

A „Neuronális és extraneuronális aminerg receptorok jellemzése gerinctelenekben” című OTKA támogatott (46580) kutatás szakmai zárójelentése.

A kutatások az alábbi témákban folytak:

- A transzmitterek receptorainak azonosítása *Lymanea stagnalis* idegrendszerében, a pofaizomzatában, az embrióban, valamint a *Helix pomatia* talpizmában.
- Az aminerg rendszerek szerepe a mozgásaktivitás szabályozásában *Helix pomatia*-ban, valamint *Lymnaea* fejlődő embrióiban és felnőtt egyedeiben.
- Az oktopamin receptor vizsgálata *Locusta migratoria* és *Lymnaea stagnalis* idegrendszerében

Az acetilkolin, szerotonin és a dopamin receptorainak jellemzése *Lymnaea stagnalis* idegrendszerében.

A transzmitterek receptorainak azonosítására radioaktív jelzett ligandok kötődésének kinetikai és farmakológiai vizsgálatát valamint a második hírvivő rendszernek, az adenil cikláznak a vizsgálatát alkalmaztuk.

A ligandok kötődésének vizsgálatához a szövetek homogenizátumából többszöri centrifugálással (45000 g x 30 perc) és közbenső reszuszpendálással membrán pelletet készítettünk. A radioaktív ligandok pellethez való kötődésének kinetikai és farmakológiai vizsgálatát az irodalomból ismert módszerrel végeztük. Az LSD kötődését a szerotonin receptor helyekhez 10 μ M dopamin jelenlétében, míg a dopamin kötőhelyekhez 10 μ M szerotonin jelenlétében vizsgáltuk.

A *Lymnaea* idegrendszer esetében az acetilkolin nikotin és muszkarin típusú receptorainak jelenlétét ^3H -nikotin illetve ^3H -quinuclidinil benzilat (^3H -QNB) kötődésének elemzésével vizsgáltuk. A szerotonin receptorok azonosításakor a ^3H -5HT, ^3H -LSD, ^3H -5-Carboxamidotryptamine (^3H -5CT), ^3H -Ketanserin, ^3H -GR6563 míg a dopamin receptorok azonosításakor ^3H -LSD, ^3H -SCH23390, és ^3H -spiperon ligandok kötődését elemeztük.

A transzmitterek illetve különböző farmakonok hatását az adenil cikláz enzimen a ganglionok ciklikus AMP tartalmának változása révén elemeztük. A néhány mg-nyi gangliont vagy kb. 20 mg-nyi perifériás szövetet 250 μ l fiziológias oldatban 1 mM 3-izobutilmetilxantin, guanosin trifoszfát, ATP és farmakonok jelenlétében 5 percig 25°C-on inkubáltuk, majd a gangliont savazott etanolban homogenizáltuk, 16000 g-n 10 percig

centrifugáltuk és a felüluszó aliotját liofilizálással szárazra pároltuk. A precipitátumot 250 µl Tris-EDTA pufferben reszuszpendáltuk és centrifugáltuk, majd a felüluszó 50 µl-nyi térfogatából a cAMP mennyiségét „protein binding” módszerrel mértük.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy mindkét kolinerg ligand kötődése telítési görbével írható le. A telítési görbe analízise egyetlen nagy affinitású muszkarin illetve nikotin kötőhely jelenlétét igazolták. A $^3\text{H-QNB}$ kötődése a muszkarin típusú receptorhoz stereospecifikus és a gerincesekben leirt receptorhoz hasonló affinitású ($K_d=2.03$ nM, $B_{\max}=8.5$ fmol/mg szövet), míg a nikotin típusú receptor affinitása csigában ($K_d=23.2$ nM, $B_{\max}=79.1$ fmol/mg szövet), a gerincesekben leirt receptorhoz képest kisebb affinitású. A farmakonok hatásossági sorrendjét a muszkarin illetve nikotin típusú receptorokon a következőnek találtuk: Dextimide > Atropin > Levetimide > Oxotremoline > Pirocarpine > Carbachol > d-Tubocurarine illetve Nicotine > Tubocurarine > TEA > Atropine > Arecoline > Ach > Oxotremoline > Hexamethonium. Az acetilkolin nem befolyásolta az adenil cikláz aktivitását *Lymnaea* idegrendszerben.

A szerotonin receptorainak azonosítása során azt találtuk, hogy az 5HT receptorok ligandjai közül az 5HT₂ és 5HT₃ receptor ligandjai, az $^3\text{H-ketanserin}$ és a $^3\text{H-GR6563}$ nem kötődik specifikusan a membrán pallethez. Ez arra utal, hogy az 5HT₂ illetve az 5HT₃ típusú szerotonin receptorok vagy nincsenek jelen a csiga idegrendszerében, vagy denzitásuk olyan alacsony, hogy a ligand kötés módszerével jelenlétük nem azonosítható. Elektrofiziológiai vizsgálatok során ugyan találtak olyan sejteket, melyeken az 5HT₂ illetve 5HT₃ receptor antagonisták hatásosak voltak (Vehovszky and Valker, 1991, Walcourt-Ambakederemo and Winlow 1994 a, b, 1995) azonban az antagonisták hatásos koncentrációi (10^{-4} - 10^{-3} M) alapján nem specifikus hatások valószínűsíthetők. Gerhardt és mtsai (1996) *Lymnaea* idegrendszerből klónolt ugyan egy 5HT₂ típusú receptort (5HT_{2Lym}), azonban az in situ hibridizációs kísérletek során az egész központi idegrendszerben csak 2-3 sejt volt olyan melyben az 5HT_{2Lym} receptor expresszáldott. Sugamori, (1993) ugyancsak klónolt egy 5HT receptort *Lymnaea* idegrendszerben, a receptort $^3\text{H-LSD}$ kötődés vizsgálatával jellemezte, azonban a receptor tulajdonsága alig hasonlít az általunk *Lymnaea* idegrendszerben azonosított native receptorhoz. Az általunk végzett vizsgálatok során *Lymnaea* idegrendszerben a native receptorhoz az $^3\text{H-5HT}$ ($K_d=473$ nM) és az $^3\text{H-5CT}$ ($K_d=395$ nM) kötődése nagyon alacsony affinitású, ami a gerincesekben azonosított 5HT₁, 5HT₆, 5HT₇, típusú receptorok hiányára utal. Az egyetlen ligand mely nagy affinitással kötődik *Lymnaea* idegrendszerben, hasonlóan a *Helix pomatia*-hoz (Drummond és mtsai, 1980) az a $^3\text{H-LSD}$ ($K_d=1.41$ nM). Az $^3\text{H-LSD}$ azonban nagy affinitással kötődik *Lymnaea* idegrendszerében mind a szerotonin, mind a

dopamine receptorhoz. A kötődés farmakológiai tulajdonságát vizsgálva az állapítható meg, hogy az LSD kötődése mind a szerotonin, mind a dopamine receptorhoz alacsony koncentrációban csak az ergot alkaloidákkal, (LSD, ergotamine, ergometrine, dihydroergocryptine, methysergide, metergoline) vagy neurolepticumokkal (butaclamol chlorpromazine, clozapine) gátolható és nem gátolható a gerinceseken leirt az ergot alkaloidáktól eltérő szerkezetű specifikus szerotonin vagy dopamine farmakonokkal. E farmakonok az LSD kötődését mind a szerotonin, mind a dopamine receptorhoz közel azonos koncentrációban gátolták. Az egyetlen hasonlóság a native és a klónolt receptorok között, hogy az LSD, clozapine, ergotamine mindkét receptoron alacsony koncentrációban gátolja az ^3H -LSD kötődését. Lényeges különbség a két receptor között azonban az, hogy a két receptornak az adenil ciklázhoz való kapcsolata különböző. Részletes vizsgálataink alapján igazoltuk, hogy a *Lymnaea* idegrendszerében a szerotonin serkenti az adenil cikláz aktivitását. A szerotonin szezonálisan függő mértékben stimulálja az AC aktivitását a különböző ganglionokban. Tavasztól őszi terjedő periódusban 100 μM szerotonin serkentő hatásának mértéke 207, 258, 241, 183 %-os a cerebrális, pedális, garatalatti és bukkális ganglionokban. Téli periódusban a cerebrális és bukkális ganglionokban az AC stimuláció mértéke 190,3 és 182 %, míg a pedális és a garatalatti ganglionban nem volt mérhető a szerotonin serkentő hatása. Az 5HT-től kisebb mértékű stimulációt okozott a 8OHDPTA, míg az 5CT stimulációja jelentéktelen volt (5HT>8OHDPTA>5CT). Bár a klónolt receptoron az 5HT és a 8OHDPAT affinitása alacsony, μM -os nagyságrendű, az 5CT affinitása nM-os nagyságrendű, mégis 5HT1 típusú vagy ahhoz hasonló receptornak írták le. Az ^3H -LSD kötődésének gátlásakor a három farmakonra a native receptoron talált hatásossági sorrendel ellentétes hatásossági sorrendet találtak (5CT>8OHDPTA>> 5HT). A szerotonin adenil cikláz serkentő hatását *Lymnaea* idegrendszerében is a *Helix* idegrendszerben leirtakhoz hasonlóan azon farmakonok képesek gátolni (LSD, ergotamine, methysergid, butaclamol flupentixol) melyek az LSD kötődését is gátolták. A *Lymnaea* idegrendszerben a native szerotonin receptor pozitívan kapcsolt a második hírvivő rendszerhez. A klónolt receptor esetében ugyan nem vizsgálták, hogy a receptoron a szerotonin serkenti e az adenil cikláz, azonban a *Lymnaea*-ból izolált gén a gerincesekben leirt 5HT1 receptor génjével nagymértékben egyező strukturája alapján arra következtettek (Sugamori és mtsai,1993, Tierney, 2001), hogy a receptor negatívan kapcsolt az adenil ciklázhoz. Ezek alapján a receptort 5HT1 típusú receptorhoz hasonló 5HT_{Lym} receptornak tartják. Kísérleti eredményeink egyértelműen cáfolják, hogy *Lymnaea* idegrendszerében a native szerotonin receptor hasonló a gerincesek 5HT1 típusú receptorához. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a puhatestűekben a

transzmitterek receptorának azonosításakor nem elegendő a receptor gén stukturáját és annak a gerincesekben talált receptor típus génjével való megfelelést vizsgálni, hanem a native és a klonolt receptor farmakológiai összehasonlítása is szükséges. A native és a klonolt receptor farmakológiájának összehasonlítása azonban mindig elmarad.

Mind a D₁ mind a D₂ dopamin receptor ligandja egy mérsékelt vagy inkább alacsony affinitással kötődnek a receptorhoz. K_d (³H-SCH23390)= 146.6 nM, illetve K_d =(³H-Spiperon) 97.2 nM. A különböző farmakonok az alábbi hatásossági sorrenddel gátolták a D₁ és D₂ receptork ligandjainak kötődését. A zárójelben feltüntetett K_i értékek μ M-ban vannak kifejezve: az ³H-SCH23390 ligand kötődés gátlása, SKF38393 (0,15), SCH23390 (0,77), Klórpromazin (0,8) spiperon (14,5) dopamine (7), flufenazin (38), butaklamol (40). A ³H-Spiperon kötődés gátlása, spiperon (0,062), dopamine (0,66), flufenazin (0,85), butaclamol (4,0). Itt is, hasonlóan a szerotonin receptorhoz nagy affinitású kötődést csak az LSD-vel mérhető K_d = 1,09 nM. A leszorításos kísérletekben a hatásos farmakonok affinitási sorrendje a dopamin kötőhelyekre a szerotonin kötőhelyről való leszorítás sorrendjével jó egyezést mutat, ugyanazon farmakon affinitása a dopamine kötőhelyhez kicsit nagyobb mint a szerotonin kötőhelyhez.

Prudnikova és Tsyvkin (1998) *Lymnaea* központi idegrendszerben kimutatta az ³H-dopamin nagy affinitású kötődését (K_d = 5 nM), azonban a vizsgálat érdekessége, hogy a hideg dopamin az ³H-DA kötődését csak közel 10^{-5} M koncentrációban képes 50 %-ban gátolni. A D₁ (SKF83566) és D₂ (Sulpirid) antagonisták 50 %-os gátlása hasonlóan a mi kísérleteinkhez aránylag nagy koncentrációnál (5×10^{-5} – 10^{-4} M) jelentkezett. Az ³H-GDP kötődésének elemzéséből azt a következtetést vonták le, hogy a dopamin receptor a G-proteinhez kapcsolt. A saját kísérleti eredményeink és irodalmi adatok (Werkman et al., 1990) nem támasztják alá ezen megállapítást, *Lymnaea* központi idegrendszerében. a dopamin nem befolyásolja a cAMP szintet. Stoof és mtsai (1984) a *Lymnaea*-ban a növekedési hormont termelő sejtek dopamine érzékenységet és a dopamine receptor farmakológiai tulajdonságát vizsgálva az emlősök D₁ és D₂ receptoraihoz hasonló de azzal nem teljesen azonos farmakológiai tulajdonságú receptorok jelenlétére következtettek. Később azonban a megismételt vizsgálatok során (Werkman és mtsai, 1987) korrigálták eredményeiket és csak D₁ típusú receptor jelenlétéről beszélnek. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján arra következtethetünk, hogy a puhatestűek dopamine receptorai különböznek a gerincesek dopamine receptoraitól annak ellenére, hogy farmakológiai tulajdonságaikban néha találunk hasonlóságot.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a filogenetikai fejlődés során a gerincesekre jellemző szerotonin és dopamin receptorok illetve azok altípusai a puhatestűek idegrendszerében még nem jelennek meg. Ugyanakkor a kolinerg receptorok filogenetikai fejlődése konzervatív út mentén történik.

A szerotonerg rendszer vizsgálata *Lymnaea stagnalis* pofaizomzatában.

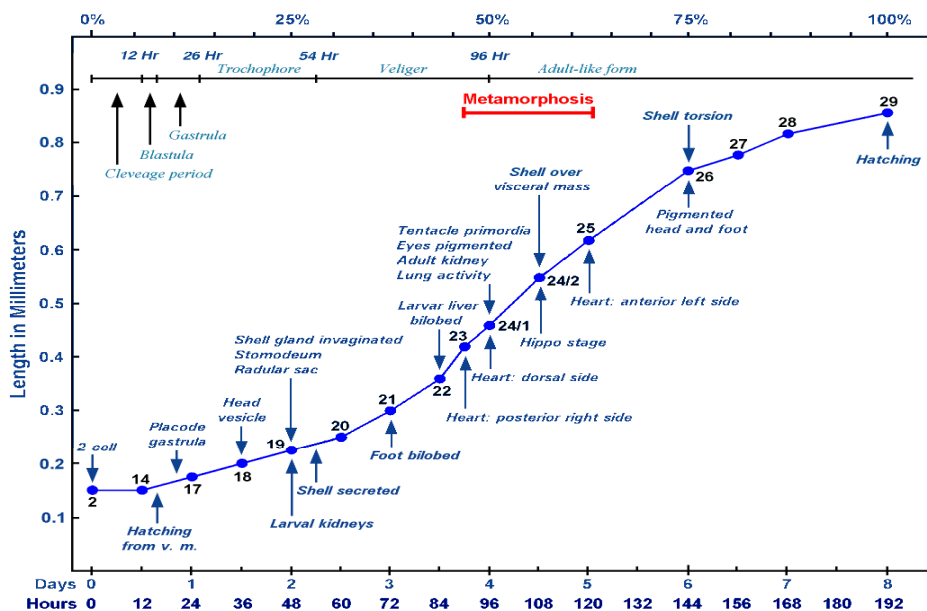
A *Lymnaea* pofaizomzatában mely a táplálkozási magatartás kivitelező eleme igazoltuk szerotonerg rendszert transzmitter szerepét. Meghatároztuk az 5HT koncentrációit, mely fokozatosan nő a P1 (3,6 pmol/mg) és P6 (6 pmol/mg) juvenilis stádiumok között, majd felnőtt állatban 42,4 pmol/mg értéket ért el. Azonosítottunk egy 5HT uptake-release mechanizmust, melyben a felvétel Na-függő, affinitása $K_m=13,6 \mu\text{M}$, a felvétel sebessége $V_{\max}=12,7 \text{ pmol/mg/20 perc}$. A felvett ^3H -5HT felszabadulása 100 mM K^+ hatására többszörösére nőtt és a felszabadulás Ca^{2+} függő volt. A felvétel a P1 juvenilis stádiumban a felnőtthez képest csak 25 %-os és ez a P6 stádiumban 50 %-ra nő. A pofaizomzathoz készített membrán preparátum nagy affinitással köti az ^3H -5HT-t ($K_d=4.5 \text{ nM}$, $B_{\max}=2.4 \text{ fmol/mg}$ szövet). A kötődés gátlásának a vizsgálatok a farmakonok hatásossági sorrendje a következő volt: a) agonisták : 5HT > 5-Methoxytryptamin > 5CT = 8OHDPAT, b) antagonisták: Methiohepin = SB258585 > Clozapine > Metergoline > Methysergide=BOL. Az 5HT receptor adenil ciklázhoz kapcsolt, minthogy az izomban jelen lévő cAMP szint (4,8 pmol/mg szövet) szerotoninnal történő inkubálást követően koncentráció függő növekedést (max. 326 %) mutatott. Agonisták mint az 5CT, 5Metoxytriptamin, 8OHDPAT az alábbi sorrendben stimulálták az adenil cikláz aktivitását 5HT > 5metoxitriptamin = 5CT > 8OHDPAT. Az antagonisták hatásossági sorrendje a következő volt: BOL > Metergolín > SB258585 > Methysergide = Methiohepin = Clozapin. Az ^3H -5HT kötődésének és a szerotonin stimulált cikláz aktivitás farmakológiai befolyásolhatósága arra utal, hogy a szerotonin receptor a gerinces 5HT₆ receptorhoz nagymértékben hasonló. E receptor jelenlétét puhatestű állatok perifériás szövetében e kísérleti adatok igazolják először.

Az eredményeket, a közlést megelőzően a dopaminerg rendszer hasonló vizsgálatával fogjuk kiegészíteni.

A szerotonerg és dopaminerg rendszerek vizsgálata a *Lymanea* embriogenezise során.

A *Lymnaea* embrio a tojás kapszulán belül a kikelésig, 8 napig fejlődik. Kísérleteink során HPLC-s vizsgálatokkal az embriókban szerotonint és dopamint valamint a szintézisben

közreműködő enzimeket azonosítottuk, és mennyiségüket mértük a fejlődés során. Vizsgáltuk, hogy a monoamin szintben előidézett változás hogyan befolyásolja az embrionális életidőt. Elemeztük, hogy a fejlődés során jelentkező mozgásformák, forgómozgás, szív működés, táplálkozás és csuszás, hogyan változnak monoaminerg farmakonokkal történő kezelés során. A szerotonint és a dopamint a 12 %-os fejlődési stádiumban (E12%) tudtuk először azonosítani és mérni. A szerotonin koncentrációja ekkor 47 fmol/embrio volt és közel ez maradt egészen a 75 %-os (E75%) fejlettségi szintig. A 75 %-os és a 100 %-os fejlettségi szint között a szerotonin koncentrációja jelentősen megnőtt (1A.ábra) és kikeléskor értéke 490 fmol/embrio volt. A dopamin szintje az E12 %-os fejlettségi szintkor alacsonyabb volt, 15 fmol/embrio, mint a szerotonin szint, de aztán lassú de fokozatos növekedést mutatott az E40



A *Lymnaea* embrio fejlődése.

%-os fejlettségi szintig. A metamorfózis alatt, majd azt követően a 80%-os fejlettségi szintig a dopamin koncentrációja nem változik (kb. 150 fmol/embrio), de ezt követően a szerotoninhoz hasonlóan koncentrációja jelentősen nőtt és kikeléskor elérte a 400 fmol/embrio értéket (1A.ábra).

Igazoltuk, hogy a szintetizáló enzimek, a tirozin és a triptofán hidroxiláz, valamint a DOPA és 5HTP dekarboxiláz enzimek jelen vannak a *Lymnaea* embrióban. Az enzim 5HTP irányában nagyobb affinitással, míg DOPA irányában nagyobb aktivitással rendelkezik.

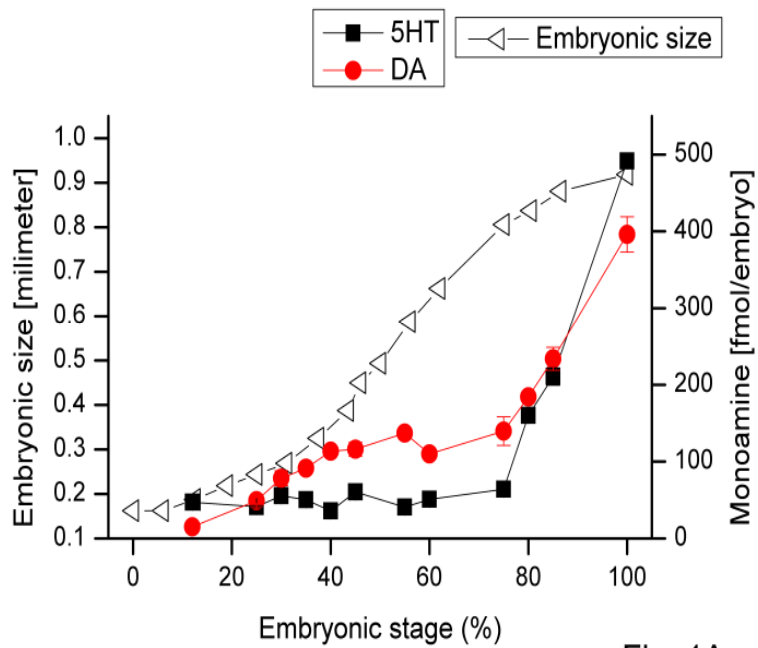


Fig. 1A

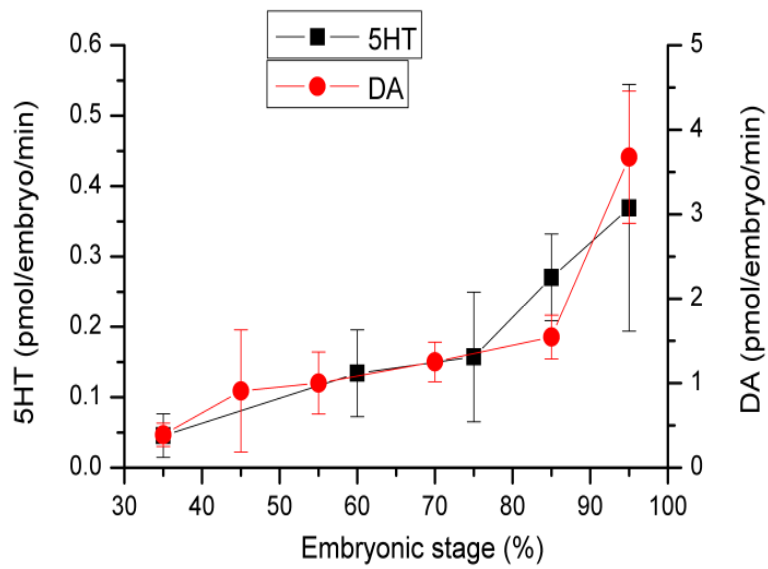


Fig. 1B

A monoamin szint (Fig.1A) valamint az 5HTP-DOPA dekarboxiláz enzim (Fig.1B) aktivitásának változása a fejlődés során.

A dekarboxiláz enzimek esetében vizsgáltuk az enzim aktivitásának a fejlődés során bekövetkező változását is. Megállapítottuk, hogy a DOPA és 5HTP dekarboxiláz enzimek aktivitásai párhuzamosan változnak a monoamin szinttel (1B ábra). 100 μ M triptofán adása 189,6 %-ra emeli a szerotonin szintet és 57 %-al növeli az embriók életidejét. 5 μ M tirozin adása mérsékelt, 24 %-os növekedést okoz a dopamin szintben, azonban az embrionális életidőt 7 nappal hosszabbította meg. Ettől magasabb prekursor koncentráció az embrió torzulását eredményezte. Ha 10 μ M koncentrációban p-klórfenilalanin volt jelen, az 5HT szint 65,5 %-ra, a dopaminszint 43,5 %-ra csökkent, az embrionális életidő pedig 78 %-al megnövekedett. Ezzel ellentétben a tirozin hidroxiláz gátlószere az α -metil-p-tirozin 300 μ M-os koncentrációig nem befolyásolta az embrió életidejét. Ettől nagyobb koncentráció az embriók pusztulását eredményezte. Ha a dekarboxiláz enzimet 10 μ M-os NSD-1015-el gátoltuk az embrió életideje közel 15 napra nőtt. A dopamin rendszert károsító neurotoxin az MPTP vagy az MPP⁺ 10 μ M illetve 100 μ M-os koncentrációban a dopamin szint 50 %-os csökkenését idézte elő és 6-4 napos embrionális életidő növekedést okozott. A 6OHDA hatását embriókban nem tudtuk vizsgálni, mert az antioxidáns szorbinsav már 0,1 mg/ml koncentrációban is, ami alig elegendő a 6OHDA stabilizációjához, az embriók teljes pusztulását okozták.

Mind felnőtt állatban mind az embrióban vizsgáltuk egy másik toxin, a rotenon hatását is. Ismert, hogy az MPTP, 6OHDA és a rotenon toxinokkal a dopaminerg rendszer károsítása révén gerincesekben Parkinson szindróma váltható ki. A rotenon felnőtt *Lymnaea*-n vizsgálva toxikusnak bizonyult, befolyásolta az állat mozgását, táplálkozását, a rotenon kezelés csökkentette a dopamin szintet és az elektrofiziológiai vizsgálatok a dopaminerg neurotranszmisszió károsítására utaltak. Érdekes módon az embriókban a rotenon kezelés nem eredményezte a dopaminerg rendszer károsítását és nem okozott viselkedési válaszokban szignifikáns változást. A 6OHDA hatását a felnőtt állatokban is nehéz vizsgálni, mert az aszorbinsav az állatok pusztulását eredményezi olyan koncentrációban mely megakadályozza a lebomlást.

Eredményeink arra utalnak, hogy az 5HT/DA arány fontos faktor az embrionális fejlődés során és egy optimális arány szükséges a normális fejlődéshez. Azok a farmakológiai kezelések melyek az 5HT/DA arány módosulását okozták, késleltették az embrionális fejlődést. Úgy tűnik, hogy az 5HT koncentrációja szabályozza a dopamin szintet, mivel a triptofán kezelés alkalmával nemcsak a szerotonin szint, hanem a dopamin szint is nőtt, míg a pCPA hatására bekövetkező szerotonin szint csökkenése a dopamin szint csökkenését is eredményezte.

Az embriók a 40%-os fejlettségétől kezdődően a metamorfózis végéig a kapszulán belül egy forgómozgást végeznek. Ez a forgómozgás 5HT-vel serkenthető. Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy az aminerg farmakonok, hogyan befolyásolják a forgómozgást, lehet-e a gerincesekben leírt monoamin receptorok valamelyikét azonosítani.

A forgómozgást alacsony koncentrációban, 1 μM -os küszöbkonzentrációnál leghatásosabban az LSD, 8OHDPAT, 5HT, és a DMT serkenti. A 8OHDPAT szelektív 5HT₁ receptor agonista, így ez alapján e receptor jelenlétére gondolhatunk. Ugyanakkor azonban az ugyancsak 5HT₁ receptor agonista 5CT csak 1000-szer nagyobb koncentrációban képes a forgómozgás stimulációjára. A dopamin serkentő hatása csak 100 μM -os koncentrációban jelentkezik. A csúszást alacsony koncentrációban (1 μM) ugyancsak az LSD és a 8OHDPAT stimulálja és az 5CT itt is csak 1000-szeres koncentrációban hatásos. A radula mozgását azonban már csak az LSD képes alacsony koncentrációban stimulálni, de nincs jelentős hatása a 8OHDPAT-nek. A szív működést már csak az LSD és az 5HT képes serkenteni 10 és 100 μM -os koncentrációban. A központi idegrendszerben az 5HT₁ receptor jelenlétét kizártuk, azonban az embrionális forgómozgás és a csúszás szabályozásában elképzelhető, hogy 5HT₁ típusú receptorhoz hasonló szerotonin receptor vesz részt.

Az eredmények az alábbi közleményekben jelentek meg, vagy fognak megjelenni:

Filla A, Hiripi L, Elekes K: Serotonergic and dopaminergic influence of the duration of embryogenesis and intracapsular locomotion of *Lymnaea stagnalis* L. *Acta Biol. Hung.* 55, 315-321, 2004.

Filla A; Hiripi L; Elekes K: Possible role of aminergic system in the development and behavior of embryos of the pond snail *Lymnaea stagnalis* J. *Neurochem* 94, 172, 2005.

Vehovszky Á, Szabó H, Hiripi L, Elliott CJH, Hernádi L: Behavioural and neural deficits induced by rotenone in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. A possible model for Parkinson's disease in an invertebrate. *Eur. J. Neurosci.*, 25, 2123-2130, 2007.

László Hiripi and Károly Elekes: Characterization of transmitter (acetylcholine, serotonin and dopamine) receptors in the CNS of the pond snail *Lymnaea stagnalis* L. Kézirat

Filla A, Hiripi L, Elekes K: Role of aminergic (serotonin and dopamine) system in the embryogenesis and different behaviors of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*., Kézirat

A szerotonin és a dopamin szerepe az inaktív (aestivated, nyári álom) csiga, *Helix pomatia* aktiválódási folyamatának szabályozásában.

A szárazföldi csiga a tavasztól őszig tartó periódusban heteken keresztül egy inaktív állapotban, (aestivated, nyári álom) képes elviselni a számára előnytelen tartósan száraz meleg

periódust. Ebben az állapotban a foszforilációval-defoszforilációval szabályozott (Brooks és Storey, 1995) metabolikus folyamatai annyira lecsökkennek, hogy azok az eredeti aktív állapotbelinek csak a 20-30 %-a. Az inaktív állapotban a talpizom tartós tónusos kontrakciója révén a test visszahúzódik a házba, a szívműködés lelassul, és a keringés csökken. Ha a környezet nedvesség tartalma nő az állat felébred a nyári álomból. A környezet nedvességtartalmának növekedése serkenti a higroreceptorokat aminek, következtében növekszik a légzés, gyorsul a szívműködés, és a keringés, az izom relaxálódik és az állat előbújik házából, elkezd mozogni majd táplálkozni. Irodalmi adatokból ismert, hogy a viselkedési állapotok, mint az ébredés, mozgás vagy a táplálkozás szabályozásában jelentős szereppel bír mind a szerotonin, mind a dopamin. Így kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a tartós inaktív állapotból való felébredés, majd az azt követő mozgás és táplálkozás során hogyan változik az idegrendszerben, szív és a talpizom és a táplálkozásban szerepet játszó pofaizomban a szerotonin és dopamin koncentrációja. Vizsgáltuk, hogy e folyamatok során hogyan változik a szívserkentő neuron és a táplálkozási hálózat modulátor neuronjának az aktivitása.

Az inaktív állatokat ozmotikus sokkal ébresztettük úgy, hogy a csigát bemenő nyílásánál hőmérsékletével egyező hőmérsékletű vízzel megnedvesítettük, majd a bemenő nyílással lefelé fordítva olyan üvegcádba helyeztük melyben vékony vízréteg volt, és a légtér vízgőzre telített volt. Ilyenkor az állatok 10-20 percen belül aktiválódnak, kibújnak házukból és elkezdenek mozogni.

A HPLC-s mérések azt mutatták, hogy az állatok aktiválása során a központi idegrendszerben mind a szerotonin mind a dopamin szint csökken. A talp és a szívizom dopamin szintje alig változik, a szerotonin szint viszont 50 %-al nő.

A bukkális ganglionban és bukkális izomban melyek a táplálkozás mechanizmusában vesznek részt, nem változik sem a szerotonin sem a dopamin szintje.

Az MGC óriás szerotonerg neuronnak az aktivitása az inaktív csigában 11.1 spike/min tüzelési frekvenciával és 28.8 mV nyugalmi membránpotenciállal volt jellemezhető. Az ozmotikus stimuláció a sejt tüzelési frekvenciáját 31.8 spike/perc értékre növelte. A szívserkentő neuron tüzelési frekvenciája 24.3 spike/min értékről 47.0 spike/min értékre nőtt. A szívserkentő neuronok megnövekedett aktivitása a szerotonin felszabadulását és a szív irányába történő transzportját, ezáltal a szív szerotonin tartalmának növekedését illetve a szívműködés serkentését eredményezte. A szívműködés serkentése növeli a keringést, miáltal a szerotonin transportja a talpizom irányába is nő. Ennek eredményeként az idegrendszer

szerootonin tartalma csökkent, míg a periférián nőtt. A talpizomban a szerootonin az izom relaxációját okozza, lehetővé teszi a csiga mozgását, a táplálékkeresést.

Az inaktív állat aktiválódása különböző időjárási körülmények között azonban eltérő lehet. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy az időjárási viszonyok befolyásolják a központi ébredési mechanizmust mely felelős az állatok viselkedési válaszáért.

Száraz időben (160 perc) az állatok aktiválódása hosszabb időt vesz igénybe, mint nedves időben (11.6 perc) és fordítottja is igaz, hogy az inaktiválódáshoz nedves időben több idő kell (150 perc) mint száraz időben.

A központi idegrendszerben mind a DA mind az 5HT szint magasabb volt száraz időben mint a nedves időben. Száraz időben az idegrendszer DA koncentrációja magasabb volt mint az 5HT koncentrációja, míg esős időben az 5HT koncentrációja volt a nagyobb. Az állatok aktiválódása során az idegrendszerben mind a DA, mind az 5HT koncentrációja csökkent, bármelyik időjárási körülmény között.

Az inaktív csiga szív és talpizom szövetének 5HT tartalma alacsony volt száraz időben, és magasabb a nedves időjárási körülmények között. A DA szintje e két perifériás szövetben alig változott az időjárási viszonyoktól függően.

Az RP neuron intracelluláris aktivitása száraz időben alacsony volt és szignifikánsan megnőtt nedves időjárási körülmények között. Száraz időjárási viszonyok között az 5HT depolarizációs hatása rövid volt és csak néhány akciós potenciált váltott ki. Meleg esős időben az 5HT által kiváltott depolarizáció hosszabb volt, mialatt a tüzelési frekvencia megnőtt.

A különböző időjárási viszonyokhoz tartozó 5HT és DA szint valamint, az 5HT/DA arány szabályozhatja az állatok szöveteiben mind az oxigén felhasználást és a metabolizmus sebességét. Feltételezhető, hogy a szerootonin növeli az aerob glikolizist és az oxigén felhasználást az inaktív állatban, míg a dopamin valószínűleg az anaerob glikolizist stimulálja mely a tartós inaktív (nyári álom) állatra jellemző.

A monoamin szint változása a táplálkozás során

A szerootonin és dopamin szint változását a táplálkozással összefüggésben a bukkális és cerebrális ganglionokban, a pofaizomban és a szívben vizsgáltuk. A monoamin szintet a táplálkozás korai fázisában, a folyamatosan táplálkozó állatban, a táplálkozás késői fázisában és a jólakott állatokban mértük.

A táplálkozás korai fázisában a dopamin szint növekedett a bukkális és a cerebrális ganglionban. Ezzel ellentétben a szerootonin szintben nem volt változás egyik ganglionban sem. A táplálkozás folyamatos szakaszában és a késői szakaszában a monoamin szint mindkét

ganglionban növekedett. A jólakott állatban mind a dopamin, mind a szerotonin szint a kontroll állat szintjére csökkent. A bukkális és a cerebrális ganglionban növekedett mind a dopamin, mind a szerotonin koncentrációja, legmagasabb értékeket a folyamatos táplálkozás fázisában mértük. A táplálkozás minden fázisában dopamin túlsúly uralkodott. A pofaizomzatban a dopamin szint nem változott a táplálék fogyasztása alatt, a szerotonin szint azonban csökkent és a minimumot a táplálkozás késői fázisában érte el. A jólakott állatban a szerotonin szint nem különbözött a kontrolltól. A szívizomban mind a szerotonin szint mind a dopamin szint a táplálkozás kezdetétől kezdődően növekedett és a magasabb monoamin szint megmaradt egészen a jólakottságig.

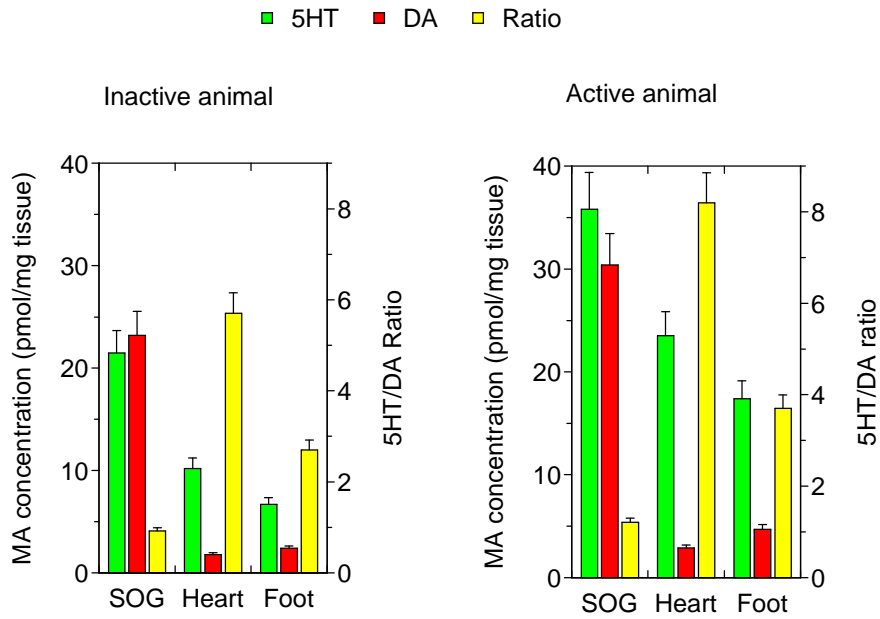
A hemolimfa szerotonin és dopamin szintjének hatása a táplálkozásra *Helix pomatia*-n.

HPLC-s vizsgálatokkal kimutattuk, hogy mind a szerotonin mind a dopamin jelen van a *Helix pomatia* hemolimfájában ahol neurohormonális szerepe lehet. A dopamin vagy szerotonin injektálása megemeli azok szintjét hemolimfában. A megnövekedett szerotonin és dopamin koncentráció befolyásolja a táplálkozási latenciát függetlenül attól, hogy az állat éhes vagy jólakott. 1 nappal a jólakottság után amikor táplálkozási stimulus rövid táplálkozási epizódot vált ki (2-5 perc), a megnövekedett szerotonin és dopamin szint a táplálkozási latencia növekedéséhez vezet. Három nappal a jólakott állatnak ha táplálékot adunk hosszabb ideig eszik (10-20 perc) és a megnövekedett dopamin szint csökkentette, ugyanakkor az ugyanazon szerotonin szint növelte a táplálkozási latenciát az állatban. 10 nappal a jólakottságot követően az éhes állat 60-90 percig eszik ha táplálékot kap, a dopamin injektálása a hemolimfába 0,1 és 10 μM vékoncentrációban koncentrációtól függő módon csökkenti a táplálkozási latenciát. Az 1 μM -ra növelt szerotonin koncentráció csökkenti, míg a 10 μM -ra növelt a szerotonin koncentráció növeli a táplálkozási latenciát. Ha szerotonin vagy dopamin injektálással azok koncentrációját 100 μM -ra növeltük a hemolimfában legátoltuk a táplálkozási válaszát az állatnak. 100 μM -os vékoncentrációban a dopamin immobilizálta az állatot, nem táplálkozott, míg ha 10 μM -os vékoncentrációjú szerotonin is jelen volt az állat elkezdett enni. Ha 100 μM volt a szerotonin koncentrációja a hemolimfának, annyira megnövelte a mozgásaktivitását, hogy az állat nem táplálkozott. Ha azonban a szerotoninnal együtt 10 μM -ban dopamint is injektáltunk, az állat ismét táplálkozott.

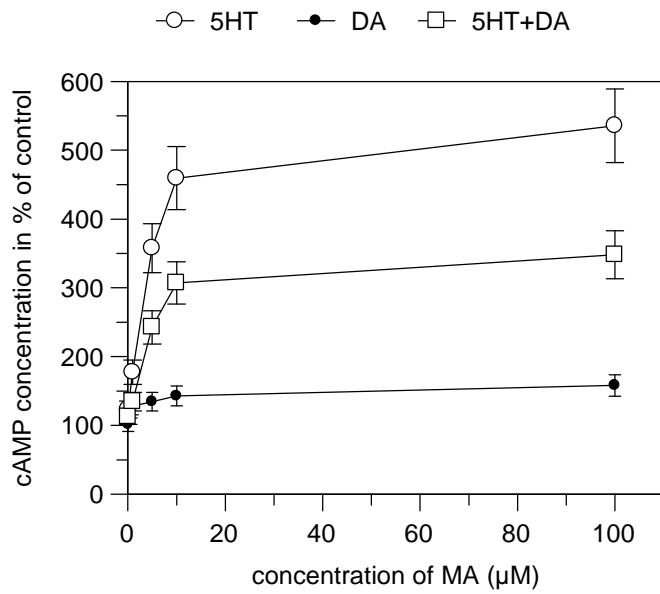
Az inaktív állat aktiválódási mechanizmusának részletes vizsgálata

Részletesen vizsgáltuk, hogy a serkentő transzmitterek milyen sorbakapcsolt mechanizmus révén szabályozzák az izom aktivitását. Megvizsgáltuk, hogy a transzmitter \rightarrow adenil cikláz

kapcsolt receptor → cAMP → cAMP stimulált protein kináz A → foszforilált protein cascád rendszer szabályozza e az izom illetve az állat aktivitását. Az aminerg szabályozás sorba kapcsolt mechanizmusainak vizsgálata során az inaktív, és aktív csigák közötti különbségek vizsgálatakor az aktív csigáknak azokat az állatokat tekintettük, melyek legalább 2 hétig 26-28⁰C-on 85-90 %-os relatív páratartalmú kamrában éltek és táplálkoztak. Inaktív csigáknak tekintettük azokat az állatokat, melyeket kísérlet előtt ugyanezen a hőmérsékleten de 50-55 %-os relatív páratartalmú kamrában táplálék nélkül legalább 2 hétig tartottuk. Első lépésben mértük a szerotonin és dopamin koncentrációját a tartósan aktív és inaktív állatok szöveteiben, a garatalatti ganglionban, a szívben és a talpizomban. Megállapítottuk, hogy az aktív állat mindhárom vizsgált szövetében a szerotonin és a dopamin koncentrációja 31,1-130 %-al magasabb. Az aktív állat esetében mindhárom szövetben a szerotonin koncentrációja magasabb, mint a dopaminé, szerotonin túlsúly érvényesül. Az inaktív állatok ganglionjában a dopamin koncentrációja magasabb, mint a szerotoniné, enyhe dopamin túlsúly érvényesül, míg a szív és talpizomban a szerotonin koncentrációja a magasabb, így e szövetekben inaktív állat esetében is szerotonin túlsúly érvényesül, de ez jóval kisebb mértékű mint az aktív állatban. Az aktív állat szöveteiben mind a szerotonin koncentrációja, mind a túlsúlya nagyobb mint az inaktív állatban. A szerotonin szint növekedése a talp és a szív szöveteiben az adenil cikláz stimulációja révén növeli a cAMP koncentrációját. A talpizom szeletekben részletesen vizsgálva megállapítottuk, hogy a szerotonin koncentrációfüggő módon jelentősen, (500 %-al), míg a dopamin csak 50-60 %-al növeli meg a cAMP koncentrációját. A szerotonin és a dopamin együttes hatásának vizsgálata azt mutatta, hogy a dopamin a szerotonin receptoron keresztül okozza a minimális stimulációt, és jelentősen képes a szerotonin hatását gátolni. Ezek az eredmények igazolják, hogy a szerotoninnak adenil ciklázhoz kapcsolt receptora van a talp izomban és szívizomban, a dopamin azonban csak modulátor szereppel bír. Az aktív szövetekben cAMP in vivo koncentrációja 60-70 %-al magasabb volt mint az inaktív szövetekben. Ha szerotonint injektáltunk inaktív csigába, növelte a szív és a talpizomban a cAMP koncentrációját és aktiválta az állatot. Ha a szerotonint dopaminnal együtt injektáltuk mérsékelte a cAMP koncentráció növekedését és késleltette az szerotonin okozta aktiválását az állatnak. A puhatestűek izomszöveteinek SCP_B peptid transzmitter által okozott serkentése (Reich és mtsai, 1997) csiga szív és talpizom szövetében is bekövetkezett. A peptid receptora a szerotoninhoz hasonlóan adenil ciklázhoz kapcsolt, a SCP_B koncentrációtól függő mértékben stimulálta az adenil cikláz aktivitását, növelte a szövet cAMP koncentrációját. A következő lépésben vizsgáltuk, hogy a cAMP regulált Protein Kináz A jelen van e és milyen proteineket foszforilál a szív és talpizomban.



Monoamine concentrations and 5HT/DA ratios in the different tissues of inactive and active animals



Effect of monoamines on the cAMP concentration in the foot slices

Az izolált szív szövetet és a talpizom szeleteket először ^{32}P -ortofoszfáttal telítettük, majd 5HT-t, 8-bromo-cAMP, SCP_B -t, 8-bromo-cAMP-el együtt Protein KinázA inhibitorot adtunk és a szöveteket szobahőn inkubáltuk. Az inkubáció végén a szöveteket homogenizáltuk és a fehérjéket PAGE módszerrel elválasztottuk. Az elválasztás után a fehérje sávokat kimetszettük, oldottuk, és radioaktivitásukat meghatároztuk. A szívizomban egy 50-55 kDa körüli sáv radioaktivitása az 5HT, cAMP, SCP_B és cAMP+Inh. mintákban a kontrollnak 39,9, 48,4, 40,8 és 3,2 szerese volt. A talpizomban az cAMP, 5HT és SCP_B hatására az 50-55 kDa fehérjébe 5,1; 5,8; és 2,5 szer több volt a beépült foszfor. A talpizomban találtunk egy nagy molekulású (kb 600 kDa) fehérjét is melybe a foszfor beépülése cAMP, 5HT és SCP_B esetében a kontrollhoz képest 17,7; 19,9; és 2,1-szeres volt. A talpizomban a 600 kDa-os fehérje azonos azzal a fehérjével melyet *Mytilus* záróizában is kimutattak (Siegman, 1997), amikor a szerotonin hatására a „catch” izma relaxálódik. E 600 kDa-os fehérje foszforilált – defoszforilált állapotától függ az izom kontrahált-relaxált állapota. *Helix* talpizomban a tartós kontrakciós/relaxációs állapotért ugyanez a 600 kDa-os fehérje foszforilációja/defoszforilációja a felelős. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a szerotonin és a SCP_B a receptoraikhoz kapcsolt adenil cikláz stimulációját követően növelték a cAMP szintet. E lépéstől kezdődően a kapcsolt mechanizmusok, ugyanazok, aminek következtében a cAMP stimulált Protein KinázA egy 50-55 kDa-os fehérjét expresszál. Az 50-55 kDa fehérje azonosítása céljából további vizsgálatokat végeztünk. Irodalmi adatok szerint az aromás aminosav dekarboxiláz enzim egy 55 kDa-os fehérje (Duchemin, 2000). Kísérleteinkben az általunk talált kb.50-55 kDa fehérjéről próbáltuk igazolni, hogy nem más mint a szerotonin szintézisben is részt vevő dekarboxiláz enzim. A PAGE-SDS gél elválasztás majd blottolás és anti-dekarboxiláz immunfestés során a kb 50-55 kDa-os fehérje sáv pozitív reakciót adott az 5HT-vel, cAMP-vel és a SCP_B -vel inkubált minták esetén. Indirekt kísérletek során igazoltuk, hogy a fehérje nem más, mint a dekarboxiláz enzim. A szívizmot forskolinnal (10 μM) illetve 100 μM SCP_B -vel inkubáltuk majd a szövetet homogenizáltuk és a szerotonin szintet HPLC-vel mértük. A forskolin 80 %-os, míg a SCP_B 57 %-os szerotonin szintnövekedést okozott. Közvetett kísérletek során a szívizomból foszforilációs pufferrel homogenizátumot készítettünk és 200 Unit PKA katalitikus alegységével inkubáltuk. 20 perc inkubálást követően az inkubációs elegyet dekarboxiláz pufferrel elegyítettük, mely tartalmazta a dekarboxiláz enzim kofaktorát és az 5HTP szubsztrátot és tovább inkubáltuk. Az inkubáció végén az elegyhez 0,1 M végkoncentrációban HClO_4 -t adtunk, majd centrifugálás után a felülülészó aliquotját HPLC-vel szerotoninra vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a kontrollhoz képest az 5HT koncentráció növekedése 37 %-os.

Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy csiga talp és szívizmában a serkentő peptid és a szerotonin hatására dekarboxiláz enzim expresszálódik, ami a szerotonin szintézist növeli. Ezen érdekes mechanizmusra valószínűleg azért van szükség, mert az idegrendszer nem képes az izom számára biztosítani azt a mennyiségű szerotonint melyre az izomnak szüksége van. Az idegrendszer 10 mg, 5HT tartalma 40 pmol/mg, azaz 400 pmol/ganglion. A talp súly kb. 6 g, 5HT megnövekedett mennyisége aktivitásban 10 pmol/mg, $6000 \times 10 = 60000$ pmol/talpiom. Ezt a mennyiségű szerotonint a 10 mg-os idegrendszer nem képes biztosítani. Aktivításban az idegrendszerből a talpiomba transportálódott 5HT ott dekarboxiláz enzimet expresszál amely szintézis révén biztosítani tudja az aktivitásban szükséges 5HT mennyiséget.

Megkíséreltük azonosítani a talpiom szerotonin receptor típusát. A talpiom receptor típusa nem azonos az idegrendszerben talált szerotonin receptor típusal. Idegrendszerben az ^3H -5HT csak alacsony affinitással ($K_d = 473$ nM), míg talpiomban nagy affinitással ($K_d = 3.05$ nM, $B_{\max} = 52.4$ fmol/mg) kötődik. Mindkét szövetben a szerotonin receptor pozitívan kapcsolt az adenil cikláshoz. Míg azonban az idegrendszerben a szerotonin hatást az LSD, Butaclamol, Ergotamin és Flupenthixol 0,01 μM – 0,1 μM koncentrációban 50 %-os mértékben gátolják, addig a talpiomban az 5HT stimulált adenil cikláz 50 %-os gátlásához ezen anyagok 10 μM -nál nagyobb koncentrációja szükséges. Talpiomban az adenil cikláz serkentését elsősorban az 5HT, 8OHDPAT, 5CT és az 5-Methoxytryptamine az alábbi hatásossági sorrendben serkenti: $5\text{HT} \gg 8\text{OHDPAT} = 5\text{CT} > 5\text{-Metoxitriptamin}$. Az antagonisták hatásossági sorrendje a következő: $\text{SB258585} = \text{Br-LSD} > \text{clozapine} > \text{Methysergide}$. A leszorításos kísérletek azt mutatták, hogy az agonisták közül a szerotoninon kívül a 8OHDPAT, 5CT, 5-Metoxitriptamin affinitása a receptorhoz alacsony. Az antagonisták közül az SB258585 és a BOL nagy affinitással rendelkeznek a receptor felé, míg a Clozapin affinitása ettől lényegesen kisebb és alacsony a methysergid affinitása. A receptor farmakológiai tulajdonságát tekintve arra következtetünk hogy a talpiom receptora hasonló a gerincesekben leírt 5HT₆ receptorhoz, vagy azzal azonos.

Az oktopamin receptor jellemzés *Locusta migratoria* és *Lymnaea stagnalis* idegrendszerében.

Az OTKA kutatási periódust megelőző években ^3H -oktopamin nagy affinitású kötődésének vizsgálatával vándorsáska idegrendszerében (optikus lebeny) és *Lymnaea* idegrendszerben oktopamin receptort azonosítottunk. Az oktopamin kötődést a különböző farmakonok az alábbiak szerint gátolták (K_i , nM). Nafazolin (1,5), Demetilklórdimeform (7,9), Octopamin

(9,9), Sinefrin (10,1), Mianserin (10,4), Fentolamin (), Gramin (), Yohimbine (78450). Ezt követően a jelzett Oktopamint már nem lehetett vásárolni csak külön rendelésre, így a klonolt oktopamin receptort már ^3H -jelzett Yohimbin, vagy az ^3H - α -Yohimbin kötődésével vizsgálták. Az eredmények érdekessége az, hogy e ligandok nM-os kötődését az oktopamin csak 40 mM-os koncentrációban képes gátolni. Ha mind az oktopamin, mind a yohimbin ugyanazon oktopamin receptor helyhez kötődik, akkor ez lehetetlen annál is inkább, mert az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a yohimbin csak μM -os koncentrációban képes az oktopamint leszorítani. A korábbi vizsgálatok során igazoltuk, hogy az oktopamin reverzibilis módon kötődik a receptorhoz és a hideg oktopamin hatására a jelzett oktopamin ledisszociál a receptorról. Jelen project keretében vizsgáltuk a ^3H -yohimbin vagy a ^3H - α -yohimbin disszociációját rovar és csiga oktopamin receptoráról illetve patkány agy adrenerg receptoráról. A yohimbin nem disszociál sem a rovar, sem a csiga idegrendszerének oktopamin receptoráról, de disszociál a patkány agy adrenerg receptoráról. E ligandok így alkalmatlanok az oktopamin receptor vizsgálatára és azért adódtak saját kísérleteinkben is olyan eredmények, hogy a nM-os kötött ^3H -yohimbin kismértékű gátlása is csak mM-os koncentrációjú agonistákkal lehetséges.

Az eredmények az alábbi közleményekben jelentek meg vagy fognak megjelenni:

Hernádi L, Vehovszky A, Győri J, Hiripi L: Neuronal background of activation of estivated snails, with special attention to the monoaminergic system: a biochemical, physiological, and neuroanatomical study. *Ceol Tissue Res* 331, 539-553, 2008.

Hernádi L, Kárpáti L, Győri J, Vehovszky Á, Hiripi L: Humoral serotonin and dopamine modulate the feeding in the snail *Helix pomatia*. *Acta Biol.Hung.* (2008) Megjelenés alatt

Hernádi L, Hiripi L, Győri J, Szabó H, Vehovszky Á: The terrestrial snail *Helix pomatia* adapts to environmental conditions by the modulation of central arousal. *Acta Biol.Hung.* (2008) Megjelenés alatt

Hiripi L, Pirger Zs, Kiss T, Elekes K: Adenyl cyclase coupled 5HT₆ like receptor regulate the cAMP controlled protei kinaze-A and the activity of the snail *Helix pomatia*. Kézirat.

Hernádi L, Hiripi L, Győri J, Vehovszky Á: The elicited arousals during food ingestion are associated with changes infiring activity of different serotonergic neuron as well as in serotonin and dopamine levels in the snail, *Helix pomatia* Kézirat

Hiripi L, Vehovszky Á., Elliott C.J.H.: Pharmacological properies of octopamine receptor in locust and snail. *Insect Biochem. Mol.Biol.* Folyóiratnak elküldve.

Az eredményekből 2004-2007 években 7 hazai kongresszuson és 8 nemzetközi kongresszuson hangzottak el előadások.

Irodalom

- Prudnikov IM, Tsyvkin VN: Membranes with dopamine receptors coupled to G proteins: Purification from Lymnaea central nervous system. *Neurophysiology*, 30, 32-38, 1998.
- Drummond AH, Bucher F, Levitan IB: d-[³H]Lysergic Acid Diethylamide binding to serotonin receptors in the molluscan nervous system. *J.Biol.Chem.* 255,6679-6686, 1980.
- Werkman TR, Schepens E, DE Vlioger TA, Stoof JC: Cyclic AMP production in the central nervous system of the snail Lymnaea stagnalis is stimulated by forskolin and 5-hydroxytryptamine but is not affected by dopamine. *Comp.Biochem.Physiol.*95C, 163-168,1990.
- Sugamori KS, Sunahara RK, Guan HC, Bulloch AGM, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HHM: Serotonin receptor cDNA cloned from Lymnaea stagnalis. *Proc.Natl. Acad.* 90, 11-15,1993.
- Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E, Heerikhuizen HV: Functional characterization of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from Lymnaea stagnalis. *Eur.J.Pharmacol.* 311,249-258,1996.
- Vehovszky Á, Walker RJ: An analysis of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor subtypes of central neurons of Helix aspersa. *Comp.Biochem.Physiol.*100C,463-476. 1991.
- Walcourt-Ambakederemo A, Winlow W: 5-HT receptors on identified Lymnaea neurones in culture. Pharmacological characterization of 5-HT_{1A} receptors. *Comp. Biochem. Physiol.* 107C, 129-141,1994.
- Walcourt-Ambakederemo A, Winlow W: 5-HT receptors on identified Lymnaea neurones in culture. Pharmacological characterization of 5-HT₂ receptors. *Gen.Pharmac.* 25, 1079-1092, 1994.
- Walcourt-Ambakederemo A, Winlow W: 5-HT receptors on identified Lymnaea neurones in culture. Pharmacological characterization of 5-HT₃ receptors. *Gen.Pharmac.* 26, 553-561, 1995.

- Tierney AJ: Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review: *Comp.Biochem.Physio.* 128A,791-804,2001.
- Stoof JC, DE Vlieger TA, Lodder JC: Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in regulating the excitability of growth hormone-producing cells in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Eur.J.Pharmacol.* 106,431-435,1984.
- Werkman TR, Lodder JC, DE Vlieger TA, Stoof JC: Further pharmacological characterization of a D-2-like dopamine receptor on growth hormone producing cells in *Lymnaea stagnalis* *Eur.J.Pharmacology*,139,155-161,1987.
- Duchem AM, Berry MD, Neff NH, Hadjiconstantinou M: Phosphorylation and activation of brain aromatic L-amino acid decarboxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J.Neurochem.*, 75, 725-731,2000.
- Brooks SPJ, Storey KB: Protein phosphorylation patterns during aestivation in the land snail *Octala lactea*. *Mol. Cell. Biochemistry* 143, 7-13,1995.
- Reich G, Doble KE, Greenberg MJ: Protein Phosphorylation in snail cardiocytes stimulated with molluscan peptide SCP_b. *Peptides*, 18, 1311-1314, 1997.
- Siegman MJ, Mooers SU, Li C, Narayan S, Mulcahy LT, Watabe S, Hartshorne DJ, Butler TM: Phosphorylation of a high molecular weight (~600 kDa) protein regulates catch in invertebrate smooth muscle.

OTKA közlemények:

Hernádi L, Vehovszky A, Győri J, Hiripi L:

Neuronal background of activation of estival, ated snails, with special attention to the monoaminergic system: a biochemical, physiological, and neuroanatomical study.

Ceell Tissue Res 331, 539-553,

2008.

IF 2,383

Igen

Filla A;Hiripi L; Elekes K

Possible role of aminergic system in the development and behavior of embryos of the pond snail *Lymnaea stagnalis*

J.Neurochem 94,172

2005

IF 4.6

igen

Vehovszky Á, Szabón H, Hiripi L, Elliott CJH, Hernádi L:

Behavioural and neural deficits induced by rotenone in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. A possible model for Parkinson's disease in an invertebrate.

Eur.J Neurosci. 25, 2123-2130

2007.

IF 3,949

Igen

Hernádi L, Kárpáti L, Győri J, Vehovszky Á, Hiripi L

Humoral serotonin and dopamine modulate the feeding in the snail *Helix pomatia*.

Acta Biol.Hung. 59 Supplement

2008

IF 0,688

Igen

Hernádi L, Hiripi L, Győri J, Szabó H, Vehovszky Á

The terrestrial snail *Helix pomatia* adapts to environmental conditions by the modulation of central arousal.

Acta Biol.Hung. 59 Supplement

2008

IF 0,688

Igen

Filla A, Hiripi L, Elekes K:

Serotonergic and dopaminergic influence of the duration embryogenesis and intracapsular locomotion of *Lymnaea stagnalis* L.

Acta Biol.Hung. 55, 315-321

2004.

IF:0,688

Igen

Hiripi L, Vehovszky Á., Elliott C.J.H.

Pharmacological properties of octopamine receptor in locust and snail.

Insect Biochem. Mol.Biol. (Közlésre elküldve)

2008

IF

igen

Hiripi L, Elekes K:

Characterization of transmitter (acetylcholine, serotonin and dopamine) receptors in the CNS of the pond snail *Lymnaea stagnalis* L.

Kézirat

2008

IF

igen

Hiripi L, Pirger Zs, Kiss T, Elekes K

Adenyl cyclase coupled 5HT6 like receptor regulate the cAMP controlled protei kinaze-A and the activity of the snail *Helix pomatia*.

Kézirat.

2008

IF

igen

Fille A, Hiripi L, Elekes K:

Role of aminergic (serotonin and dopamine) systems in the embryogenesis and different embryonic behaviors of pond snail, *Lymnaea stagnalis*.

Kézirat

2008

IF

igen

Hernádi L, Hiripi L, Győri J, Vehovszky Á:

The elicited arousals during food ingestion are associated with changes infiring activity of different serotonergic neuron as well as in serotonin and dopamine levels in the snail, *Helix pomatia*

Kézirat

2008

IF

igen