

## A téma címe... **A DOPAMIN ÉS A SZEROTONIN LEHETSÉGES SZABÁLYOZÓ SZEREPE A CSIGÁK TÁPLÁLKOZÁSÁBAN**

A kutatás időtartama: **2002-2005**

A kapott eredmények részletes leírása:

### **A dopamin és szerotonin szintek HPLC mérése a táplálkozási viselkedés különböző szakaszai alatt**

A kísérletek során megmértük a dopamin (DA) és szerotonin (5HT) szinteket a központi idegrendszer különböző területein: a buccális ganglionokban ahol a táplálkozási mintázatgenerátor és a táplálkozási izmok motoneuronjai helyezkednek el, a cerebrális ganglionokban ahol az asszociatív funkciók központosulnak, és a subesophagealis ganglion komplexben ahol a mozgás motorikája (pedális ganglionok) és a légzés - keringés szabályozó központjai (viscerális és parietális ganglionok) találhatóak. Továbbá megmértük a DA és 5HT szinteket a szívben valamint a táplálkozási izmokban, mint a buccalis izomzat és az előbél izomzata.

A méréseket a táplálkozási viselkedés, mesterségesen elkülönített következő szakaszai alatt végeztük:

- 1. Inaktív**-az uborkaszeletekkel jól lakott állatokat (*Helix pomatia*) 7-14 napig éhezettük mikor az állatok inaktiválódnak és teljesen visszahúzódtak a házukba.
- 2. aktívált**-az inaktív állatokat paradus környezetben aktiváljuk mikor az éhezett állatok spontán táplálékkereső mozgásokat mutatnak.
- 3. fiktív feeding**- az aktív állatokat hálóval letakart uborka szeletek fölé helyezve az állatok megtalálják a táplálékot, ami rövid ideig tartó (0,5-2 min) fiktív táplálkozási mozgásokat vált ki.
- 4. táplálkozási válasz**-mikor a táplálék bekerül a szájüregbe és a nyelőcsőbe (az első néhány harapás alatti időszak).
- 5. kezdeti evés**-szabadon lévő táplálék fölé helyezve az állatokat, az állatok táplálkozási testtartást vesznek fel és folyamatosan táplálkoznak (20-30 min).
- 6. kései evés**-az állatokat 60-90 percig hagyjuk táplálkozni mikor az állatok már közel vannak a jóllakottsághoz.
- 7. jóllakott**-10-20 perccel a táplálék felvétel befejezése után.

A táplálkozási viselkedés alatt a megjelenő ingerek hatásának helye szerint a szakaszokat csoportosíthatjuk. Az egyes szakaszban nem hatnak sem külső, sem belső lényeges ingerek. A 2-es és 3-as szakaszokban csak külső ingerek hatnak, mint a páratartalom és a táplálék szag és mechanikai ingerei. Míg a 4-es és 5-ös és 6-os szakaszokban mind a külső mind a belső táplálék ingerek befolyásolják az állatot. A 7-es szakaszban már csak belső táplálék ingerek befolyásolják az állatot.

A HPLC mérések azt mutatják, hogy az inaktiválódott állatok CNS-ében a DA és 5HT közel azonos mennyiségben vannak jelen. Az alkalmazott külső inger (2 szakasz) mint a páratartalom (hygroreceptor stimulálás) aktiválja az állatokat. Ezzel párhuzamosan csökkentik a CNS monoamin szintjeit, elsősorban az 5HT szintet. A külső táplálék ingerek (szaginger) (3. szakasz) kiváltják a táplálkozási mozgásokat és ezzel párhuzamosan tovább csökkentik az 5HT szintet, így DA túlsúlyt eredményeznek a CNS különböző területein. Ezzel szemben a külső táplálék ingerek mellett megjelenő belső táplálékingererek először a DA

szintet emelik meg a buccális és cerebrális ganglionokban (4. szakasz), majd folyamatosan emelik mind a DA mind az 5HT szinteket a táplálékfelvétel alatt minden vizsgált CNS területen. A jóllakottságkor, mikor csak a belső táplálékingerek hatnak (a táplálék mennyisége és annak különböző mértékben történt emésztett állapota) és valószínűleg egy új típusú belső inger jelenik meg az emésztési folyamatok miatt, a DA szint a kontrol értékre esik, míg az 5HT szint a kontrol érték alá süllyed minden vizsgált CNS területen.

### ***Azonosított 5HTerg modulátor neuronok aktivitásának változása a táplálkozás különböző szakaszai alatt***

Mivel a táplálkozási viselkedés kivitelezéséhez megemelt vegetatív arousalra (increased heart rate) is szükség van, ezért a HPLC mérésekkel párhuzamosan megvizsgáltuk a táplálkozási modulátor szerotonerg neuron (MGC) aktivitását és a szívserkentő szerotonerg modulátor neuronok aktivitását is a táplálkozás különböző fázisai alatt.

Az intracelluláris elvezetések azt mutatják, hogy a szívserkentő szerotonerg neuronok már az aktivitáskor növelik tüzelési frekvenciájukat, amit nem csak a táplálékfelvétel alatt, de jóllakottság alatt is megtartanak.

A táplálkozási modulátor neuron az MGC tüzelési frekvenciája aktiválódáskor megnő és tovább növekszik a táplálékfelvétel alatt, de jelentősen lecsökken a jóllakottság elérésekor. A meg növekedett tüzelési frekvenciával párhuzamosan az MGC nyugalmi potenciálja csökken. Az eredmények szerint mind a külső és a belső táplálék stimulusok egyaránt növelik a szerotonerg rendszer aktivitását. Míg a jóllakottság negatív visszacsatolással jelentősen csökkenti a táplálkozásban szerepet játszó MGC aktivitását addig a szív szabályozó neuronok aktivitását és különösen a szív 5HT tartalmát növeli.

Mivel a HPLC mérések azt mutatták, hogy a táplálkozás alatt megnő mind az 5HT mind a DA szintje ezért megvizsgáltuk a külsőleg adott 5HT és DA hatását a szerotonerg táplálkozási modulátor neuron az MGC aktivitására izolált CNS preparátumokon. Az eredmények azt mutatják, hogy a külsőleg alkalmazott 5HT ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M) növeli a sejt tüzelési frekvenciáját és szabálytalan tónusos tüzelésből szabályos tónusos tüzelővé alakítja át. A DA ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M) csökkenti a tüzelési frekvenciát a neuron tüzelési aktivitásának függvényében. Magas frekvencia mellett (táplálkozó állat MGC-je, vagy  $10^{-4}$  M 5HT jelenlétében) a DA ( $10^{-4}$  M) gyakran burstlővé alakítja a szabályos tónusos tüzelési mintázatot. Ezek az eredmények azt feltételezik, hogy in vivo, a táplálkozási mozgások generálása alatt az MGC burst típusú ritmikus tüzelésbe megy át.

### ***Elektrotónusos kapcsolatok a szerotonerg rendszerben***

Tavasszal és nyáron a táplálkozás kiváltotta jelentős szerotonin szint emelkedés valószínűleg nem egyetlen neuron, az MGC, megnövekedett aktivitásából származik, hanem az egész szerotonerg rendszer megnövekedett aktivitásából. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a szerotonerg rendszer minden eleme ugyanazon inputra aktiválódik, vagy egyetlen aktiválódott szerotonerg neuron vagy csoport aktiválni képes az egész szerotonerg rendszert, ha elektrotónusosan kapcsolatos. Ezért megvizsgáltuk, hogy a cerebrális szerotonerg neuronok, melyek topográfias elrendeződésben helyezkednek el, vajon elektrotónusosan kapcsolatosak. Az eredmények azt mutatják, hogy a csoport bizonyos területein egyes neuronok egymással elektrotónusosan kapcsolatosak, beleértve az MGC-t is. Így, nem zárható ki, hogy az 5HTerg neuronok képesek egymás aktivitását kölcsönösen növelni az elektrotónusos kapcsolataikon keresztül is.

A Helixen kapott eredményekből kézirat készült a Behavioral Brain Research számára: **Hernádi L., Hiripi L., Győri J., Vehovszky A.** The elicited arousals during food ingestion are associated with the increased activity of the serotonergic system as well as with changes in Dopamine and Serotonin levels in the snail, *Helix pomatia*. A biochemical, physiological and neuroanatomical study.

A Lymnaeaban a HPLC és az elektrofiziológiai mérések hasonló eredményeket mutattak. Az eredmények egy részét már publikáltuk (Hernádi et al. 2004, Acta Biol. Hung.)

#### ***Az éheztetés hatása a CNS monoamin szintjére és az óriás cerebrális serotonerg neuron (CGC) aktivitására Lymnaeaban***

A Lymnaea nem képes inaktíválni magát az éheztetés hatására csak csökkenteni az aktivitását, mivel csak a vízfelszínen tud levegőt venni. Így, megvizsgálhatjuk, hogy a folyamatos éheztetés (1-5 nap) hogyan hat a monoaminszintekre és az ismert táplálkozási modulátor neuron a CGC aktivitására.

A HPLC mérések azt mutatják, hogy az éheztetés folyamatosan csökkenti az 5HT szintet, de nem a DA szintet, így egy jelentős DA túlsúly alakul ki a CNS-ben. Egy napos éheztetés után ami a természetben megfelelne a spontán táplálékfelvétel idejének az állatok aktívak és táplálék keresési mozgásokat végeznek. Ekkor a CGC tüzelési frekvenciája a jóllakott állapothoz képest jelentősen megemelkedik és a nyugalmi membránpotenciálja csökken. Az ötödik napra a neuron tüzelési frekvenciája a jóllakott állapothoz képest csökken, és jelentősen megnő a neuron nyugalmi potenciálja. Az eredmények azt feltételezik, hogy a hosszantartó táplálékmegevonás lecsökkenti a CNS 5HT szintjét és valószínűleg nem csak a CGC, de a 5HTerg rendszer aktivitását is. Továbbá azt is feltételezhetjük, hogy a felszabadult 5HT mennyisége befolyásolja a szövetek anyagcseréjét is.

A megfigyelésekből a következő kézirat készült:

**Hernádi L., Hiripi L., Győri J., Vehovszky A., Djakonova V.-** The effect of starving and feeding on the monoamine levels and on the activity of the serotonergic feeding modulator neuron (CGC) in the snail *Lymnaea stagnalis*. A physiological, biochemical and neuroanatomical study.

#### ***A táplálkozásban nem releváns de az állat számára fontos külső stimulus hatásának részletes vizsgálata***

Az inaktívált állatok aktiválásakor a kulcsszerepet a hygroszeptor stimulálásakor bekövetkező megnövekedett keringés valamint a hosszanti vázizomzat megnyúlása játssza, aminek segítségével a haemolypha a cerebro-pedalis haemocoelbe préselődik, így az állat kipréselődik a házából és mozgásképesé válik (megjelent kézirat: Hernádi et al. 2006 Cell and Tissue Res.). Mivel ez a kulcsinger, a páratartalom által történt hygroszeptor stimulálás, jelentős központi DA és 5HT csökkenést idézett elő, ezért megvizsgáltuk az ismételt hygroszeptor stimulálás hatását is, vajon az idő az ismételt stimulálással együtt emelheti a CNS 5HT és DA szintjét. Magas páratartalom által aktivált állatokat száraz körülmények alatt inaktíváltuk, majd újra aktiváltuk A HPLC mérések azt mutatják, hogy sem az inaktíválás sem az ismételt külső ingerlés nem növeli a monoamin szinteket a CNS különböző területein annak ellenére, hogy a kísérletek alatt több óra telt el. Ellenkezőleg, az 5HT szint tovább csökkent az ismételt stimulálásakor. A CNS ben megfigyeltekkel ellentétben mind az egyszeri mind az ismételt hygroszeptor stimulálás megnövelte mind a szerotonin mind a DA szinteket

a talpban és a szívben, ami azt feltételezi, hogy a monoaminerg rendszer aktiválódik a külső kulcsinger hatására. Ennek eldöntésére a HPLC mérésekkel párhuzamosan megvizsgáltuk az aktivitását a parietális szívserkentő szerotonerg neuronoknak valamint a táplálkozási mintázatgenerátor szerotonerg modulátor neuronjának (MGC). Az intracelluláris elvezetések azt mutatják, hogy a szívserkentő szerotonerg neuronok tüzelési frekvenciája mind az aktiváláskor, mind a reaktiváláskor megemelkedik, de lecsökken az inaktiváláskor. Ezzel szemben az MGC, ami elsősorban a táplálkozásban játszik szerepet, növeli tüzelési frekvenciáját az aktiválásra ami megmarad az inaktiválás és a reaktiválás alatt is. Továbbá az MGC nyugalmi potenciálja fokozatosan csökken és a reaktiválásra a csökkenés szignifikánsá válik.

Az eredmények azt feltételezik, hogy a külső kulcsinger nem csak néhány 5HTerg neuron, de az egész 5HTerg rendszer aktivitását növeli és növeli a 5HT felszabadítását is (valószínűleg a DAerg rendszerét is) de nem képesek többszöri ismétlésre sem növelni a CNS 5HT és DA szintjét, hanem a CNS monoamin tartalmának terhére szabadítanak fel 5HT-t és DA-t a perifériás szervekben mint a talp és a szív.

Az eredményekből kézirat készült a J. Experimental Biology számára

**Hernádi L., Vehovszky A., Győri J., Hiripi L.** The elicited activation of aestivated snails increases the activity of the monoaminergic system but decreases both 5HT and DA levels in the CNS and increases them in the peripheral organs of *Helix pomatia*. A biochemical, physiological and neuroanatomical study.

#### ***A táplálkozási motiváltság kialakulása***

Az etetési kísérleteket két nappal a jóllakottság után is elvégeztük. Ekkor az állatok már megemésztették a felvett táplálékot és nedves körülmények között néhány perc alatt aktiválódtak. A táplálék jelenléte már képes volt rövid ideig tartó táplálkozást kiváltani. Ebben az esetben a monoaminszintek változásai ellentétesek az éheztetett állatokban megfigyeltekkel. A kontrol aktív állatok CNS-ében (2. szakasz) 5HT dominancia figyelhető meg, ellentétben a hosszan éheztetett állatokkal ahol DA dominancia figyelhető meg. A kezdeti evés alatt (5. szakasz) a külső és belső táplálék ingerek mind a DA mind az 5HT szinteket csökkentették, de növelték a táplálkozásban résztvevő izmokban és a szívben. A jóllakottság elérésére (6.-7. szakaszok) a DA és 5HT szintek vagy a kontrol szintre, vagy az fölé emelkedtek a CNS különböző területein.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az éhség ill. a táplálkozási motiváltság kialakulását a DA és 5HT szintek kölcsönös viszonya is tükrözheti. Éheztetett aktív állat CNS-ében DA túlsúly van, míg nem éhes állatban 5HT túlsúly figyelhető meg. Így feltételezhetjük, hogy az éheztetés alatt (a táplálkozási motiváltság növekedése alatt) az 5HT túlsúly lassan DA túlsúlyba alakul át.

Az eredmények publikálásához még kiegészítő vizsgálatok szükségesek. Mivel kapacitás hiánya miatt még nem fejezhattük be a táplálkozási modulátor neuron az MGC aktivitásának tesztelését a táplálékfelvétel alatt rövid éheztetés után. Így nem tudjuk megmondani, hogy a hosszantartó éheztetéssel szemben, ebben az esetben a szerotonerg rendszer alacsony aktivitása vagy más faktorok állnak e az 5HT és DA szintek csökkenése mögött a táplálék felvétel alatt (a teszt folyamatban van).

#### ***A keringő glukóz lehetséges szerepe a táplálékfelvétel szabályozásában***

A megemésztett táplálék energiával látja el a szervezetet és a szervezet elsősorban glukózt használ az energia nyeléshez, így jóllakottság alatt a keringő glukóz mennyisége megnő. Ezért megvizsgáltuk, hogy a glukóz hogyan hat a táplálkozási mintázatgenerátor szerotonerg

modulátor neuronjának (MGC) aktivitására. Az intracelluláris elvezetések azt mutatják, hogy már  $10^{-6}$  M glukóz képes csökkenteni az MGC tüzelési frekvenciáját, ill. nagyobb koncentrációk leállítják a tüzelést, jelezve, hogy az MGC egy glukóz érzékeny neuron. Ha a különböző koncentrációjú glukózt 5HT-vel együtt adjuk, akkor az 5HT kivédi a glukóz gátló hatását. Ezek a megfigyelések feltételezik, hogy a táplálékfelvétel alatt megfigyelt 5HT szint növekedés képes ellensúlyozni a megjelenő glukóz gátló hatását egy bizonyos koncentrációig. Továbbá a megfigyelések feltételezik, hogy a keringő glukóz képes alacsony szinten tartani a táplálkozásban résztvevő MGC aktivitását és ennek következtében gátolni a táplálkozási mintázatgenerátor érzékenységét. Így nem zárhatjuk ki, hogy a táplálkozási motiváció kialakulásának egyik fontos eleme a keringésben jelenlévő glukóz koncentrációja ami csak egy adott idő intervallum után esik arra szintre ami már nem gátolja a szerotonerg rendszer aktivitását.

A *Helix pomatia nocturnalis* állat este vagy éjjel táplálkozik. A korábbi méréseink szerint az 5HT és DA szintek este vagy éjjel a legmagasabbak. Mivel a kísérleteket nappal végeztük, ezért ki kell egészítenünk a fenti megfigyeléseket azzal, hogy este vagy éjjel hogyan hat a glukóz az MGC aktivitására ill. milyen glukóz koncentrációk hatásosak.

#### ***A DA és az 5HT hatása az előbél spontán kontrakcióira éheztetett és nem éheztetett állatokon***

***Neuroanatómiai vizsgálatok:*** A neuroanatómiai vizsgálatok szerint az előbél különböző szakaszainak DA tartalma intrinsic DAerg elemekből (TH-immunfestett) származhat melyek túlnyomó többsége érző neuronnak bizonyult. Ezzel szemben az 5HT extrinsic 5HTerg rostokból (5HT-immunfestett) származhat melyek a cerebrális óriás 5HTerg neuronokból erednek és a buccalis ganglionokon át érik el az előbelet. Az 5HT és TH kettős immunfestés azt mutatta, hogy az 5HT immunfestett rostok az előbél teljes izomzatát behálózzák és kapcsolatot teremtenek a TH immunfestett érzősejtekkel és rostokkal is.

***A DA és 5HT koncentrációk változásai a táplálkozás alatt:*** A HPLC mérések azt mutatták, hogy a DA szintje csökkent míg az 5HT szintje lassan nőtt az előbélben (nyelőcsőben és a begyben) a táplálékfelvétel alatt. A jóllakottság elérésekor a DA szint alacsony maradt, míg az 5HT szintje a kontrol szintre csökkent.

***Az 5HT és DA hatása az izotóniás spontán kontrakciókra:*** Nem éheztetett *Helix*-ben mind a hosszanti mind a körkörös izomzat spontán kontrakciókat generál, míg 2-3 hetes éheztetés után az előbél spontán kontrakciója leáll mind a hosszanti mind a körkörös izomzatban. Az 5HT már  $10^{-9}$  M koncentrációban képes beindítani a spontán kontrakciót mind a hosszanti mind a körkörös izomzatban, míg a DA (sem alacsony sem magas koncentrációnál) nem képes beindítani a spontán kontrakciókat, csak az izom tónusát növeli. A hosszanti izmokban az 5HT koncentráció függően ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) növeli a spontán kontrakciók gyakoriságát és amplitúdóját, de nem befolyásolja az izmok feszültségi állapotát. Az 5HT  $10^{-4}$  M koncentrációtól növeli az izom tónusát és rövid ideig tartó gyors kontrakciókat idéz elő. DA az 5HT jelenlétében kis mértékben csökkenti a kontrakciók gyakoriságát és kis mértékben növeli a kontrakciók amplitúdóját.

A körkörös izomzatban az 5HT  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M között növeli a spontán kontrakciók gyakoriságát és amplitúdóját és lassan növeli az izmok relaxációját. A kontrakciók  $10^{-5}$  M koncentrációnál leállnak a nagymértékű tónus csökkenés miatt. A spontán kontrakciók az 5HT jelenlétében újra indulnak ha az izom feszülését növeljük. Esetenként a DA ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M) az 5HT jelenlétében képes újra indítani a spontán kontrakciókat a relaxált izomban.

A megfigyeléseink azt feltételezik, hogy a táplálkozás alatt a növekvő felszabadult 5HT szint növeli az előbél hosszanti és körkörös izomzatának spontán kontrakcióit, ugyanakkor jelentősen növeli a körkörös izomzat relaxációját is. A körkörös izomzatnak a felvett táplálék által előidézett feszülése és a felszabadult DA ellensúlyozza az 5HT által kiváltható nagyfokú relaxációt, így fenntarthatók a spontán kontrakciók a táplálkozás alatt.

Az eredményekből a következő kézirat készül:

**Hernádi L., Hiripi L.,** - The possible role of 5HT and DA in the foregut motility in the snail *Helix pomatia*. A biochemical, physiological and neuroanatomical study.

### ***A klíma és az évszak hatása a táplálkozás alatti monoaminszint változásokra***

A kísérletek zömét tavasszal és nyáron végeztük mikor az időjárás napos és száraz volt, és ekkor a fent leírt eredményeket kaptuk. Ha a táplálékfelvételt nyáron, esős napon végeztük a labor-körülmények alatt tartott állatokon, akkor a kapott eredmények csak részben hasonlítottak a száraz, napos időben kapott eredményekhez. A páratartalom az állatok számára kulcs inger és mind a mesterséges mind a természetes páratartalom növekedése aktiválja az állatokat. A kontrol aktív állatokban 5HT dominancia figyelhető meg ellentétben a száraz napos időben kapott eredményekkel. Táplálékfelvétel alatt mindkét esetben nő a DA és 5HT szint, de az eső esetén a jóllakottság elérésekor a szintek nem csökkennek a kontrol szintjére és nem alakul ki a DA túlsúly az idegrendszerben. Továbbá, esős időben az állatok a jóllakottság elérése után mozognak, ellentétben a száraz időben megfigyelttel mikor órákra mozdulatlaná válnak. Az eredmények azt mutatják, hogy az időjárási front által létrehozott magas páratartalom, ellentétben a száraz időben mesterségesen létrehozott magas páratartalommal, emeli a monoamin szinteket különösen az 5HT szintet mind a CNS-ben mind a periférikus szervekben, ami arra utal, hogy az időjárás változások alatt a páratartalomon kívül olyan még ismeretlen faktor vagy faktorok jelennek meg amelyek hatásosan befolyásolják a monoaminerg rendszereket. Ezek a faktorok képesek megemelni a monoaminok, különösen az 5HT szintézisét.

A különböző évszakokban végzett HPLC mérések szerint az ősszel kapott eredmények ellenkező tendenciákat mutattak a tavasszal és nyáron kapott eredményekkel. Míg tavasszal és nyáron a CNS 5HT és DA szintjei növekednek a táplálék felvétel alatt és lecsökkennek a jóllakottság elérésekor, ősszel a táplálékfelvétel a központi monoaminszinteknek, különösen az 5HT szintnek a csökkenését idézi elő, míg a jóllakottság eléréskor a monoaminszintek megemelkednek a CNSben. A kapott eredmények nagyon hasonlítanak a rövid éheztes után végzett kísérletek eredményeihez. Míg a rövid éheztes után a táplálékfelvétel enyhe 5HT túlsúlyban zajlik a CNS-ben, addig ősszel a táplálékfelvétel DA túlsúlyban megy végbe.

Ezért ha kísérletet tervezünk, a klimatikus és évszaki feltételeket is figyelembe kell vennünk, mert a külső feltételek nagyobb változásokat képesek előidézni mint maga a vizsgálni kívánt folyamat.

### **A táplálkozás lehetséges neuroanatómiai háttere, különös tekintettel a monoamin-tartalmú neuronokra**

#### ***A tápcsatorna különböző érző területeinek központi vetülése***

Mivel a HPLC mérések azt mutatták, hogy a CNS DA és 5HT szintjeit az éppen aktuális külső vagy belső ingerek befolyásolják mind *Helix*-ben mind *Lymnaea*-ban, ezért megvizsgáltuk, hogy a szájkörüli területek valamint az előbél különböző területeinek érző sejtjei a CNS milyen területeire vetülnek mind *Helix*-ben és *Lymnaea*-ban. A különböző idegeken keresztül történt retrograd neurobiotin jelölések azt mutatják, hogy a szájkörüli területek érző sejtjei kizárólag a cerebrális ganglionokba vetülnek mely ganglionok az idegrendszer asszociatív központját képviselik. Az előbél kezdeti szakaszában, a szájüregben lévő érző neuronok részben a cerebrális részben a buccális ganglionokba vetülnek, míg a pofa és a garat valamint a nyelöcső és a begy érző neuronjai kizárólag a buccális ganglionokba vetülnek mely ganglionok a táplálkozási mintázat-generátort tartalmazzák, így a táplálkozási mozgásgenerálás központját képviselik.

A hygroreceptor stimulálással előidézett aktiválás során a páratartalom az állatok pneumosztómáját és a láb (farok) caudális részét éri. Ezért megvizsgáltuk, hogy ezen területeken előfordulnak e receptor sejtek a kültakaróban. A területekhez nyúlványt küldő idegeken keresztül számos primer érző neuron jelölhető neurobiotinnal ami azt mutatja, hogy az itt lévő érző neuronok a pedális és a visceroparietális ganglionokba vetülnek, ahol a vizsgált szívserkentő szerotonerg neuronok találhatóak.

Immuncitokémiai módszerrel megállapítottuk, hogy minden egyes érző területen az érző neuronok egy része tyrosin-hydroxylase pozitivitást mutat, ami azt feltételezi, hogy a szenzoros afferensek egy része dopaminerg. Szerotonin immunfestett érző neuronokat egyetlen vizsgált érző területen sem találtunk

#### *Cerebro-buccális és bucco-cerebrális interneuronok*

Mivel a tápcsatorna érző területei mind a cerebrális mind a pedális ganglionokba vetülnek, megvizsgáltuk, hogy milyen neuronokon keresztül kapcsolódnak össze az asszociatív (cerebrális) és a motoros (buccalis) ganglionok. A retrograd neurobiotin jelölések azt mutatják, hogy a cerebrális ganglionokban négy kis csoportba szerveződnek azok a neuronok melyek nyúlványt küldenek a buccális ganglionokba, míg a buccális ganglionokban egyetlen területre korlátozódnak a cerebrális ganglionba nyúlványt küldő neuronok.

A retrograde neurobiotin jelölést immuncitokémiával kombinálva megállapítottuk, hogy *Helix* esetében a cerebro-buccális neuron közül egyetlen szerotonerg neuron az MGC küld nyúlványt a buccális ganglionokba és az általuk beidegzett táplálkozási izmokba. Továbbá egyetlen tyrosin-hydroxylase tartalmu neuron küld nyúlványt a buccális ganglionba. A buccális ganglionban a bucco-cerebrális neuronok közül 1-2 tyrosin-hydroxylase pozitív neuron küld nyúlványt a cerebrális ganglionba. Szerotonin immuno-pozitív neuront nem találtunk a buccális ganglionokban.

A *Lymnaea* esetében az egyetlen különbség az, hogy a cerebrális ganglionokból nem egyetlen neuron, hanem egy jól szeparált kis tyrosin-hydroxyláz festett sejtcsoport küld nyúlványt a buccális ganglionokba.

Az eredmények azt mutatják, hogy a ritmikus táplálkozási mozgások generálásában résztvevő buccális ganglionok és a táplálkozásban részvevő izomzat egyetlen neuronból a páros óriás cerebrális szerotonerg neuronokból kapnak szerotonerg rostokat, míg a valószínűleg dopaminerg tyrosin-hydroxyláz pozitív cerebro-buccális és bucco-cerebrális interneuronok kölcsönösen összekapcsolják a két ganglionrendszert.

#### ***A CNS szerotonerg és a dopaminerg rendszerének lehetséges neuroanatómiai kapcsolatai***

Szerotonin és tyrosin-hydroxylaz kettős immunfestést alkalmazva megvizsgáltuk a két rendszer anatómiai viszonyát Helix-ben és Lymnaea-ban. Az eredmények azt mutatják, hogy minden egyes tyrosine-hydroxylaz pozitív neuron kaphat szerotonerg bemenetet mind a szómáján mind a nyúlványaikon keresztül. A szerotonin festett neuronok nem fogadnak TH-ir rostokat a szómájukon, de a neuropilben a 5HT-ir rostok beékelődnek a kompakt és koherens TH-ir rostkötegekbe, így két festett rostrendszer kapcsolatot létesíthet egymással. Annak eldöntésére, hogy ezek a lehetséges kapcsolatok szinaptikusak vagy nem szinaptikusak, elektron mikroszkópos vizsgálatok szükségesek.

Ezek az eredmények azt feltételezik, hogy a megemelkedett arousal alatt mikor a 5HTerg rendszer növeli az aktivitását, a 5HTerg rendszer befolyásolja a dopaminerg rendszert. Mivel a DAerg neuronokat a kis méretük miatt nem sikerült intracellulárisan jellemezni és megvizsgálni az 5HT koncentráció függő hatását, így nem tudjuk, hogy az 5HT hogyan hat a DAerg rendszer aktivitására. A HPLC mérések szerint a táplálékfelvétel alatt mind a DA mind az 5HT szint emelkedik, ekkor valószínűleg az 5HT serkenti a DAerg rendszert, de nem zárhatjuk ki, hogy a megemelkedett 5HT szint később gátolja a DAerg neuronok aktivitását.

A konfokális mikroszkópos analízis azt mutatja, hogy az intracellulárisan neurobiotin jelölt MGC is számos 5HT immunfestett rostot fogad mind a szómáján mind a nyúlványain keresztül. Ezek a megfigyelések és az, hogy az MGC elektrotónusos kapcsolatot is létesít más 5HTerg neuronokkal feltételezik, hogy az MGC aktivitása képes kifejezni az aktuális arousal szintjét.

#### ***A DA és 5HT szintézisének lehetséges helye egy neuronon belül***

A monoaminok szintézise elvileg a monoaminerg neuronok bármely részében történhet, így a disztális perifériás szegmensekben is. Mivel a monoaminok szintézisének két utolsó lépése a hydroxylálás és dekarboxilálás. A DA esetében a tyrosin hydroxylase (TH) és az aromás aminósav dekarboxylase vagy DOPA dekarboxylase (DC) enzimek végzik a két folyamatot, míg az 5HT esetében a tryptophan hydroxylase és az aromás aminósav dekarboxylase enzimek végzik a két folyamatot. A DA szintézis esetében immuncitokémiai segítségével megvizsgáltuk a tyrosine-hydroxylase és a DOPA decarboxylase enzimek jelenlétét ill eloszlását a neuronok különböző részeiben. Az immuncitokémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy pozitív festődés esetén a neuronok szómájában és dendritjében mindig van TH és DC immunreaktivitás, míg a disztális axonszegmensekben nagyon erősen változik.

Az eredmények azt mutatják, hogy ha erős immunfestést kapunk a tyrosine hydroxylase enzimre, akkor csak gyenge (vagy nincs) immunfestés figyelhető meg a TH immunjelölt sejtekben, míg erős DC festés esetén csak gyenge (vagy nincs) TH immunfestést kapunk. A DC immunfestés és az 5HT immunfestés kombinálása azt mutatja, hogy minden egyes 5HT immunfestett sejtekben pozitív DC immunfestés figyelhető meg, így az antitest az 5HTerg sejtekben lévő 5HTP decarboxylase enzimet is jelöli, vagy mind a DAerg mind az 5HTerg sejtekben ugyanaz a decarboxylase enzim működik. Az eredmények azt mutatják, hogy bizonyos esetekben DA vagy 5HT szintézis a disztális axonszegmensekben is folyik, míg más esetben csak a CNS-ben történik. Jelenleg még nem tudjuk, hogy milyen fiziológiás állapot határozza meg azt, hogy a fenti két lehetőség közül melyik valósul meg. Összel, mikor az állatok hibernációba mennek át, mind a TH mind a DC immunreaktivitás eltűnik a disztális axonszegmensekből.

#### ***Neurotoxinok hatása a táplálkozásra***



Korábban már leírtuk, hogy az 5,6- ill. 5,7-dyhydrxytryptamin időlegesen specifikusan károsítja a 5HTerg rendszert ami a táplálkozás szintjén is megjelenik. A HPLC vizsgálatok szerint a regenerációs szakasz után az állatok bár képesek táplálkozni, de a központi DA és 5HT szint függetlenül az évszaktól mindig csökken a táplálékfelvétel alatt. A táplálékfelvétel mindig DA túlsúlyban zajlik.

A jelen vizsgálatok célja az volt, hogy olyan neurotoxint használjunk ami specifikusan a DAerg rendszert károsítja vagy reversibilisen vagy irreversibilen. A gerincesek esetében a 6OH-dopamin használható a DAerg rendszer károsítására és ezért a Parkinson tünetek létrehozására is alkalmas. Csigákban azt találtuk, hogy ez az ágens a szerotonerg rendszert is jelentősen károsítja, ezért nem használható a DAerg rendszer aktivitásának kiiktatására. Jelenleg Lymnaea-an egy új ágens, a rotenont teszteltük, ami egy közönséges peszticid. Az állatokba a táplálékkal vagy a környezeten keresztül (vizi környezet) kerülhet be. A szervezetbe került rotenon először lecsökkenti a táplálkozást és a mozgást, majd felfüggeszti azokat. A HPLC mérések azt mutatják, hogy ebben az esetben a rotenon egy kb. 25%-os DA csökkenést idéz elő a CNS-ben. A kezelés alatt az óriás pedális DAerg sejt spontán aktivitása megmarad, de preszinaptikus kapcsolatai kiesnek. Az immuncitokémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a rotenonkezelés a tünetek kialakulásának idejére eltünteti a thyrosin-hydroxylase (TH) immunreaktivitást a neuronból, de felerősíti a DOPA decarboxylase (DC) immunreaktivitást mind a DAerg, mind az 5HTerg neuronokban. A megfigyelések azt feltételezik, hogy a rotenon egy még ismeretlen úton gátolja a TH expresszióját, így a neuronok számára nem áll rendelkezésre elegendő DOPA a DA szintézishez. Mivel az ágens nem gátolja a DC expresszióját ezért a neuronok külső forrásból vehetnek fel DOPA-t a DA szintézishez. Ez azt is feltételezi, hogy a DA szintézis két DOPA forrásból is történhet. Az egyik forrás maga a neuronban szintetizált DOPA, míg a másik, a külső forrás, a keringésben lévő DOPA, ami a táplálékok emésztéséből is származhat.

A rotenonra vonatkozó specificitási tesztek még csak a kezdeteknél tartanak. Ha a rotenon specifikus DAerg toxinnak bizonyul, lehetőségünk nyílik arra, hogy megvizsgáljuk azokat a folyamatokat amik hozzájárulhatnak a DAerg rendszer pusztulásához mind fiziológiai, mind biokémiai, mind molekuláris biológiai szinten. Továbbá vizsgálhatóvá teszi számunkra a DA szerepét a táplálkozási mozgások generálásában és a helyváltoztató mozgásokban is. Így, a rotenon lehetőséget nyújthat egy új egyszerű Parkinson modell létrehozásához is.

Az eredmények egy részéből kézirat készül a Neuroscience Letters számára:

Vehovszky Á , Szabó H , Hiripi L , Filla A , \*Elliott CJH , **Hernádi L** .Behavioural impairment induced by rotenone in the pond snail Lymnaea stagnalis. An invertebrate model for Parkinson's disease?

### ***Egy a táplálkozási mintázatgenerátort serkentő neuropeptide azonosítása csigában***

Az ízeltlábúakból izolált neuropeptide a crustacean cardioactiv peptide-hez (CCAP) nagyon hasonló molekulát mutattak ki Helix-ben (molluscan cardioaktív peptide, M-CCAP). A CCAP és az M-CCAP fiziológiai hatásait és idegrendszeri eloszlását vizsgáltuk csigákban. Lymnaea-ból készült izolált CNS preparátumon kimutattuk, hogy mind a CCAP, mind az M-CCAP képes beindítani ill.modulálni a táplálkozási mintázatgenerátor működését. Az eredmények egy részét publikáltuk (Vehovszky et al Neurosci Lett 2006). Helix-ből készült szív és nyelőcső preparátumokon megvizsgáltuk a két molekula kontrakcióra kifejtett hatását.

Mindkét molekula mindkét preparátumon képes serkenteni a spontán kontrakciókat. A legerőteljesebb hatást akkor kapjuk, ha a preparátumokat órákra hűtőben tároljuk. Ebben az esetben a szoba hőmérsékletű fürdőfolyadékban a spontán kontrakciók gyakorisága jelentősen lecsökken, de CCAP vagy M-CCAP-t adva a kontrakciók frekvenciája és amplitúdója jelentősen megemelkedik. A legerőteljesebb hatás  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M koncentrációnál fejtik ki. A hatás nehezen mosható vissza. A megfigyelések azt feltételezik, hogy a molekulának egy idegrendszeri és egy posztzinaptikus szöveti hatása is van.

Az immuncitokémiai vizsgálatok szerint a molekula mind a CNS-ben mind a periférián kimutatható. A CCAP elleni antitestet használva a CNS-ben az immunreaktív sejtek eloszlása mind a *Helix*-ben, *Lymnaea*-ban mind a *Planorbis*-ban nagy hasonlóságot mutat, ami azt feltételezi, hogy ez a filogenetikailag ősi molekula a különböző gastropoda fajokban is nagyon hasonló formában van jelen.

A kapott eredményekből kézirat készül a Cell and Tissue Research számára:

Hernádi L., Vehovszky, Á., Agricola, H. J. The distribution and effects of Crustacean cardioactive peptide (CCAP)-like molecule in different gastropod species.

***Az OTKA grant keretében végzett vizsgálatok eredményeiből a következő előadásokat mutattuk be:***

**László Hernádi, László Hiripi** The possible role of monoamines in the regulation of cyclic feeding movements during food ingestion in the snail *Helix pomatia*. **IBRO Workshop, Balatonfüred 2003**

Vehovszky Á., Agricola HJ., Elliott CJH., **Hernádi L.** Crustacean cardioactive peptide (CCAP)-like molluscan peptide (M-CCAP) modulates the neuronal activity of the feeding network in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. (**SEB Annual Meeting**) **Southampton 2003.**

**Hernádi L.,** Dyakonova V., Hiripi L. Opposite effects of short term and long term starvation on serotonergic system in snail. **VII. East Eu. Conf. of the ISIN Kaliningrad 2003.**

**Hernádi L.,** Hiripi L., Dyakonova V., Györi J., Vehovszky Á. The effects of the food intake and the starvation on the DA and 5HT contents in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. **ISIN Tihany, 2003**

**Hernádi L.,** Hiripi L., Györi L., Vehovszky Á., Dyakonova V., Elliott CJH. -Monoaminergic modulation of a serotonergic modulatory interneuron (cgc) during feeding in the snail, *Lymnaea stagnalis* (**IBRO Workshop, Budapest, 2004**)

Vehovszky Á., Hiripi L., Szabó H., **Hernádi L.,** Elliott C.: Heterogenous population of octopamine receptors for feeding modulation in the buccal network of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. (**MITT Konferencia, Pécs. 2005**)

**Hernádi L.**, Hiripi L., Győri J., Vehovszky Á.: Seasonal dependent changes of monoamine levels during food ingestion in the snail, *Helix pomatia*. (**MITT Konferencia, Pécs 2005**)

Vehovszky, Ágnes\*, Szabó, Henriette\*, Hiripi, László\*, Filla, Adrienn\*, Elliott, Chistopher J.H.\* , **Hernádi, László\*** Rotenone induces behavioural impairment in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with a possible involvement of the dopaminergic system. (**IBRO Workshop, Budapest 2006**)

**Hernádi László.**, Hiripi László, \*Dyakonova Varvara, Győri János., Vehovszky Ágnes The effects of starvation on the serotonergic and the dopaminergic systems in gastropods (**IBRO Workshop, Budapest 2006**)

Vehovszky Á , Szabó H , Hiripi L , Filla A , \*Elliott CJH , **Hernádi L** .Behavioural impairment induced by rotenone in the in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. An invertebrate model for Parkinson's disease? (**FENS Meeting, Bécs 2006**)