelőzően ép *Eisenia* különböző ganglionjainak (agy-, garatalatti-, has-, szex-, terminális dúc) neuronjait számoltunk meg. Ezekre a vizsgálatokra azért volt szükség, hogy nyomon tudjuk követni az újraképződő ganglionban a sejtszám változását,

továbbá a regeneráció befejeződésével össze tudjuk hasonlítani az ép ill. regenerált ganglion neuronszámát.

Az agydúcban a teljes neuronszám 1021, a garatalatti dúc neuronjainak száma 1675. A szexganglionban 875, a terminális ganglion előttiben 663, míg a terminális ganglionban 625 neuront számoltunk. A hemiganglionok között jelentős eltérést egyik esetben sem találtunk.

Eisellia fetida agydúcának proktolin-IR neuronjai 5 csoportban jelentek meg: dorzo-mediális, dorzo-laterális, laterális, posztero-laterális és ventro mediális. Ezen IR neuronok összejejszáma 170 (2x85). A dorzo-mediális és a dorzo-laterális neuronpopuláció tartalmazza a legtöbb sejtet (30-30), méretük is a legnagyobb. Az agyi FMRFamid-IR neuronoknak 5-, dorzo-mediális-, dorzolaterális-, laterális-, posztero-laterális- és ventro-mediális csoportját figyeltük meg. Itt is a dorzomediális és a dorzo-laterálisok tartalmazzák a legtöbb sejtet (30-30). Az NPY idegelemek esetében hat neuroncsoportot találtunk az első 5 megegyezik az előbb említettekkel míg a 6. egy centrális elhelyezkedésű csoport.

Regenerált állatokon végzett vizsgálatok eredményei:

Az agydúc teljes regenerációját az adott időpontok alatt bekövetkező változások alapján hat fő szakaszra tudtuk osztani.

- 1./ a felszíni epithél záródása (0-24 óra);
- 2./ a hegyszövet megjelenése (1. -2. nap);
- 3./ IR rostok majd neuronok megjelenése (2. -3. naptól kb. a 24. napig);
- 4./ a preganglion körül a tok formálódásának kezdete (24. -27. nap);
- 5./ IR neuronok vándorlása a preganglionon belül (28.-(50)56. napig);
- 6./ az új agy, a teljes IR neuronszámmal és csoporttal (50-56.naptól- 80-86. napig).

A regenerálódó agydúcban mindhárom peptid esetében az összneuronszám az első (35-45. posztoperatív nap) gyors növekedés után mérsékelten, de tovább nő, majd a 80. napra a normáihoz közeli érték fog kialakulni.

Az új agydúc kialakulásában részt vevő neuronok négy fő területről eredhetnek:

- 1./ Az intakt ganglionokban (garatalatti dúc, hasi dúcok) a kötőszöveti tok alatt elhelyezkedő neoblasztok az agyírtást követően vándorolnak az újonnan formálódó agydúcba. A mozgás iránya feltehetőleg a garatkonnektívumokon keresztül vezet a preganglionba;
- 2./ a peptiderg neuronok a garatfonadékból (garatfalból) is származhatnak. NPY és FMRFamid esetében a regeneráció 3., proktolinnál a regeneráció 7. napjától a garatfonadék sejtjeinek száma nő és megindul a vándorlásuk. Ezek a neuronok a dorzális fal felszíne felé mozdulnak el és hamarosan átlépnek a sarj szövetbe ill. a preganglionba;
- 3./ az intakt ganglionok (garatalatti-, hasdúc) külső felszínén elhelyezkedő neoblasztokból eredhetnek az új neuronok, melyek feltehetőleg a konnektívum külső felszínén ill. a testüregben vándorolnak az agydúcba;
- 4./ a testfali sejtekből is származhatnak az új idegsejtek melyek a testfal mentén mozognak az agyírtás helyére, hogy ott a sarjszövetképzésben vegyenek részt a többi ideérkező neuronnal együtt.

Összefoglalás

Az intakt állatok vizsgálata során kapott új eredmények:

- megállapítottuk a normál CNS neuronszámát valamint azt, hogy a legtöbb neuron a cerebrális ganglionban található és az idegrendszerben hátrafelé haladva ez a szám csökken;

- elkészítettük az intakt *Eisenia fetida* agydúcában az NPY -, proktolin- és FMRFamid-IR neuroncsoportok előfordulásának részletes térképeit.

A regenerációs vizsgálatok során kapott új eredmények:

- A központi idegrendszer regenerációjához 80-86 napra van szükség 10 oC-on;
- leírtuk a regenerált agydúcban a peptid tartalmú IR neuronok újrendeződését helyzetét, csoportjait;
- megállapítottuk a regeneráció hat szakaszát és a hozzájuk kapcsolt főbb eseményeket;
- megfigyeléseket tettünk az agyregeneráció során a neuronok vándorlási irányait tekintve;
- meghatároztuk a regenerálódó agyban az újonnan képződött idegsejtek feltételezhető eredetét.

Összefoglalásként megállapítható, hogy az általunk vizsgált peptideknek neuromodulátor és neurohormon szerepük is lehet a regenerációban, valamint az axonok útkeresését is befolyásolhatják. Az említett peptideken kívül természetesen más szignál molekulák (GABA, 5HT) is fontos szerepet játszanak az idegrendszeri regenerációban és ezt is figyelembe kell vennünk a jövőben végzett vizsgálatok során.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetem kifejezni mindazoknak akik segítsége nélkül e munka nem készülhetett volna el. Elsősorban témavezetőmnek Dr. Csoknya Mária egyetemi tanárnak, aki segítőkész szakmai észrevételeivel támogatta munkámat, továbbá Dr. Hámori József akadémikus, egyetemi tanárnak, és Dr. Gábor Róbert egyetemi tanárnak az Összehasonlító Neurobiológiai Doktori Program vezetőinek, akik tanácsaikkal is segítettek.

Köszönöm Dr. Elekes Károlynak, a MT A BLKI tudományos igazgatóhelyettesének, c. egyetemi tanárnak, hogy intézetében lehetővé tette azt, hogy módszertani ismereteket szerezhettem.

Feleségemnek, a dolgozatban szereplő ábrák elkészítéséért valamint nélkülözhetetlen tanácsaiért. Valamint Dr. Pintér Erikának a PTE AOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet docensének és Kiss Gábornak azért, hogy lehetővé tették a digitális fotók elkészítését.

És nem utolsósorban szüleimnek akik mindvégig mellettem álltak és szeretetükkel is támogattak.

Publikációk

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

Bánvölgyi, T., Barna, J., Csoknya, M., Lengvári, I., Hámori, I. (1994): The number of ganglion cells in the intact and regenerated nervous system in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). Acta Biol. Hung., 45: 179-187.

Bánvölgyi, T., Barna, J., Csoknya, M. (2000): Reorganization of the peptidergic system during brain regeneration in *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). Acta Biol. Hung., 51: 409-416.

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia szereplések

Bánvölgyi, T., Barna, I., Scheitler, A., Lengvári, I. (1992): Quantitative analysis of nervous elements of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. 20th Congr. Hung. Biol. Soc., Kecskemét. (abstract).

Bánvölgyi, T., Barna, J., Csoknya, M., Lengvári, I., Hámori, I. (1994): Quantitative analysis of the intact and regenerated nervous system of the earthworm. 21st Congr. Hung. Biol. Soc., Pécs.

(abstract).

- Csoknya, M., Telkes, I., **Bánvölgyi, T.**, Barna, J., Elekes, K., Hámori, J. (1996): Regeneration of the central nervous system in Oligochaetes. 3. proktolin-immunoreactive elements. *Neurobiol.*, 4: 299.
- Bánvölgyi, T.** (1997): The GABAergic system in earthworm: normal structure and role of GABA in brain regeneration. Salzburg. ÖGN-Newsletter, 2, 5.
- Bánvölgyi, T.**, Barna, J., Telkes, I., Csoknya, M., Elekes, K., Hámori, J. (1997): Effect of GABA treatment on the regeneration of the brain of *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). 25th Göttingen Neurobiol. Conf., (poster, abstract 951).
- Csoknya, M., Barna, J., **Bánvölgyi, T.**, Kiss, E., Telkes, I., Hámori, J., Elekes, K. (1997): The chemical and neuroanatomical characterisation of the brain regeneration in earthworms (*Eisenia fetida*). *Neurobiol.*, 4th Conf. Hung. Neurosci. Sac. Gödöllő (poster, abstract).
- Telkes, I., Csoknya, M., Barna, J., **Bánvölgyi, T.**, Hámori, J., Elekes, K. (1997): Description of the stages of brain regeneration in earthworms (*Eisenia fetida*). *Sac. Neurosci.*, 27th Ann. Meet. New Orleans, (674.3 poster, abstract).
- Barna, J., **Bánvölgyi, T.**, Csoknya, M., Hámori, J., Elekes, K. (1998): Peptidergic nervous elements in the enteric nervous system of the earthworm. *Neurobiol.*, 6: 167.
- Bánvölgyi, T.**, Barna, J., Csoknya, M., Hámori, J., Elekes, K. (1998): Regeneration of FMRFamide immunoreactive and proktolin-immunoreactive neurons in the brain of *Eisenia fetida*. *Neurobiol.*, 6: 165.
- Bánvölgyi, T.**, Barna, J., Csoknya, M., Hámori, J., Elekes, K. (1998): Peptidergic and aminergic neurons in the regenerating brain of the *Eisenia* (Oligochaeta). *Forum Europ. Neurosci.*, Berlin (poster, abstract 25.55).
- Csoknya, M., **Bánvölgyi, T.**, Elekes, K. (1999): Reorganization of the GABAergic system during brain regeneration in *Eiseniafetida* (Oligochaeta, Annelida). *Neurobiol.*, 7: 294.

Egyéb publikációk

- Csoknya, M., Barna, J., **Bánvölgyi, T.**, Hiripi, L., Eckert, M., Hámori, J., Elekes, K. (1998): Octopamine-containing neurons in the alimentary tract of the earthworm (*Eisenia fetida*). *Brain Res.*, 778: 414-417.
- Vígh, J., **Bánvölgyi, T.**, Wilhelm, M. (2000): Amacrine cells of the Anuran Retina: Morphology, Chemical Neuroanatomy, and Physiology. *Micr. Res. Tech.*, 50: 256-260.
- Rábl, K., Reglődi, D., **Bánvölgyi, T.**, Somogyvári-Vígh, A., Lengvári, I., Gábrriel, R., Arimura, A., (2002): The neuroprotective effect of PACAP on horizontal cells in the turtle retina. *Reg. Pept.* 102: 64.
- Rábl, K., **Bánvölgyi, T.**, Gábrriel, R. (2002): Electrophysiological evidence for push-pull interactions in the inner retina ofturtle. *Acta Biol. Hung.* 53: 141 - 151.