

József Attila Tudományegyetem

ÁLLATTANI TANSZÉK

Gábrriel Róbert

A MYENTERIKUS PLEXUS ÉS A NEUROMUSZKULÁRIS KAPCSOLAT
MORFOLÓGIÁJA BÉKA TÁPCSATORNÁBAN

Egyetemi doktori értekezés

Témavezető: Dr. Benedeczky István
tanszékvezető egyetemi tanár

Szeged, 1988.



Az értekezés vázlatja

- I. Bevezetés. Irodalmi áttekintés 5
- II. Célkitűzések 16
- III. A vizsgálati anyag és a kísérleti módszerek 17
 - 1. A vizsgálati módszerek
 - a. Hematoxilin-eozin festés
 - b. Ezüstimpregnáció
 - c. NBT/NADH diaforáz enzimhisztokémiai technika
 - d. AChE hisztokémia
 - e. Konszekutív NADHd-AChEE hisztokémia
 - f. A biogén monoaminok hisztokémiája
 - g. Transzmissziós elektronmikroszkópia
 - α . Fixálás perfuzióval
 - β . Fixálás immerzióval
- IV. Eredmények 23
 - a. Hematoxilin-eozin festés
 - 1. Nyelőcső
 - 2. Gyomor
 - 3. Patkóbél
 - 4. Vékonybél
 - 5. Utóbél
 - b. Ezüstimpregnáció 26
 - 1. Nyelőcső
 - 2. Gyomor
 - 3. Patkóbél

4. Vékonybél
 5. Utóbél
- c. NBT/NADHd hisztokémia 28
1. Nyelőcső
 2. Gyomor
 3. Patkóbél
 4. Vékonybél
 5. Utóbél
- d. AChE hisztokémia 31
1. Előbél
 2. Középbél
 3. Utóbél
- e. Kettős NADHd- AChE hisztokémia 34
- f. A glioxálsav-indukált fluoreszcencia vizsgálata: a monoamin transzmitterek lokalizálása 35
1. Előbél
 2. Középbél
 3. Utóbél 36
- g. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei a 8. dlna utólj, 37
1. Nyelőcső
 2. Gyomor
 - α . A gyomor muscularis mucosae rétege
 - β . A tunica muscularis 40
 3. Patkóbél 43 (a 16. dlna utólj)
 4. Vékonybél
 5. Utóbél

V. Az eredmények megbeszélése ⁴⁷

a. Metodikai észrevételek ⁴⁸ (a 23. oldal után)

1. Hisztokémiai technikák

α . Ezüstimpregnáció

β . NBT/NADHd hisztokémia

γ . AChE hisztokémia

δ . Kettős NBT/NADHd-AChE hisztokémia

ϵ . GIF a monoaminok kimutatására

2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok ⁵²

b. Az egyes bélszakaszokra vonatkozó eredmények értékelése ⁵²

1. Nyelőcső

2. Gyomor

3. Patkóbél ⁶⁰

4. Vékonybél

5. Utóbél ⁶⁶

c. A tápcsatorna myenterikus plexusának egészére vonatkozó sajátosságok összehasonlító összefoglalása ⁶⁸

1. A myenterikus plexus egészének morfológiájára vonatkozó észrevételek

2. Sejttípusok a myenterikus plexusban

3. A lehetséges transzmitterek ⁷¹ (am \neq)

4. A hisztokémiai sajátosságok évszakos változása

5. A transzmitter ürítés mechanizmusa ⁷⁴

6. A béka tápcsatorna myenterikus plexusa fejlett-

ségének törzsfejlődéstani összehasonlító értékelése ⁷⁶

VI. Összefoglalás

83

VII. Köszönetnyilvánítások

VIII. Táblázatok

IX. Irodalomjegyzék

Bevezetés, irodalmi áttekintés

A tápcsatorna szerkezetének és beidegzésének törzsfejlődéstani vizsgálata már a múlt század utolsó évtizedében Dogiel (1896, 1899) és Botazzi (1899) két alapvető közleményével elkezdődött. Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a mai tudományos érdeklődés talán kissé méltánytalanul elhanyagolja ezt a területet.

A JATE Állattani Tanszékén évek óta folynak összehasonlító vizsgálatok a gerinctelen és a gerinces állatok bélidegrendszerére vonatkozóan (Benedeczky és Miller 1983; Csoknya és Benedeczky 1986; Fekete 1984; Gábriel és mtsai 1987; Halasy és mtsai 1983; Halasy és mtsai 1988). A törzsfejlődésbeli összehasonlítás megkívánta, hogy a gerinctelen objektumok (földi giliszta, éti csiga, vándorsáska, csótány) után a gerincesek vizsgálatát is megkezdjük.

Az irodalom tanulmányozása során arra figyeltünk fel, hogy a század elején végzett vizsgálatok (Cajal 1902; Dixon 1902; Langley 1921) főleg az alacsonyabbrendű gerincesekre - elsősorban a békákra - vonatkoztak, majd a továbbiakban a figyelem a madarak és az emlősök bélidegrendszerére terelődött. Az emlős bélcsatornán Irwin (1931) végzett először morfometriai vizsgálatokat és metilénkékkal próbálta meghatározni a területegységre jutó neuronok számát. Tengeri malac különböző bélszakaszain, az 1 cm^2 -re jutó neuronok számát 1300 és 20000 közöttinek találta. Okhubo (1936a, b) ugyanezen

festési eljárással végzett vizsgálatokat majmok bélcsatornáján: 1100 és 3500 közé teszi a neurondenzitást a különböző bélszakaszokon. Miután mind a két vizsgálat emlősökön történt, feltűnő a nagy neurondenzitásbeli különbség. Ez sarkallhatta Filogamot és Vigulianit (1954) arra, hogy más módszerrel, nevezetesen paraffinos metszetben tioninnal fesse meg a neuronokat. E módszerrel átlagosan 7786 neuront sikerült kimutatni cm^2 -enként. A macska myenterikus plexusát Leaming és Cauna (1961) vizsgálta a Cauna (1959) által módosított Bielschowsky-Gros féle ezüstimpregnációs technikával. Itt $12170 \text{ neuron/cm}^2$ volt az eredmény. Újabban Gabella (1971) az általa kidolgozott NBT/NADH diaforáz módszer segítségével 9405 neuront számlált a patkány bélben.

A myenterikus plexus finomszerkezetének megismerése csak az elektronmikroszkópos eljárások kifejlesztése után vált lehetségessé. Ennek segítségével az idegelemek és az izomzat kapcsolata részleteiben is feltárhatóvá vált. Az ideg-simaizom kapcsolat ultrastruktúráját leíró első közlemény Richardsontól (1958) származik, aki a bélcsatorna simaizomzatát vizsgálva megállapította, hogy nincs szinaptikus specializáció az idegvégződés és az általa beidegzett simaizomsejt között. Felvetette továbbá azt is, hogy az egyes simaizomsejtek esetleg nem egyedi beidegzést kapnak, hanem több izomsejt együttesen kollektív beidegzésben részesül. Burnstock (1970) volt az, aki megállapította, hogy beidegzés szempontjából a simaizmot tartalmazó szervek két csoportba oszthatók. Az

egyik csoportba azok a szervek tartoznak, amelyek a simaizomsejteket rostszerű nyálábokba tömörítve tartalmazzák; itt a beidegzés minden egyes rostszerű képlethez (illetve a m. sphincter pupillae esetében minden egyes sejthez) egyedileg érkezik, így az ingerületáttevődés mechanizmusa hasonlatos az ideg vázizom kapcsolat motoros véglemezőn lejátszódó folyamatokhoz. A másik csoportba azok a simaizmot tartalmazó szervek tartoznak (és ebben a csoportban kapott helyet a bélcsatorna is), ahol a mezőszerűen elhelyezkedő, hálózatos jellegű simaizomsejtek multiaxonális kollektív beidegzést kapnak; ez az innerváció jobban hasonlít egy neurohumorális, mintegy valódi neuromuszkuláris kapcsolathoz (Burnstock, 1970).

Gabella (1979) összefoglaló közleményében részletesen elemzi az enterikus neuronok közötti lehetséges kapcsolatokat, tárgyalja az emlős bél extrinsic beidegzését, valamint ismerteti a bélplexusokban helyet foglaló nem-neuronális elemeket is. Burnstock újabb (1986) közleményében a jövő kutatási módszereit próbálta körvonalazni az organotipikus kultúrákban nyert eredményeivel. Ezzel kapcsolatban azonban nem szabad elfeledkeznünk arról, hogy in vitro körülmények között a bélcsatorna myenterikus plexusa elveszti extrinsic kapcsolatait, és ezért belső szinaptikus organizációja valószínűleg nagymértékben átalakul; a neuromuszkuláris kapcsolat még nem ismert fiziológiai és farmakológiai sajátosságai ebben a rendszerben azonban jól és zavaró körülményektől (kö-tőszövet, esetleg a plexus submucosus elemeinek a hatása)

mentesen vizsgálható.

Mindezen metodikai és tudásbeli fejlődés ellenére a gerinctelen állatok és az alacsonyabbrendű gerincesek tápcsatornájának beidegzésére vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésünkre, bár az utóbbi években a gerinctelenekkel több szerző is foglalkozott. Az éti csiga (Ábrahám 1983; Fekete, Halasy és Benedeczky 1983; Nemcsók és mtsai 1986; Vig és mtsai 1985) és a csótány, illetve a vándorsáska (Anderson és Cochrane 1977; Benedeczky és Miller 1983; Eckert és mtsai 1981) bélcsatornájának innervációjával kapcsolatosan a közelmúltban is jelentek meg tanulmányok. E témában a halakról az utóbbi években kevés közlemény jelent meg (Halasy és Benedeczky 1985, 1986; Salimova és Fehér 1982; Watson 1979).

Mindössze egy új adatot találtunk a béka bél beidegzésére vonatkozóan (Anderson és Campbell 1984), így a tápcsatorna beidegzésére vonatkozó eddigi irodalom (Aikawa 1931; Boyd és mtsai 1964; Burnstock 1970; Burnstock és mtsai 1972; Dixon 1902; Gunn 1951; Rashid 1972; Read és Burnstock 1968; 1969; Rogers és Burnstock 1966; Singh 1963, 1964; Yuh 1931; Vorobiev 1966; Wong 1973; Wong és mtsai 1971) korántsem tekinthető lezártnak.

A felsorolt tanulmányok többnyire csak a bélcsatorna egy részének, elsősorban a gyomornak a beidegzésével foglalkoznak (Aikawa 1931; Dixon 1902; Rashid 1972; Singh 1963; Wong 1973; Yuh 1931).

A béka tápcsatornájának beidegzését először Botazzi vizsgálta (1899), aki a vagus és a szimpatikus idegek ingerlésének hatását tanulmányozta. A varangy nyelőcsövének vizsgálata-

kor megállapította, hogy a vagus rostjai a nyelőcső perisztaltikáját serkentik, míg a szimpatikus rostok ingerlése ellenkező hatást vált ki. Dixon (1902) morfológiailag azonosította a gyomor intrinsic plexusát. Cajal - aki elsősorban a központi idegrendszeren végzett kutatásai alapján vált híressé - a középbél idegrostjait vizsgálva megállapította, hogy a középbél plexusa lényegesen fejletlenebb, mint az előbélé (Cajal 1902). Később Aikawa (1931) és Yuh (1931) a kecskebéka gyomrának extrinsic innervációját tanulmányozták fiziológiai módszerekkel, és megállapították, hogy a vagus elektromos ingerlése igen erős hatással van a gyomor perisztaltikájára. A következő jelentős mérföldkő Gunn (1951) munkája volt, aki megállapította, hogy a bélplexusok közül csak a myenterikus plexus tartalmaz neuronokat: a plexus submucosus csak idegrostokból áll: a rostok fő forrásaként szerző a myenterikus plexusból az izomrétegen áthatoló idegkötegeket nevezte meg. Az 1960-as években lezajlott fiziológiai vizsgálatok (Singh 1963) bizonyították, hogy a béka esetében a vagushoz szimpatikus rostok is csatlakoznak. Ugyancsak e szerző munkájából tudjuk, hogy a neurotranszmitterek valószínűleg évszakonként eltérő arányban vannak jelen a vagus-gyomorizomzat preparátumokban: mérési adatai azt mutatták, hogy az egyébként téli nyugalmi állapotban lévő békák bélizomzata a vagus stimulációjával erőteljesebb működésre készíthető, mint más évszakokban. Az 1960-as évek egyéb, témánk szempontjából jelentős eredményei az elektronmikroszkópos technika fejlődésének köszönhetőek. Boyd és mtsai (1964) az utóbél, míg Rogers és Burnstock (1966)



Emy

a vékonybél beidegzését vizsgálták. Megállapították, hogy a multiaxonális innerváció jellemző a béka bél izomzatára. A terminálisok vezikulatípusait azonosították ugyan, de nem tettek kísérletet az egyes axonok eredetének megállapítására.

Tudomásunk szerint nincs adat a nyelőcső és gyomor, valamint a patkóbél beidegzésére vonatkozóan, ezért munkánk során e bélszakaszok ilyen irányú vizsgálatára különösen nagy súlyt fektettünk.

A hisztokémiai technikák fejlődése következtében ezután (1960-as évek) az érdeklődés transzmitteranyagok azonosítására irányult. Ez a kérdéskör a bélidegrendszer (és általában az idegrendszer) neurobiológiai vizsgálata során ma is az egyik legfontosabb problémakör. A bélidegrendszer esetében igen fontos annak ismerete, hogy az intrinsic neuronokban és az extrinsic rostokban milyen transzmitter ill. modulátor anyagok vannak jelen. A korábban idézett (főleg fiziológiai) vizsgálatokból tudjuk, hogy a "klasszikus" autonóm idegrendszeri transzmitterek, a kateholaminok és az acetilkolin természetesen a béka esetében is vezető szerepet játszanak a bélidegrendszeri folyamatokban. A kateholaminokat hisztokémiai módszerrel először Falck és mtsai (1962) mutatták ki formaldehidgőz indukálta fluoreszcencia segítségével. Ennél lényegesen kényelmesebb és egyszerűbb módszer ezen anyagok kimutatására a glioxálsav-indukálta fluoreszcenciás technika. Ezt a módszert Björklund és mtsai (1972) írták le először. E technika hátránya az, hogy csak nehezen különíthető el a kateholaminok és a szerotonin okozta fluoreszcencia, mégis széles

TR

körben használatos ez a módszer az aminerg rostok és sejtek kimutatására.

Az acetilkolin, mint ingerület átvivőanyag már a múlt században is ismeretes volt. Direkt kimutatása azonban a szöveti környezetben még ma sem teljesen megoldott. Ezért vagy szintetizáló vagy lebontó enzimének jelenlétéből következtethetünk csak lokalizációjára. A lebontó enzim, az acetilkolinészteráz (AChE) kimutatását először Koelle és Friedenwald oldotta meg (1949). E technika azonban a pseudokolinészterázok jelenlétében is pozitív eredményt adott, tehát nem volt elég specifikus. Az acetilkolinészteráz specifikus kimutatását végülis Koelle végezte el (1954), mégpedig a patkány központi idegrendszerében. Elektronmikroszkópos szinten többnyire Karnovsky és Roots (1964) eljárása használatos, ami a végtermék lokalizációjának lényegesen finomabb felbontását adja, mint a fénymikroszkóp.

A béka bélcsatorna transzmittereinek azonosítására, ill. lokalizálására is történtek kísérletek. Az előbél neuronális elemeinek transzmittertartalmára vonatkozóan alig néhány közlemény jelent meg (Rashid 1972, Wong 1973). Ezek az AChE lokalizációjával foglalkoznak. Ez a módszer rendkívül jól mutatja a plexus morfológiáját és információt nyújt azon idegvégződések és sejtes elemek helyéről, amelyek fogadnak vagy küldenek kolinerg rostokat. A vékony- és vastagbél transzmittereivel kapcsolatos leírások már némileg nagyobb számban találhatóak meg az irodalomban, ezen adatok azonban korántsem kielégítőek. Read és Burnstock (1968, 1969) két összehasonlító tanulmányban vizsgálták a gerincesek közép-

és utóbelének aminerg beidegzését. E közleményeikben megállapítják, hogy az alacsonyabbrendű gerincesek (halak és kétéltűek) vékony- és vastagbelének aminerg innervációja morfológiai értelemben szegényes, ezért szükségszerűen léteznie kell egy olyan jellegű beidegzésnek is, amely funkcionálisan mintegy "kiszegíti" a csaknem hiányzó aminerg rendszert. Későbbi tanulmányaikban Burnstock és mtsai (1972) valamint Sneddon és mtsai (1973) azonosítani vélik e rendszer transzmitterét, az ATP-t, de a purinerg idegelemek pontos lokalizációjáról nem esik szó. Újabban Anderson és Campbell (1984) immunhisztokémiai módszerrel megállapították, hogy a varangyok középbelének myenterikus plexusa tartalmaz - bár kis számban - szerotoninerg neuronokat. A fent említett aminerg, kolinerg és purinerg rendszereken kívül újabban nagy jelentőséget tulajdonítanak a peptiderg rendszereknek is. A magasabbrendű gerincesek bélcsatornájában kimutatott úgynevezett gastrointesztinális peptidok száma ma már megközelíti a huszat. Ezek legfontosabb képviselői (neuropeptid Y, szomatosztatin, enkefalinok, P-anyag, vazoaktív intesztinális polipeptid, galanin, kolecisztokinin, YY peptid, pankreatikus polipeptid, gastrin-kibocsátó peptid) esetében tisztázták, hogy többnyire a klasszikus autonóm idegrendszeri transzmitterekkel együtt fordulnak elő az intrinsic neuronokban és az extrinsic rostokban egyaránt. (Ekblad és mtsai 1987; Schulzberg és mtsai 1980; Sundler és mtsai 1983). Fiziológiai vizsgálatokkal sikerült tisztázni, hogy egyes neuropeptidok

jelenlétéből vagy hiányából funkcionális következtetéseket vonhatunk le a kolinerg enterikus neuronok vonatkozásában: amíg a szomatosztatin tartalmú kolinerg neuronok gyors excitatorikus posztszinaptikus potenciált váltanak ki a posztszinaptikus membránon, addig a vazoaktív intesztinális polipeptid tartalmúak ugyanezt a hatást hosszú latencia után érik el a velük kapcsolatban álló neuronok membránján. (Willard és Nishi 1987). Ugyanakkor Scheuermann és mtsai (1987) megállapították, hogy a sertés bél myenterikus plexusának mindig csak a II-es típusú sejtjei tartalmaznak calcitonin gén kapcsolt peptidet (CGRP). Ennek a biokémiai specificitásnak funkcionális következménye azonban még nem ismert. Folyik a P-anyag helyének keresése is a bélperisztaltika egész mechanizmusában, ám ezen peptid atropin rezisztens kontrakciót kiváltó hatásának magyarázatára mind a mai napig csak elméleteket ismerünk, kísérletes bizonyítékok nélkül (Barthó és Holzer 1985). Az viszont bizonyos, hogy ezt az anyagot a halak bélcsatornájából is kimutatták (Jensen és mtsai 1987). További előrelépést jelenthetne a béka tápcsatorna myenterikus plexusának vizsgálata terén, ha a peptid transzmitterek és modulátorok kimutatására alkalmas immunhisztokémiai módszerekkel bővíthetnénk a módszertani fegyvertárat, mert egyáltalán semmit nem tudunk sem az elő-, sem a közép-, sem az utóbél vonatkozásában arról, hogy vannak-e peptid transzmitterek akár önmagukban, akár koexistenciában jelen a myenterikus plexus neuronjaiban, illetve az extrinsic eredetű rostokban. Továbbá az sem világos, hogy

a myenterikus plexus ganglionsejtjei valamint szoliter neuronjai milyen kapcsolatban állnak egymással, mivel Vorobiev (1966) közleménye óta - ami csak azt tisztázza, hogy a ganglionok mind orálisan , mind anális irányban kölcsönös kapcsolatban állnak egymással - nem jelent meg egyéb közlés.

Az emlős bélcsatorna myenterikus plexusának sajátosságai ez utóbbi két tekintetben viszonylag jól tisztázottak (Ekblad és mtsai 1987).

Újabb lehetőség az előrelépésre a béka bél myenterikus plexusának kutatása terén a neuronális nyomjelzők alkalmazása lenne. Erre még nincs példa az irodalomban, bár kobalt jelöléssel - melyet Pitman és mtsai (1972) vezettek be - japán kutatók (Oka és mtsai 1987) az autonóm idegrendszert ellátó preganglionáris vagus-neuronokat képesek voltak jelölni. Munkájuk során a Görcs és mtsai (1979) által bevezetett kobalt-lizin technikát alkalmazták. Anterográd - tehát a bélcsatorna felé irányuló - jelzőanyag transzport után nyert eredményekről nincs tudomásom.

Egy másik elméleti lehetőség a fluoreszcens jelzőanyagok felhasználása. Különösen előnyös módszertani lehetőség áll rendelkezésre néhány laboratóriumban e téren, mert fixált anyagon is használható nyomkövető rendszert hoztak létre (Peichl és Wässle, (1981). Mivel azonban a béka bél neuronjai meglehetősen kicsik, technikai nehézségekkel találkozhatják magukat szembe azok a kutatók, akik bélneuronok töltésére vállalkoznak.

Egy meglehetősen szembetűnő hiányosság a békák bélbeidegésével kapcsolatos irodalomban, hogy nem áll rendelkezésre adat a bélcsatorna különböző szakaszainak neurondenzitására vonatkozóan. Mivel a korábban az e vizsgálatokhoz alkalmazott módszerekkel nyert adatok meglehetősen nagy szórást mutattak, a hiányzó adatok megszerzésére célszerű egy modernebb, megbízhatóbb technikát alkalmazni.

A nikotinamid-adenindinukleotid-diaforáz (NADHd) hisztokémiai technikát Gabella (1969) vezette be a bélideg rendszer vizsgálatára. Magának a diaforáz enzimnek a felfedezése az 50-es évek közepén történt meg (Farber és mtsai 1956). A további alapvető vizsgálatokat erről az enzimről Nachlas és mtsai (1958) Thomas és Pearse (1961) valamint Walker (1963) végezték el. Feltérképezték a diaforáz-aktivitást mutató sejteket, és felfedezték, hogy a neuronok erőteljesen jelölődnek a reakcióvégtermékkel.

Ezen előzmények ismeretében alkalmazta Gabella ezt a módszert a myenterikus plexus vizsgálatára.

Ez a módszer ma már szinte kizárólagosan használt a bélcsatorna myenterikus neuronjainak teljeskörű jelölésére. (Gabella 1987, Gabella és Halasy 1987; Gábrriel és mtsai, nyomdában; Stach 1980, 1981, 1982a és b, 1985). A technika további előnye az, hogy kombinálható (legalábbis fénymikroszkópos szinten) immunhisztokémiai eljárásokkal (Scheuermann és Stach 1985), valamint tormaperoxidáz nyomjelző alkalmazásával (Kreutzberg és Holländer 1983).

Az utóbbi két évtizedben kifejlesztett módszerek lehetőséget adnak számunkra, hogy a béka bél myenterikus plexusának komplex fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatát

NADHd

elvégezzük, és a nyert eredményeket - szem előtt tartva a törzsfajlódástani összehasonlítás kívánalmát - értékeljük.

II. Célkitűzések

Az irodalmi összefoglalóból láthattuk, hogy tudásunk korántsem teljes a béka bélcsatorna myenterikus plexusáról.

Mínt hogy a kételtűek (és ezen belül főleg a békák) közismerten fontos kísérleti állatok a fiziológia, a biokémia és a farmakológia területén, ezért időszerű, hogy szervezetünk még nem teljesen feltárt részleteit is megismerjük. Munkánk során ezért a következő kérdésekre kíséreltünk meg feleletet adni:

1. Milyen a béka tápcsatorna myenterikus plexusának elhelyezkedése, formája?
2. Milyen hisztokémiai sajátosságokat mutat a myenterikus plexus?
3. A különböző bélszakaszok milyen számban tartalmaznak neuronokat?
4. A hisztokémiai adatok alapján milyen idegengerület átvivő anyagokat tételezhetünk fel?
5. A polikiloterm életmóddal összefüggésben változnak-e a myenterikus plexus hisztokémiai sajátosságai és transzmittertartalma az évszakoknak megfelelően?



6. Mik a jellemző finomszerkezeti sajátosságai a béka tápcsatorna ideg-izom kapcsolatának?
7. Az ultrastrukturális sajátosságok alapján milyen ingerületáttevődési lehetőségek fordulnak elő a plexus neuronjai, valamint az idegvégződések és az izom között?
8. Fejlettségét tekintve milyen fokon áll a békák bélidegrendszere?

Munkám a JATE Állattani Tanszékén készült dr. Benedeczky István tanszékvezető egyetemi tanár vezetésével.

III. A vizsgálati anyag és a kísérleti módszerek

1. A vizsgálatokhoz felhasznált állatok

A vizsgálatokhoz kifejlett kecskebékákat (*Rana esculenta*) és tavi békákat (*Rana ridibunda*) használtunk fel, mindkét nemből. A kísérleti állatok között egyaránt voltak tavaszszal és ősszel befogott és felhasznált példányok.

2. Vizsgálati módszerek

a.) Hematoxin-eozin festés

A különböző bélszakaszokból vett mintákat 3,5%-os formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorozatban dehidráltuk, Benzol intermédiumon keresztül pa-

raffinba ágyasztuk be. A blokkokból 5-8 μm -es metszeteket készítettünk, ezeket xilollal deparaffináltuk, majd a Mayer szerint elkészített hematoxilinnel 5 percig festettük. A felesleges festéket alkohollal differenciáltuk. Az eozinnal 5-10 percig festettük a metszeteket, ismét differenciáltunk, majd felszálló alkoholsorozatban ismét víztelenítettünk.

Az anyagokat Euparallal fedtük.

b.) Ezüstimpregnáció

Vizsgálatainkhoz a Bielschowsky-Gros módszer Cauna (1959) által továbbfejlesztett változatát használtuk fel, kissé módosítva. A 3,5%-os formalinban fixált anyagból fagyasztó mikrotómon 30 μm -es metszeteket készítettünk. Ezeket először piridinben tartottuk két órán keresztül (sötétben). Desztillált vizes mosás, majd 1 h 20% AgNO_3 -ban (sötét) történő inkubálás és az ezt követő 1%-os formalinos többszöri öblítés után 2-5 percre ammóniás ezüstbe helyeztük az anyagokat (5 cm^3 20% AgNO_3 + 5 csepp 40% NaOH ; a keletkezett csapadékhoz annak feloldódásáig NH_4OH -t adunk). Háromszori 1%-os formalinkezelés után egy 10%-os formalinos öblítés következett, majd desztillált vízben mostuk az anyagokat. Ezt követően felszálló alkoholsorban dehidráltunk, majd a metszeteket Euparallal fedtük.

c.) Nitroblue-tetrazolium- nikotinaminadenindinukleotid diaforáz enzimhisztokémiai technika (NBT/NADHd). A Gabella által bevezetett technikát (1969) használtuk vizsgálataink során. A beleket az állat dekapitálása után azonnal kivettük és Krebs-oldatba (1. táblázat) helyeztük és ugyanezen oldattal feltöltöttük. Ezután a feltöltött belet 7 percre Triton X-100 0,3%-os oldatával kezeltük, azért, hogy NBT penetrációját elősegítsük. Az inkubáló oldat 2,5 mg NBT-t, 10 mg NADH-t 5 cm^3 0,1 M foszfát puffert tartalmazott 20 cm^3 oldatra számítva. Az inkubáló oldat 20 cm^3 -re való feltöltését tridesztillált vízzel végeztük. Az oldat pH-ja 7,3 volt. Az inkubálást a reakcióvégtermék kifejlődésétől függően 40-60 percig folytattuk, 20°C -on. A fixálás neutrális formalinnal történt (a 10%-os oldat pH-ját NaOH-val állítottuk be 7-es értékre). A különböző bélszakaszokból ezután kb 1 cm széles karikákat vágunk és úgy nevezett "whole mount" preparátumokat készítettünk a nyálkahártya, a kötőszövet és az izom egy részének (illetve a gyomor esetében egészének) eltávolításával. A preparátumokat 87%-os glicerinnel fedtük, fénymikroszkópos felvételeket készítettünk, illetve közvetlenül a preparátumokról meghatároztuk a területegységre jutó neuronok számát. A sejtek méretének jellemzésére a legnagyobb szélesség x legnagyobb hosszúság mérőszámot (maximális profil, μm^2 -ben megadva) vezettük be. A sejtszámlálási és mérési adatokat az 5. táblázatban összegeztük, a standard deviációt (s.d.) is feltüntetve.

d.) Acetilcolinészteráz (AChE) hisztokémia

Az acetilcolinészteráz Koelle módszerének Pearse (1960) szerinti módosításával mutattuk ki. Az inkubáló oldat összetételét a 2. táblázat tartalmazza. Szubsztrátként acetiltiokolin jodidot használtunk. A nem specifikus kolinészterázok gátlására 10^{-4} M etopropazint alkalmaztunk. Az inkubációs idő 1 óra volt, 20°C -on. A szulfidcsapadék képzésére 1%-os $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ oldatot használtunk (2 percig). Ezután 40%-os Na_2SO_4 -oldattal mostuk az anyagokat (3 váltással 5-5 percig). A hisztokémiai eljárás után a béldarabokat 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd a preparátumokat ugyanazon módszer segítségével készítettük el, mint a NADHd eljárás során, mert a reakciót itt is feltöltött bélen végeztük el. A preparátumokat 87%-os glicerinnel fedtük és fénymikroszkópból valamint sztereomikroszkópból is fényképeztük.

e.) Konszekutív NADHd-AChE hisztokémia

E módszer alkalmazása csak a gyomor esetében volt sikeres. Az állat dekapitálása illetve a gyomor Krebs oldattal történő feltöltése után először a NADHd reakciót végeztük el, úgy, hogy elhagytuk a Triton X-100 kezelést és megrövidítettük az inkubációs időt (40-60 percről 30 percre). Így a sejtestek erőteljesen jelölődnek, a rostok festődése ekkor még gyenge. A rostokat az AChE-reakció vég-

terméke lényegesen erőteljesebben jelöli, mint a NADHd reakciótermék, így a rostok NADHd festését az AChE-festés egyébként is elnyomná.

A NADHd reakció kivitelezése után a feltöltött gyomrokat először Krebs-oldatban, majd szubsztrát nélküli inkubáló oldatban öblítettük (2-3x 5 percig). Ezután az előző pontban leírt AChE-reakciót hajtottunk végre, az inkubálási idő 1 óra volt 37⁰C-on. A fixálás 10%-os neutrális formalinnal történt, a gyomorból ezután a fent leírt módon "whole mount" preparátumokat készítettünk, azokat fénymikroszkóppal vizsgáltuk, fényképeztük.

f.) A biogén monoaminok hisztokémiája

A monoaminok hisztokémiai kimutatására azt a glioxálsav-indukálta fluoreszcenciát (GIF) használtuk fel, amit Axelsson és mtsai (1973) fejlesztettek ki. Ezt a módszert de la Torre és Surgeon (1976) módosította. Mi ezt a módosított eljárást alkalmaztuk vizsgálataink során (SPG módszer).

A dekapitált állat belét azonnal kivágtuk és 1%-os glioxálsav oldatban, amely 6,8% szacharózt és 3,2% KH_2PO_4 -et tartalmazott (pH 7) 15 percig inkubáltuk 4⁰C-on. Ezután a beleket felvágtuk a nyálkahártyát és a kötőszövetes réteget eltávolítottuk az izomrétegből pedig un. "st^trech" preparátumot készítettünk. A mintákat ezután fluoreszcenciamentes paraf-

finolajjal fedtük és Leitz Orthoplan fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk illetve fényképeztük E-3-as színszűrőblokk alkalmazásával HBO 200 W-os nagy nyomású higanylámpa fényénél.

g.) Transzmissziós elektronmikroszkópia

α. Fixálás perfúzióval:

Az állatokat hátbőrre szórt uretánnal altattuk, majd transzkardiális perfúzióval fixáltuk a belső szerveket. A fixáló előtt nyári béka ringert (3. táblázat) bocsátottunk át az érpályán a vér kimosása céljából. A fixáló 2% paraformaldehidet és 2% glutáraldehidet tartalmazott, 0,1 M-os nátrium-cacodilát pufferben (pH 7,24). A perfúzió után a beleket kiboncoltuk és a különböző bélszakaszokból 1 x 3 mm-es blokkokat vágunk. A kis szövetdarabokat ezután tovább fixáltuk ugyanazon fixálóban még 2 órán keresztül. A fixálás után mosás következett 7,5% szacharózt tartalmazó 0,1 M nátrium-cacodilát pufferben, 5-15 percig. Az ozmifikálást 2% ozmium-tetroxidot tartalmazó S-collidin pufferben végeztük el.

A blokkokat ezután felszálló koncentrációjú alkoholsorozattal víztelenítettük (4. táblázat). A blokkkontrasztot 70%-os alkohol telített uranilacetátos oldatában 60'-ig végeztük Watson (1958) szerint. Az alkoholsorozat után propilénoxid intermédiumból ágyasztuk be a szövetdarabokat Durcupan ACM műgyantába. A polimerizálás 56^oC-os termosztátban két napi

történt. Az ultravékony metszeteket Reichert ultra-mikrotómmal készítettük, a rézrostélyra felvett metszeteket Reynolds szerint (1963) ólomcitráttal kontrasztosztuk. A fotókat Tesla BS 540-es illetve Jeol EM 100B-s elektronmikroszkóppal készítettük.

β . Fixálás immerzióval:

Az állatokat dekapitáltuk majd bélcsatornájukat egészben eltávolítottuk. A Krebs oldattal feltöltött beleket Karnovsky szerint készült fixálóba helyeztük. A 6 órás fixálás után háromszori foszfát pufferes öblítés következett. A bélcsatornából borotvapengével szövetgyűrűket vágunk, majd a nyálkahártyát és a kötőszöveti réteget eltávolítottuk. Az izomgyűrűket ca. 1 cm^3 -es blokkokra vágunk szét, majd ozmifikáltuk azokat. Ettől a lépéstől kezdve az eljárás megegyezett a 7. pontban leírtakkal.

IV. Eredmények

a. Hematoxilin-eosin festés

A béka bélcsatorna fő rétegei: a tunica mucosa, a tela submucosa, a tunica muscularis, a tunica subserosa és a tunica serosa (illetve hashártyával nem borított részeken - mint a nyelőcső vagy az utóbél - a tunica adventitia).

Az emlős bélcsatornaszerkezettől eltérő vonásokat az alábbiakban bélszakaszonként részletezzük.



1. Nyelőcső (1a ábra).

A nyelőcső meglehetősen rövid (ca. 2 cm), és éles makroszkópos átmenet nélkül folytatódik a gyomorban. Az epithelréteg itt többrétegű hengerhám, amely a garathoz közeli részeken csillózáttal is rendelkezik. A garattól távolodva a csillós sejtek előbb szigetekbe tömörülve fordulnak elő, majd a nyelőcső alsó szakaszán a csillós hámsejtek eltűnnek. A tunica mucosában kiterjedt mirigyállomány figyelhető meg. Ez a szövet alkotja a nyelőcső átmetszetének mintegy 40%-át. A t. muscularis izomrétege vékony, a nyelőcső egész hosszában simaizomsejtekből áll. A submucosa és az adventitia területén jelentős mennyiségű rostos kötőszövet található.

2. Gyomor (1b ábra)

Szövetteni felépítése alapvetően nem tér el az emlőstől. A fundusmirigyek itt is megtalálhatók, bár a pepszinogén termelésében a nyelőcső mirigyei is részt vesznek. A tunica mucosa saját izomrétege (tunica muscularis mucosae) jól fejlett, a tela submucosát itt is legfőképpen kollagén rostok építik fel. Az izomréteg a gyomorban igen erőteljes, bár a külső hosszanti réteg mindössze néhány sejtsorból áll. Az izom tömegének túlnyomó többségét a belső körkörös izomzat adja.

3. Patkóbél (1c ábra)

A középbél első, a további részekről mind makrosz-

kóposan, mind mikroszkóposan jól elkülöníthető része. Az emlősöktől eltérően a patkóbél submucosájában nincsenek mirigyek (Brunner-mirigyek); a többi szövettani vonás megegyező az emlősök patkóbél szerkezetével. Az izomréteg a középbél többi részével összehasonlítva meglehetősen vastag, a bél belső felszíne kissé redőzött.

4. Vékonybél (ld ábra)

Az emlősökre jellemző Peyer-plakkok hiányoznak a vékonybél disztális szakaszából, ezért a középbél többi része egységes szövettani szerkezetű. A szövettani szerkezet egyéb vonásaiban megegyezik az emlős bélcsatornáéval. A bélbolyhok hámrétege igen nagyszámú kehelysejtet tartalmaz.

5. Utóbél (le ábra)

Két része: a vastagbél és a végbél szövettanilag nem különíthető el. A vastagbél látható átmenet nélkül folytatódik a végbélben és az a kloakába nyílik. Az emlős vastagbél szerkezet nem figyelhető meg a béka esetében. A béka vastagbele bolyhokat vet, ellentétben a magasabbrendűek csaknem síma vastagbelével. A békánál lényegesen kevesebb kehelysejt figyelhető meg ezen a bélszakaszon, mint az emlősök esetében. Az izomréteg vékony, a hosszanti sejtsorok külső felszínén a fedő szövettani réteg igen jól megfigyelhető.

b.) Ezüstimpregnáció

1. Nyelőcső

A nyelőcső területén közvetlenül a szerv külső felszíne közelében, laterálisan egy erőteljes idegtörzs figyelhető meg. Ebben a nagy kötegben azonban valószínűleg nemcsak a myenterikus plexus intrinsic elemei találhatók meg, hanem a szerv extrinsic beidegzését biztosító rostok is. Megfigyelhetünk még egy lényegesen vékonyabb idegköteget is az előző mellett, de ezt az izomréteg belső felszínén (az előzőekben leírtakat lásd a 2a ábrán). Láthatunk olyan rostkötegeket is (szintén kevés axonból állnak), amelyek a simaizomrétegből kilépve a mirigyállományhoz adnak egészen vékony beidegző ágakat (2b ábra). Az izomból kilépő rostok egy laza hálózatot alkotnak. A belső rostrendszer elemei között neuronokat nem találunk.

2. Gyomor

A gyomor metszeteiben a plexus erőteljes, vastag rostjai ismét a szerv külső felszínén találhatók (2c ábra). Az itt látható idegelemeken kívül (a szerv külső felszíne felé) már csupán a serosa és a subserosa kötőszövetes rétegei láthatók.

A gyomor metszetein ezüstimpregnációval csak kevés idegsejt tüntethető fel. Egyes, valószínűleg extrinsic eredetű rostok áttörik a külső szöveti rétege-

ket, és így csatlakoznak a plexus belső elemeihez (2d ábra).

3. Patkóbél

Ezen a területen a külső hosszanti izomréteg sejtjei között lokalizálhatók a plexus elemei. A rostok behúzódnak a belső körkörös izomréteg elemei közé is (2e ábra). A plexus fő törzse a külső hosszanti réteg izomsejtjei között található (2g ábra). A rostkötegek mérete itt már lényegesen kisebb, mint volt az előbél esetében (összehasonlításként lásd a 2a,c és d ábrát).

4. Vékonybél

Az itt található rostok vékonyak, szinte alig impregnálhatók. A rostok lefutása mentén mindössze néhány idegsejt figyelhető meg (2f ábra). A neuronok a készítményeken elnyújtott ovoid alakot mutatnak (2h ábra). Méretüket tekintve ezek a sejtek kicsik (8-10 μm átmérőjűek).

5. Utóbél

Az utóbél területén a plexus viszonylag jól feltüntethető. Impregnálódott neuront nem találtunk, a plexus néhány vastag nyaláb (2i ábra) elágazódásából jön létre. E vastag rostok elvékonyodva hatolnak be az izomsejtek közé (2j ábra).

c.) NBT/NADHd hisztokémia

1. Nyelőcső

A nyelőcsőből e technikával nem sikerült kielégítő minőségű és mennyiségű anyagot nyerni. Néhány megfigyelésünk azonban van a nyelőcső myenterikus plexusával kapcsolatban is (illusztráció nélkül). A morfológiai sajátságok itt összességében megegyeznek a gyomoréval, különbség mindössze a ganglionok formájában (a nyelőcső ganglionjai elnyújtottak, hosszúak) és a közöttük húzódó rostkötegek méretében van (a nyelőcső rostkötegei erőteljesebbek). Az egyéb, közös tulajdonságokat a gyomor tárgyalásánál részletesen vizsgáljuk.

2. Gyomor

A gyomor myenterikus plexusa ganglionáris felépítésű (3a ábra). A gyomor ganglionjai mellett kis számban magányos idegsejtek is felismerhetők (3b ábra). Az egyes ganglionok 3-12 sejtet tartalmaznak. A belső körkörös izomréteg lefejtése esetén a plexus NADHd reakcióvégtermékkel gyengén festődő rostjai is előtűnnek (3c ábra). A NADHd jelölt neuronok nyúlványai sokszor jól felismerhetők, szerencsés esetben az axon iniciális szegmentuma előtűnő szemcsés reakcióterméket tartalmaz (3d ábra). A neuronok környezetében a plexushoz tartozó Schwann-sejt magok világosan láthatók (3d,e és f ábra). A myenterikus neuronok mérete $150-200 \mu\text{m}^2$.

Alakjuk szerint multipolárisak (3d és e ábra), általában több rövid dendrittel rendelkeznek a sejttest közelében. A reakcióvégtermék kitölti az egész citoplazmát, a sejtmag azonban többnyire fedetlen. A reakcióvégtermék granuláris természete az axonok iniciális szegmentumaiban figyelhető meg (3f ábra).

A sejtek egységnyi területre vonatkoztatott száma a gyomor területén belül is erős különbségeket mutat a szerv különböző szakaszain (részletes adatokat lásd az 5. táblázatban).

Amíg pl. a cardia területén nem éri el a cm^2 -enkénti 600-at, addig a pylorus területén az átlagos sejtszám 1000 felett van.

3. Patkóbél

A sejtek egyrésze itt is ganglionokba rendeződik, de nagyszámban jelennek meg a magányos sejtek ezen a bélszakaszon (3g és h ábra).

A myenterikus plexus rostjai itt szintén jelölődnek a reakcióvégtermékekkel, bár a jelölődés meglehetősen gyenge (3h ábra). A duodenum idegsejtjei többnyire multipolárisak, méretük a gyomor neuronjainak alsó mérethatárához áll közel (3i ábra). A sejtszám tekintetében viszonylag erőteljes csökkenést tapasztalunk a pylorushoz képest: az ott megfigyelt közel 1000 neuron/cm^2 lecsökken (mintegy 700 sejt/cm^2). A területegységre jutó neuronok száma valamivel több, mint a gyomor cardia területén (részletes adatok az 5. táblázatban található).

4. Vékonybél

A klasszikus vékonybél területén a neuroneloszlás alapvetően más, mint az előző bélszakaszok esetében. A ganglionok hiányoznak, a neuronok itt szórtan helyezkednek el, de nem egyenletes eloszlásban (4a ábra). A plexus rostjai itt is igen gyengén festődtek, de azért jól felismerhetők (4b ábra). Ezek az axonkötegek lényegesen vékonyabbak, mint a gyomor hasonló rostkötegei és a legtöbb közülük a bélcsatorna hossz-tengelyével párhuzamosan fut. Ennek az a következménye, hogy csak kevés keresztirányú összeköttetés alakul ki a hosszanti rostkötegek között. A neuronok néhol csoportokat alkotnak, de ez a csoportosulás véletlenszerűnek tűnik. A sejtek kis méretűek ($75 \mu\text{m}^2$ maximális profilúak) alakjukat tekintve mind bitemporális, mind multipoláris sejteket találunk ezen a bélszakaszon (4d ábra). A kis neuronokon kívül a nagy erek és idegek mezenterialis belépésénél nagyméretű multipoláris neuronokat is találtunk (4e ábra). E sejtek mérete a gyomor nagy ganglionsejtjeivel volt azonos ($300 \mu\text{m}^2$ maximális profil).

Ezek a sejtek (4e ábra insert), mint említettük, mindig multipolárisak: dendritjeik rövidek, karcsúak, a sejttest közelében végződnek vagy ágaznak el. Megfigyelhetjük azt is, hogy a véredények endothelje is erőteljesen festődik a NADHd reakcióval, és így az könnyen összetéveszthető a véredények mellett húzódó idegtör-

zsekkel (4f ábra). Sejtek tekintetében e bélszakasz jobban ellátott, mint a patkóbél, hiszen mind proximális mind disztális végén a sejtszám meghaladja a patkóbélét. Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a disztális vékonybélszakasz sejtszáma nagyobb, mint a proximálisé (lásd a részletes eredményeket az 5. táblázatban).

5. Utóbél

Az utóbél myenterikus plexusa NADHD-reakcióval feltüntetve hasonlít a vékonybél plexusához. Sejtjei kicsik (50-150 μm^2 profilúak) és többségükben multipolárisak (4g ábra). A rostok lefutása nagyjából itt is a bél hossz tengelyével párhuzamos, de a hosszanti rostok között több a keresztirányú kapcsolat, mint a vékonybél esetében (4h ábra). A területegységre jutó sejtszám nagyjából a duodenuméval egyezik meg (részletes adatok az 5. táblázatban találhatóak).

d.) Acetilcholinészteráz (AChE) hisztokémia

A bélcsatorna falában jelentős mennyiségű, AChE-aktivitásra utaló reakcióvégerterméket észleltünk. Elsősorban a myenterikus plexus festődött a reakcióvégertermékkel, de az izomsejtek is mutattak gyenge AChE-pozitivitást.

1. Előbél

A különböző bélszakaszok közül a nyelőcső és a gyomor területén volt a legerőteljesebb a festődés acetilkolinészterázra. A plexus vaskos hosszanti idegtörzsekből és az azokat összekötő vékonyabb rostok

hálózatából áll (5a ábra). A plexus a gyomor mezen-
teriális szélén erőteljesebb, mint az antimezenteri-
ális oldalon: itt több hosszanti idegköteg van és a
közöttük lévő hálózat is erőteljesebb, sűrűbb. A há-
ló kereszteződési pontjaiban a ganglionok felismer-
hetők (5b ábra). A ganglionok egymástól való távolsá-
ga helyenként igen kicsi: kevesebb, mint 100 μ m. A
ganglionsejtek sok esetben kör alakban rendeződnek,
emellett azonban találunk ovoid, megnyúlt alakú dú-
cokat is. Néha maguk a ganglionok is kör alakú gyű-
rűbe rendeződhetnek (5c ábra). Mint említettük, az
előbél ganglionjaiban sok AChE-pozitív idegsejt is-
merhető fel. Az erős hosszanti ágakat összekötő fi-
nomabb rostkötegek is jelentős számban tartalmaznak
a neuronokat. A ganglionokon és a jelölődött rost-
kötegeken kívül helyet foglaló magányos AChE-pozi-
tív neuronokat nem találtunk (5d ábra). A sejttés-
tek alakja a reakcióvégtermék lokalizációja alapján
nem állapítható meg egyértelműen (5e ábra). Két hosz-
szanti rostköteg közötti területen az AChE-pozitív
rostokban néhol igen erősen jelölődött szabályos te-
rületeket figyelhattunk meg (5f ábra). Egyes vaskos
rostokban helyenként AChE-negatív udvart láthatunk
(5g ábra). Ezek alakja és mérete myenterikus neuro-
nokra emlékeztet.

2. Középbél

A patkóbél átmeneti szakasza után a vékonybélben a myenterikus plexus festődése meglehetősen eltérő képet mutat az előbél területén látottaktól. A reakciótermék itt is jól lokalizálható a plexus elemeiben, de a hálózat lényegesen kevésbé rendezett, bár a rostok itt is főként hosszanti lefutásúak. A keresztirányú összeköttetések száma viszonylag alacsony (6a ábra). A mezenterialis szegélynél lépnek be az extrinsic idegelemek (6c ábra), melyek viszonylag erőteljes AChE-pozitivitást mutatnak. Ezen elemek igen gyakran a nagy vérerek mentén jutnak be az erek oszlását követve a bélcsatorna szövetei közé (6d ábra). Az előbélhez hasonlóan a hálózat lényegesen ritkább az antimezenterialis oldalon. Mind az extrinsic, mind az intrinsic rostkötegek AChE-pozitivitása lényegesen gyengébb, mint az előbélben (6e ábra, összehasonlítva az 5. táblával). A rostkötegekben néhány helyütt gyengén AChE-pozitív idegsejteket is találhatunk (6f és g ábra). Ezek száma azonban összehasonlítva a gyomorban látottakkal igen elenyésző. Olykor a vérereket is AChE-pozitív hálózat veszi körül (6g ábra). Az idegrostok állományában helyenként AChE-negatív udvarokat figyelhetünk meg: ezek mérete körülbelül megegyezik egy lokális neuronéval (6f ábra).

3. Utóbél

A myenterikus plexus AChE-pozitivitásának mintázata mindenben hasonló a középbél mintázatához. A területegységre jutó AChE-pozitív neuronok száma az utóbélben magasabb, mint a középbélben volt.

e. Kettős NADHd-AChE hisztokémia

E módszer csak a gyomor myenterikus plexusán volt kivitelezhető. A myenterikus plexus sejtes elemei a várakozásnak megfelelően jól festődtek formazánnal, míg a rostkötegek inkább az AChE reakció végtermékét tartalmazták (7a ábra). Ezért a domináló csapadékszín a rostokban a barna (AChE), a sejtekben a lila (NADHd). Jól megfigyelhetők a preparátumokban a plexus nem-neuronális sejtes elemei, a Schwann-sejtek is, melyeknek magját csak nagyon vékony, gyűrűszerű NADHd reakcióvégterméket tartalmazó plazma vesz körül (7b ábra). Esetenként a NADHd-pozitív neuronok nyúlványai a sejttestől a szomszédos ganglionig követhetők (7c ábra): ezek kiemelkednek az AChE-pozitív háttérből. A nagy, erőteljesen AChE-pozitív rostkötegek lefutásába eső NADHd pozitív neuronok is jól felismerhetők: az AChE reakció végterméke még ezeken a helyeken sem tudja elfedni a NADHd reakcióban keletkező formazánt (7d és g ábra). A 7e ábrán a kettős citokémiai reakció vég-

termék eloszlása alapján könnyen megállapítható, hogy vannak rostok, amelyek NADHd-zal és AChE-zal is festhetők, de láthatunk a nagyobb rostkötegekbe befutó olyan kisebb nyalábokat, amelyek csak a NADHd reakcióvégtermékkel jelölődtek. AChE-zal igen erőteljesen jelölt rostkötegekben NADHd és AChE-pozitív neuronok is jelen lehetnek, majd nem túl távol a fent említett rostoktól kizárólag NADHd-ra pozitív sejteket találunk (7e és f ábra). E sejteknek a környezete sem tartalmaz AChE-t. Az erősen AChE-pozitív rostkötegekben lévő neuronok mindig tartalmaznak NADHd és AChE reakcióvégterméket is; ezekben a sejtekben még az igen erős NADHd reakció sem tudja elnyomni az AChE-t (7g ábra). Az ilyen sejtek magja felett és helyenként a citoplazmában is barna csapadék, az AChE reakció végterméke figyelhető meg.

f. A glioxálsav-indukált fluoreszcencia vizsgálata:
a monoamin transzmitterek lokalizálása

1. Előbél

A nyelőcső és a gyomor területén a myenterikus plexusban glioxálsav-indukált fluoreszcenciát (GIF) nem észleltünk. E bélszakaszokon a nyálkahártya egy-egy sejtje mutatott fluoreszcenciát (8a és b ábra). Ezeket a sejteket a későbbi elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján mint entero-endokrin sejteket azonosítottuk.

2. Középbél

Az entero-endokrin sejtek a patkóbél területén is megfigyelhetők voltak, emellett azonban a myenterikus plexusban is találunk néhány fluoreszcenciát mutató sejtet. Ezek a sejtek unipolárisnak tűntek (8f ábra). A neuronok szoliter megjelenésűek, néhol szorosan kapcsolódnak a plexus rostjaihoz, másutt ez a kapcsolat hiányzik. Fluoreszcenciát mutató idegsejtek ritkák a középbél további szakaszain. Gyakori közöttük a bipoláris sejt (8e ábra). Fluoreszcens rosthálózat a vékonybéli szakaszon is előfordul: a rostok meglehetősen vaskosak, rajtuk varikozitások figyelhetők meg (8c és d ábra). Lefutásukba csak elvétve illeszkedik néhány fluoreszcenciát mutató idegsejt (8g ábra). A fluoreszkáló rostok a bél hossz tengelyével párhuzamosak.

3. Utóbél

Fluoreszkáló rostok az utóbél területén is jelen vannak, de idegsejtet ezen a bélszakaszon nem sikerült találni.

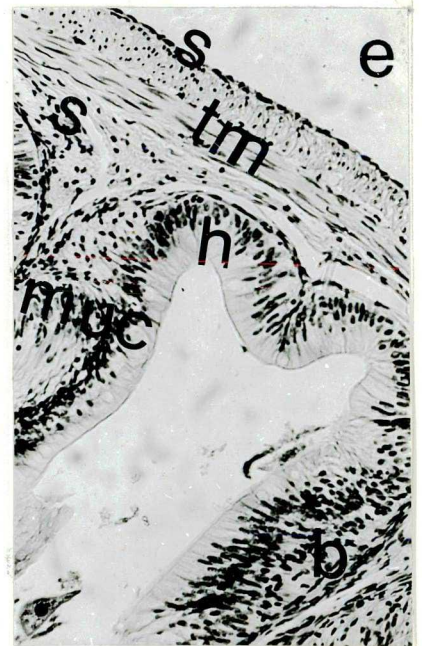
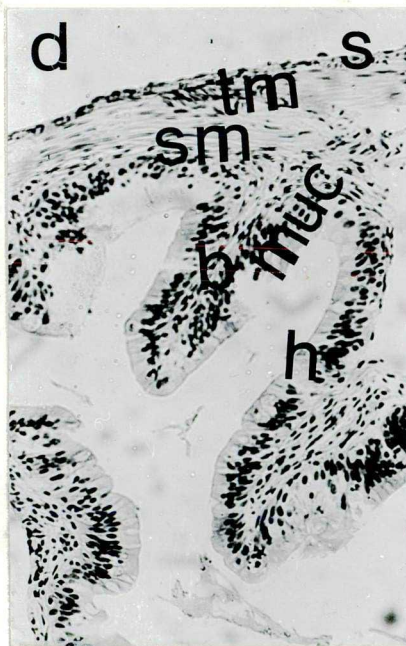
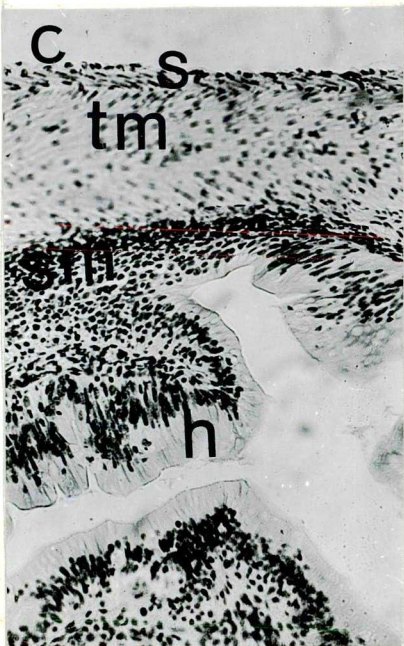
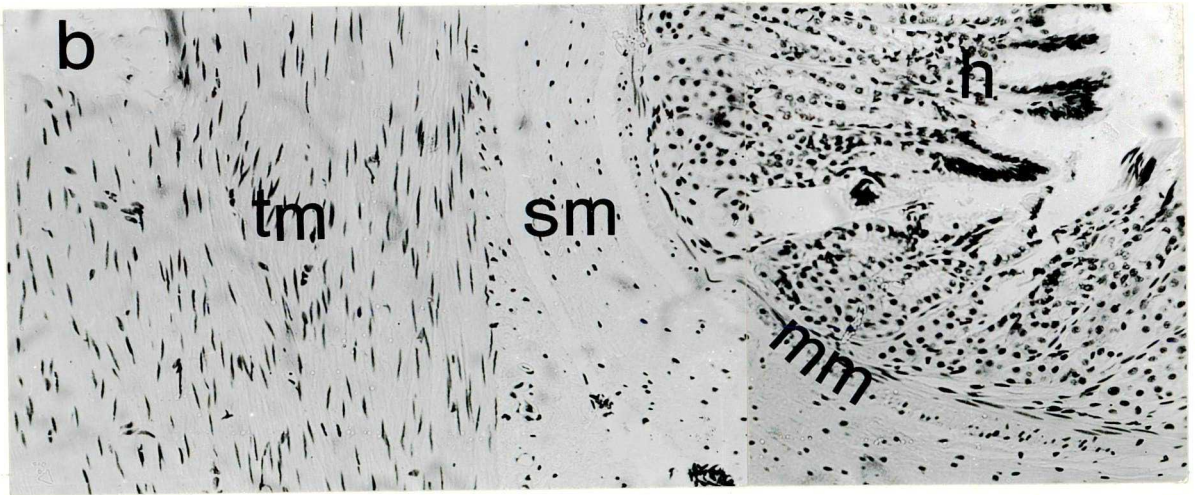
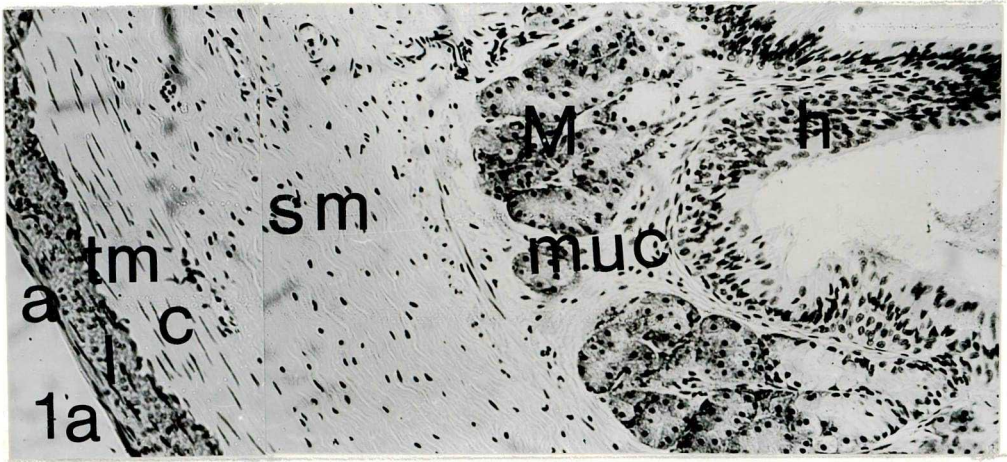
A GIF, ellentétben a többi hisztokémiai sajátossággal, évszakos változást mutat: a májusban feldolgozott példányokban nőtt a GIF erőssége, az előző időszakhoz képest, majd az aktivitás október közepéig magas maradt, ettől kezdve fokozatosan gyengült februárig, majd lassan emelkedett májusig.

Ábramagyarázatok

1. ábra

A béka bélcsatorna szövettani szerkezete. Hematoxilin-eozin festés (Valamennyi ábra nagyítása 200x-os.)

- a. Nyelőcső. muc: tunica mucosa, h: hámréteg, M: mirigyállomány; sm: tunica submucosa; tm: tunica muscularis; c: körkörös izomréteg; l: hosszanti izomréteg; a: tunica adventitia.
- b. Gyomor. H: hámréteg; mm: muscularis mucosae; sm: tunica submucosa; tm: tunica muscularis.
- c. Patkóbél. A tunica mucosa vékony. H: hámréteg; muc: tunica mucosa. A tunica submucosa (sm) sejtűs, benne nincsenek Brunner-mirigyek. Az izomréteg (tm) viszonylag erős. A külső felszínt vékony tunica serosa (s) borítja.
- d. Középbél. Mucosa (muc) rétege vékony, szinte kizárólag a hámból áll (h). A felületet bélbolyhok (b) nagyobbítják. A submucosa (sm) vékony, az izomréteg (tm) is gyenge, két rétegű. A külső felszínen a serosa(s) rétegét figyelhetjük meg.
- e. Utóbél. Ennek felületét is bélbolyhok borítják (b). Hámja (h) hengerhám, a mucosa (muc) vékony. A submucosa (sm) is vékony, az izomrétegből (tm) a hosszanti jól fejlett. A szerv külső felszínén itt is a serosa (s) rétegét látjuk.

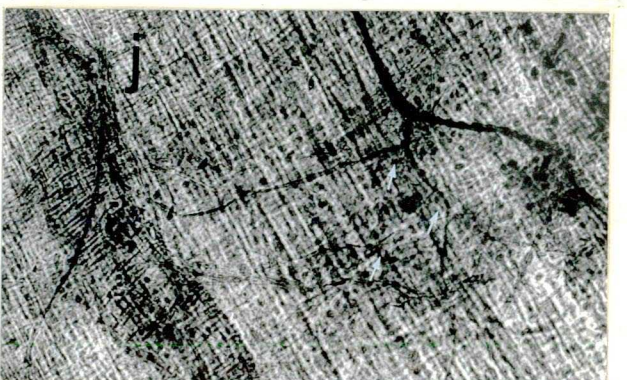
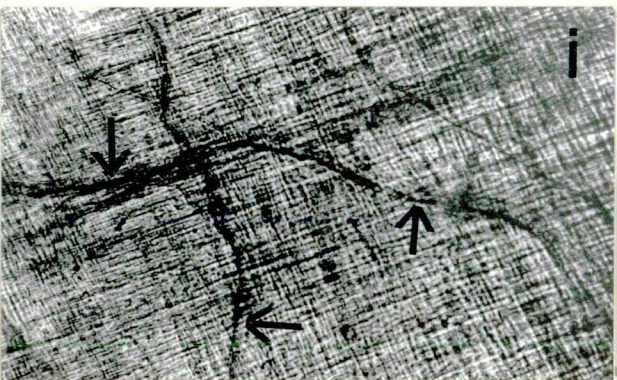
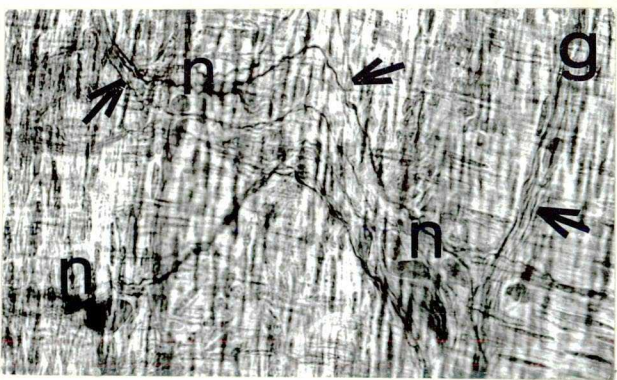
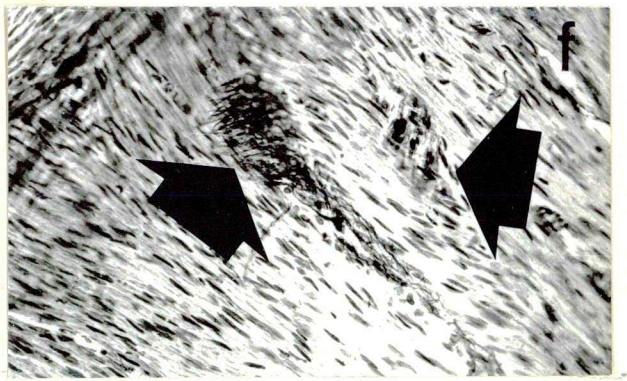
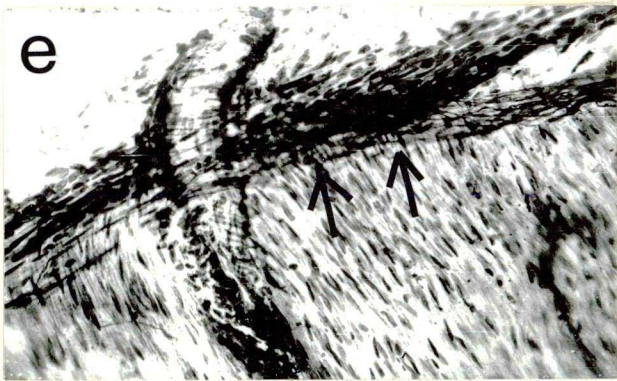
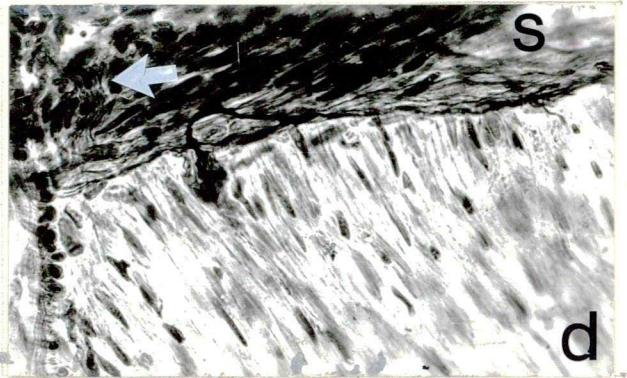
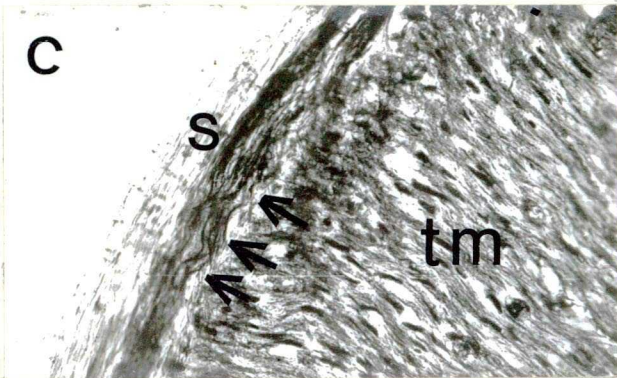
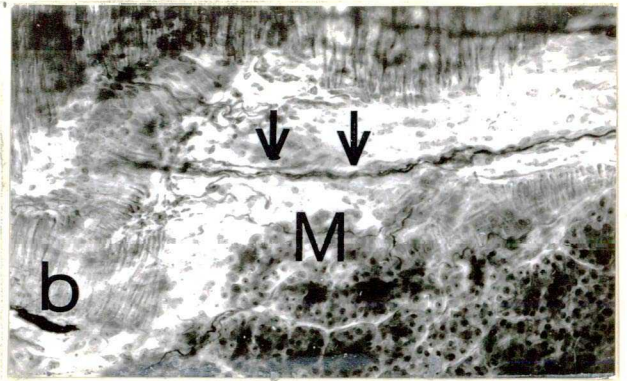
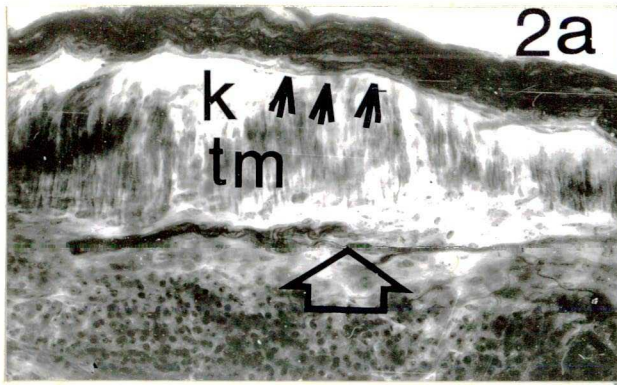


2. ábra

Ezüstimpregnációs készítmények a bélcsatorna különböző szakaszairól

(A nagyítás 200x-os, kivéve h-t)

- a. Nyelőcső. A nyelőcső külső felszínén (k) igen erőteljes idegtörzs fut (nyilak). Az izomréteg (tm) belső felszínének közelében vékonyabb idegtörzset figyelhetünk meg (üres nyíl).
- b. Nyelőcső. A mirigyeket (M) sok esetben az izomrétegből kilépő idegrostok is megközelítik (nyilak) és azokhoz apró ágakat adnak.
- c. Gyomor. A gyomor vastkos idegfonata (nyilak) a tunica serosa (s) és az izomréteg (tm) között foglal helyet.
- d. Gyomor. Az extrinsic rostok (hár nyíl) áttörik a serosa (s) rétegét és a tunica muscularis külső felszínén csatlakoznak a plexus intrinsic elemeihez.
- e. Patkóbél. A patkóbélben a rostok (nyilak) behúzódnak az izomelemek közé.
- f. A patkóbél ganglionjai (nyilak) a külső hosszanti izomrétegben foglalnak helyet.
- g. Vékonybél. A myenterikus plexus neuronjai (n) a külső hosszanti rétegben találhatóak, közöttük rostok (nyilak) foglalnak helyet.
- h. Vékonybél. A vékonybél neuronjai (n) e készítményeken leggyakrabban ovoid alakot mutatnak. 800x-os nagyítás.
- i. Az utóbél plexusát közepes vastagságú rostkötegek hozzák létre (nyilak).
- j. A rostok végágai elágazódva (nyíl) hatolnak be az utóbél izomszövetjei közé.

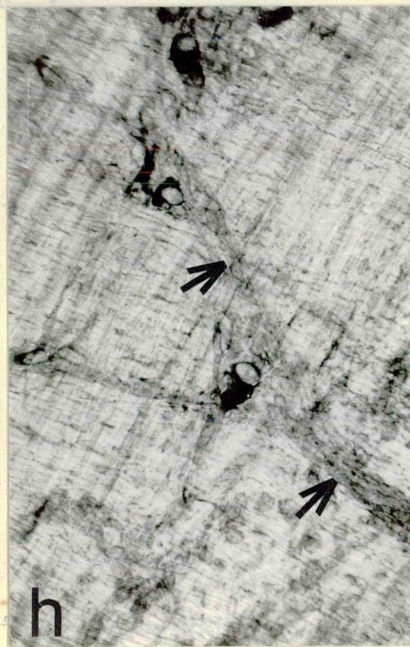
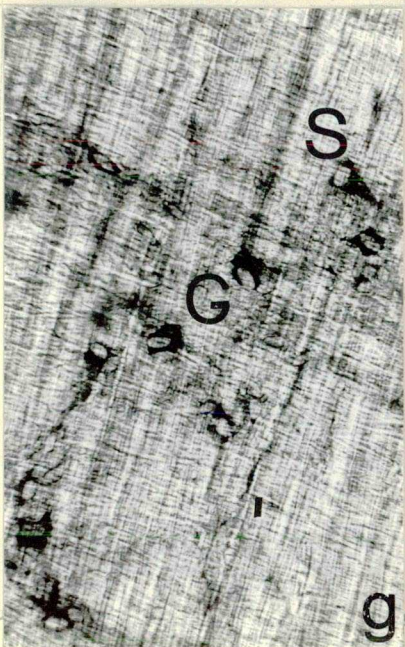
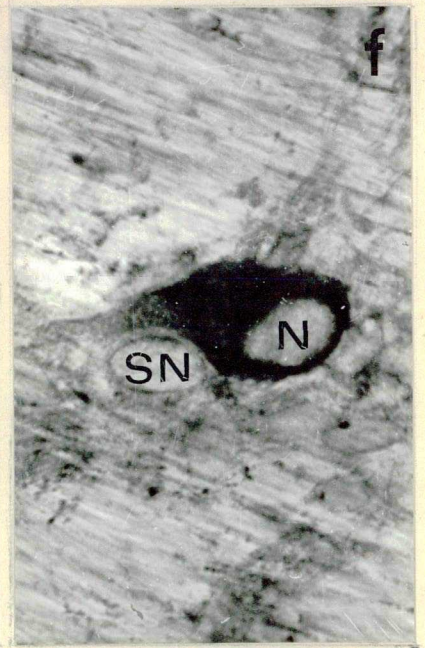
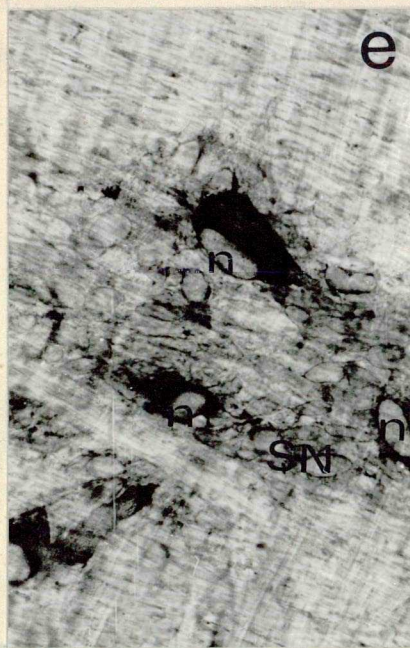
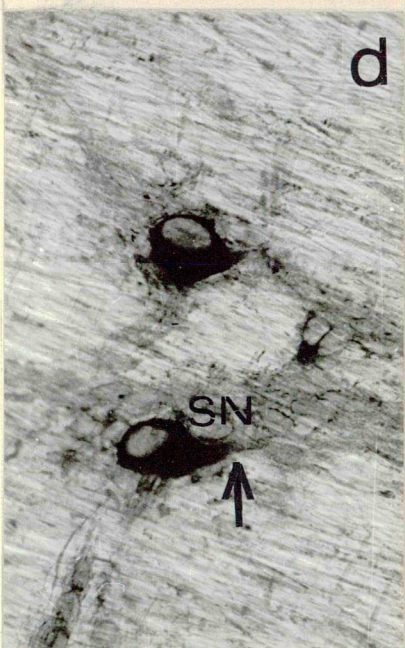
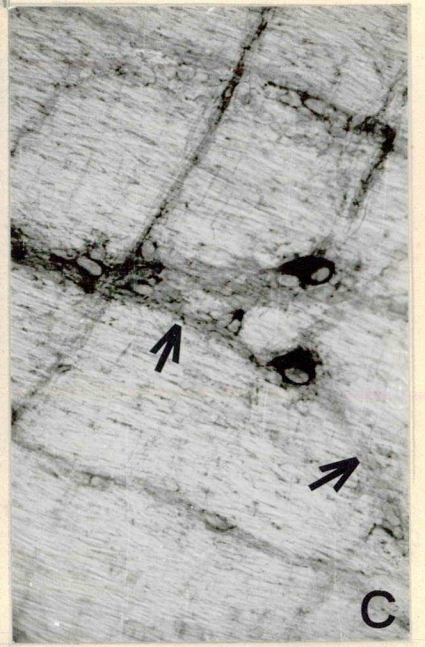
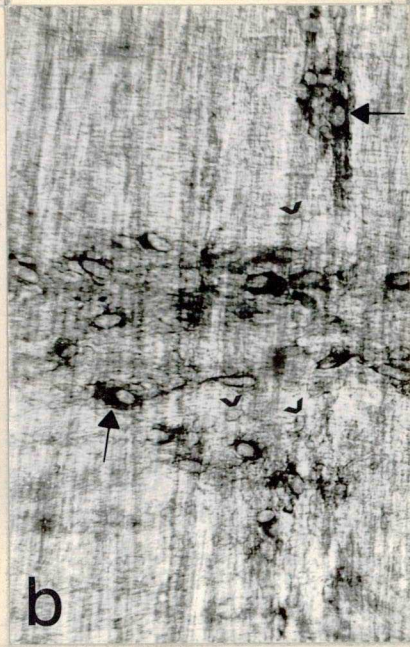
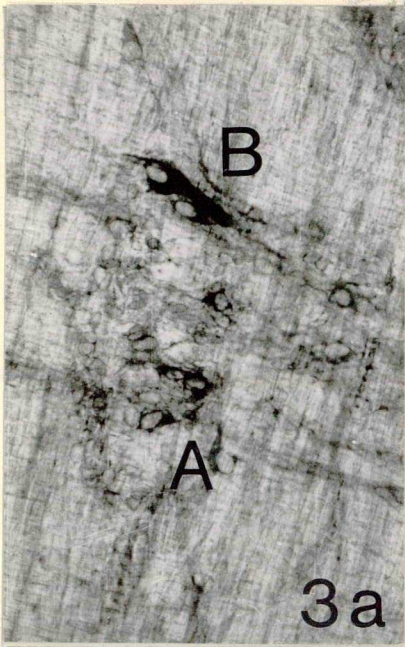


3. ábra

NBT/NADHD hisztokémia a gyomor és a patkóbél

myenterikus plexusán

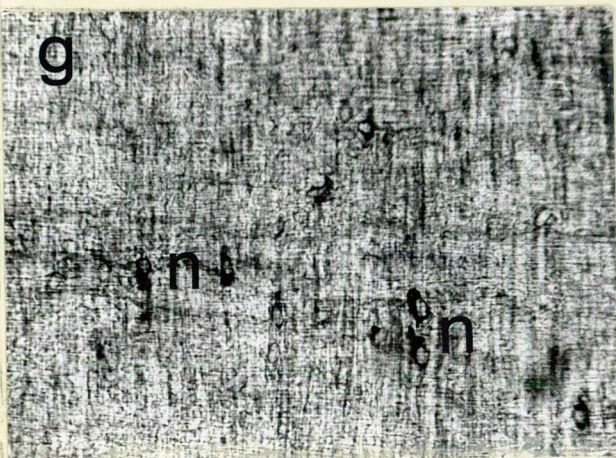
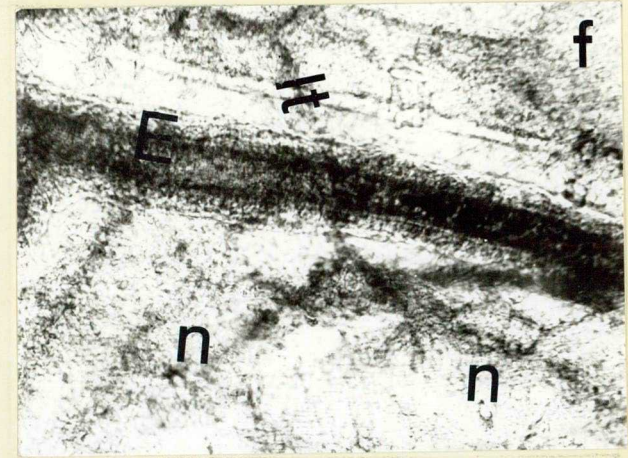
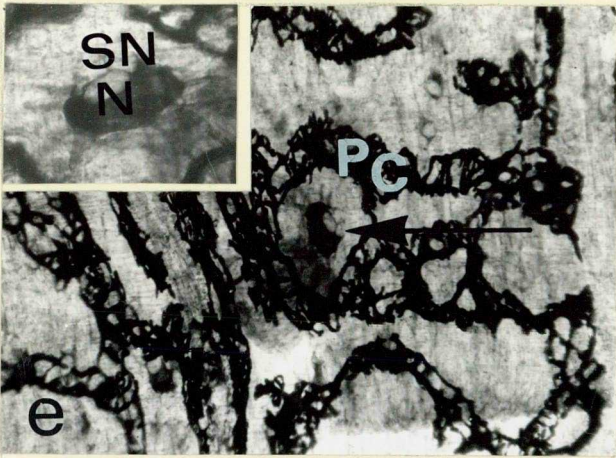
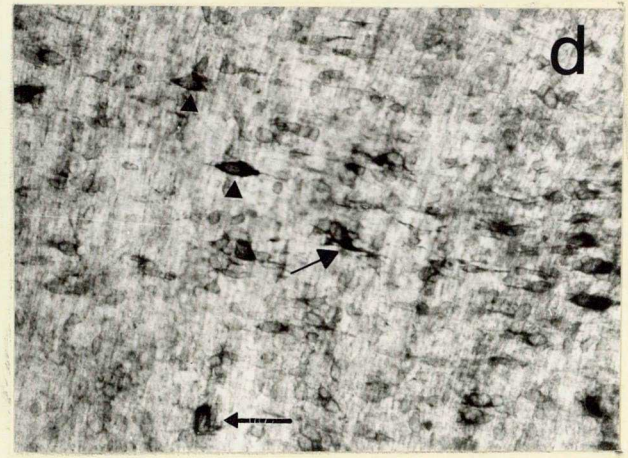
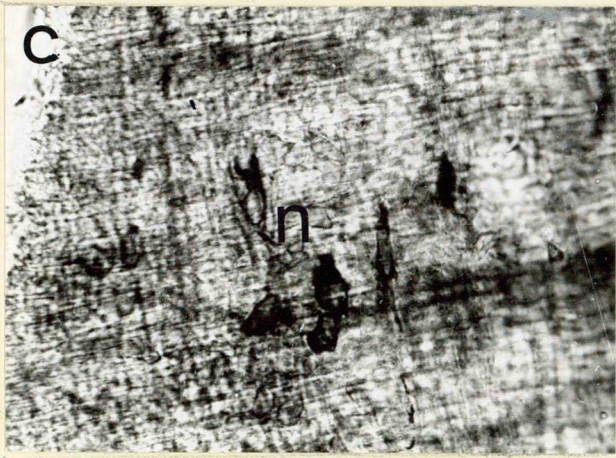
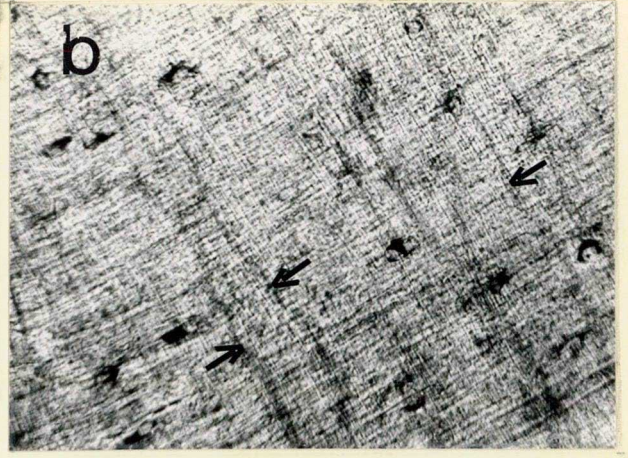
- a. A gyomorban 3-12 sejtből álló ganglionokat találunk A és B: ganglionok. Nagyítás: 200x-os.
- b. A ganglionokban az idegsejtek (nyilak) mellett a Schwann-sejtek magvait (nyílhegyek) is láthatjuk. Nagyítás: 200x-os
- c. A gyomor ganglionjait vastag, NADHD-zal gyengén jelölődő rostok kötik össze (nyilak). Nagyítás: 200x-os.
- d. Az axon eredése (nyíl) a szemcsés reakcióvégtermék jelenlétéről jól felismerhető. Az ábrán az axon iniciális szegmentjéhez egy Schwann-sejt magja (SN) fekszik hozzá. Nagyítás: 400x-os.
- e. A plexushoz tartozó neuronok (n) jól elkülöníthetők a Schwann-sejtektől, illetve azok felismerhető magjaitól (SN). Nagyítás: 400x-os.
- f. A neuronok sejtmagja (N) reakcióvégterméktől mentes. Ez igaz a Schwann-sejtek magjaira (SN) is. Nagyítás: 800x-os.
- g. A patkóbél területén ganglionok (G) és magános sejtek (S) egyaránt jól felismerhetők. Nagyítás: 200x-os.
- h. A plexus rostrendszer a duodenális szakaszon a gyenge jelölődés ellenére is szembetűnő (nyilak). Nagyítás: 200x-os.
- i. Tipikus, multipoláris idegsejt (n) a duodenum területéről.



4. ábra

NBT/NADHd hisztokémia a béka vékonybélén és utóbélén

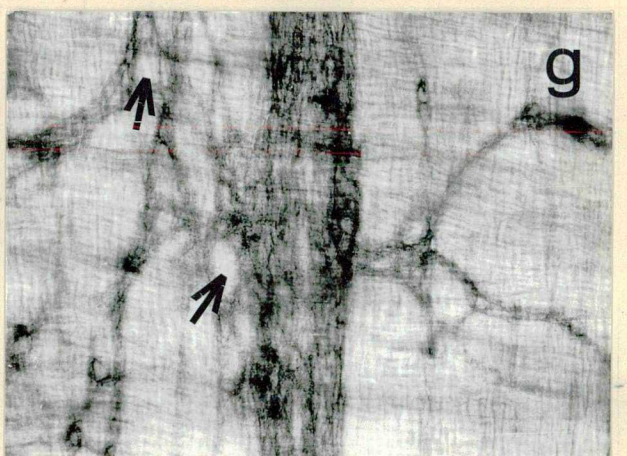
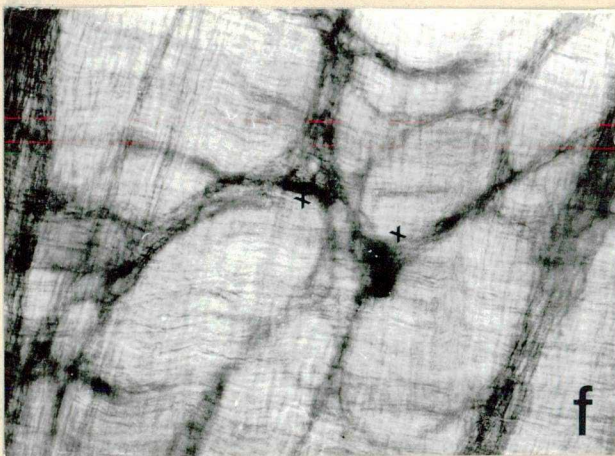
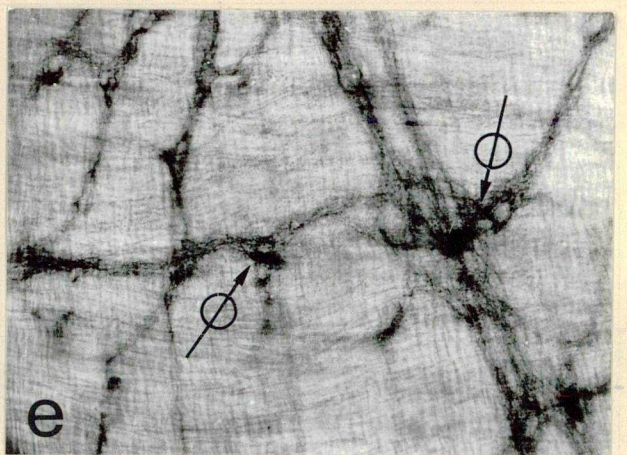
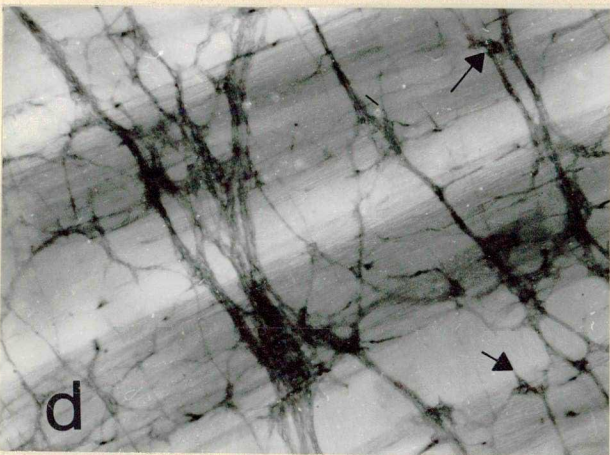
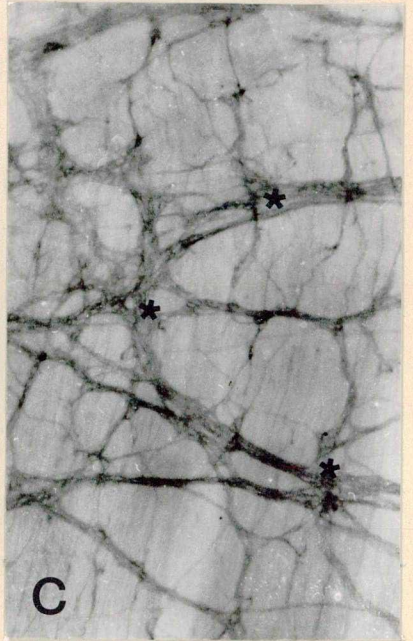
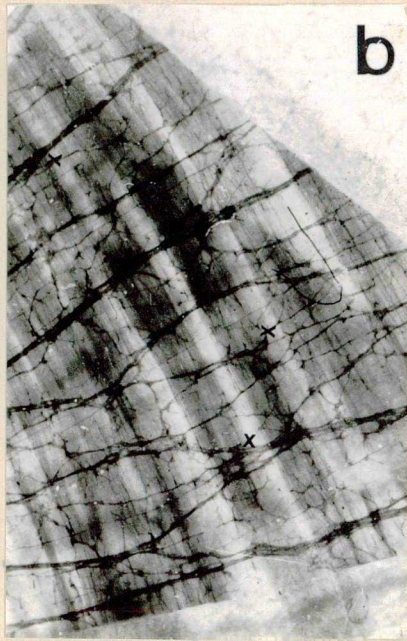
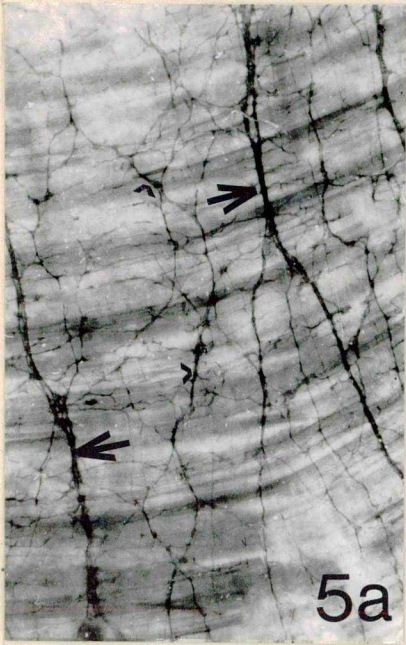
- a. A vékonybél neuronjai szórطان helyezkednek el (nyilak).
Nagyítás: 200x-os.
- b. A neuronok között a plexus rostozata (nyilak) is felismerhető. Nagyítás: 200x-os.
- c. A neuronok (n) néha csoportokat alkotnak. Nagyítás: 400x-os
- d. Mind bi- mind multipoláris idegsejtek (nyílhegy, ill. nyíl) felismerhetők e bélszakaszon. Nagyítás: 200x-os.
- e. A mezenteriális szegélynél nagyméretű neuront találunk (nyíl). A belépő ereket pigmentsejtek (PC) veszik körül. Nagyítás: 200x-os. Insert: a nagy sejtek multipolárisak (N: sejtmag; SN: a társult Schwann-sejtek magja). Nagyítás: 400x-os.
- f. A vérerek endotelje (E) is jelölődik a reakcióvégtermékekkel. A vérerek mentén neuronokat (n) és idegtörzseket (it) is megfigyelhetünk. Nagyítás: 200x-os
- g. Az utóbél plexusa a vékonybélhez hasonlít (n: neuronok).
Nagyítás: 200x-os.
- h. A rostok (nyilak) lefutása közel párhuzamos; köztük gyakori a keresztirányú kapcsolat. (n: neuronok). Nagyítás: 200x-os.



5. ábra

Acetilcolinészteráz pozitivitás a béka előbél myenterikus plexusában

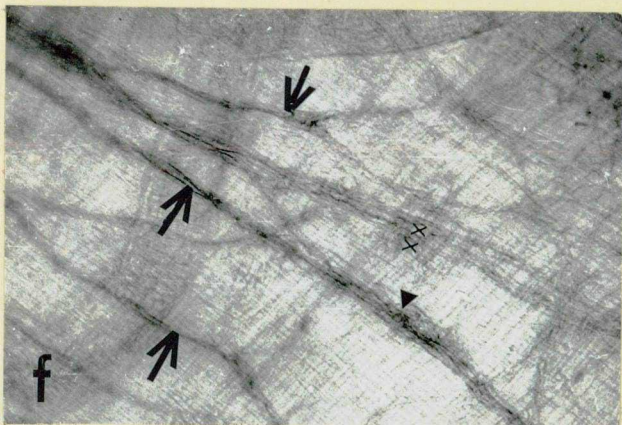
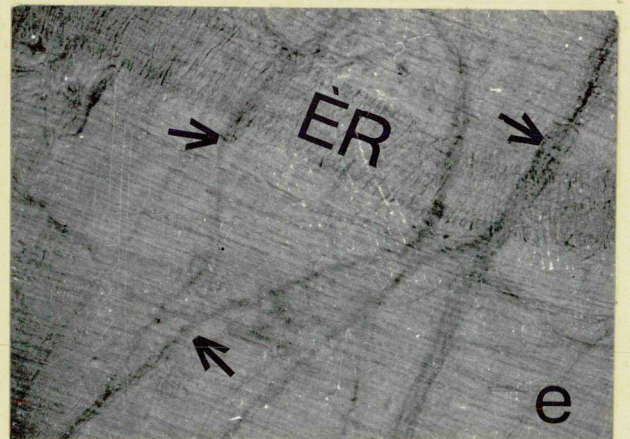
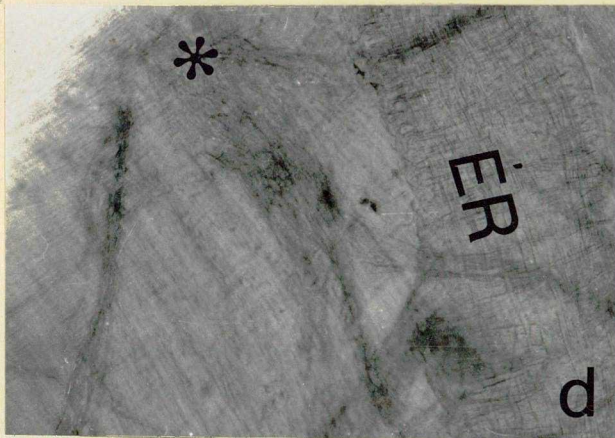
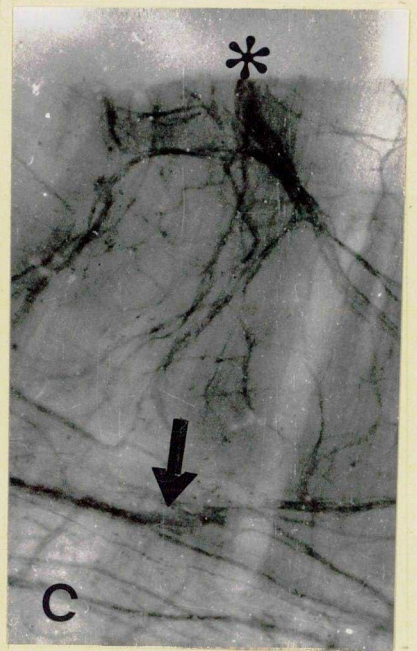
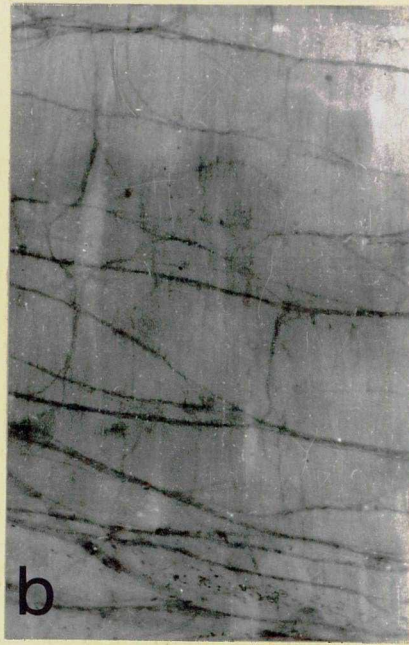
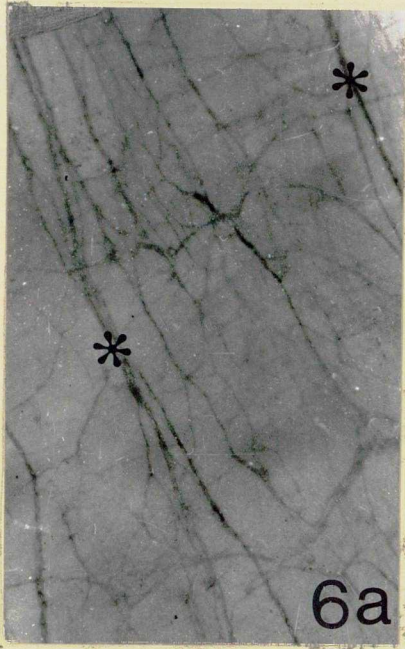
- a. A myenterikus plexus igen erős hosszanti idegtörzsei (nyilak) és a közöttük levő vékonyabb törzsek (nyílhegyek) jól felismerhetők. Nagyítás: 40x-es.
- b. Az AChE-pozitív háló keresztpontjaiban helyenként a ganglionok (x-ek) is sejthetők. Nagyítás: 40x-es.
- c. A ganglionok (csillagok) sokszor kör alakban rendeződnek: és az egyes dúcokat ideggyűrű (nyilak) kötik össze. Nagyítás: 60x-os.
- d. A rostkötegek mellett magányos idegsejteket nem figyelhetünk meg (nyilak: AChE-pozitív neuronok). Nagyítás: 60x-os.
- e. A sejttetek alakja a reakció lokalizációja alapján nem állapítható meg (nyilak AChE-pozitív neuronok). Nagyítás: 200x-os.
- f. Két hosszanti rostköteg közötti területen a vékony rostokban igen erősen jelölődött sejteket figyelhetünk meg (x-ek). Nagyítás: 200x-os.
- g. Egyes vaskos rostokban helyenként AChE-negatív udvar figyelhető meg (nyilak). Nagyítás: 200x-os.



6. ábra

A vékonybél myenterikus plexusának AChE-pozitivitása

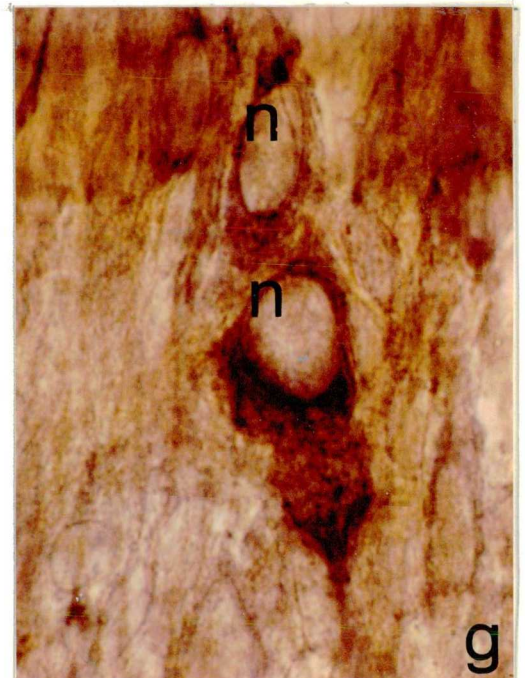
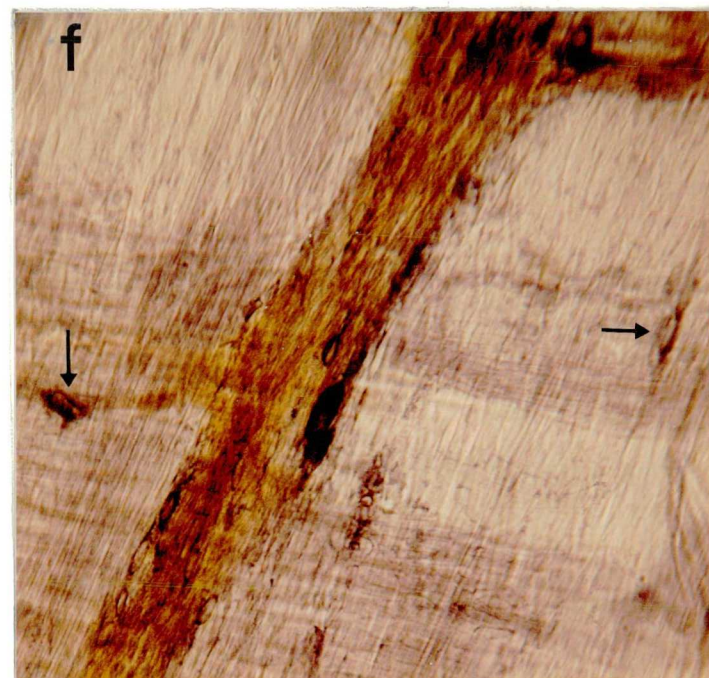
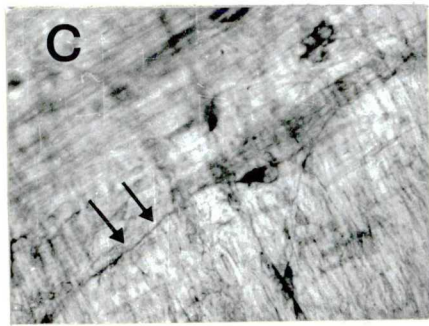
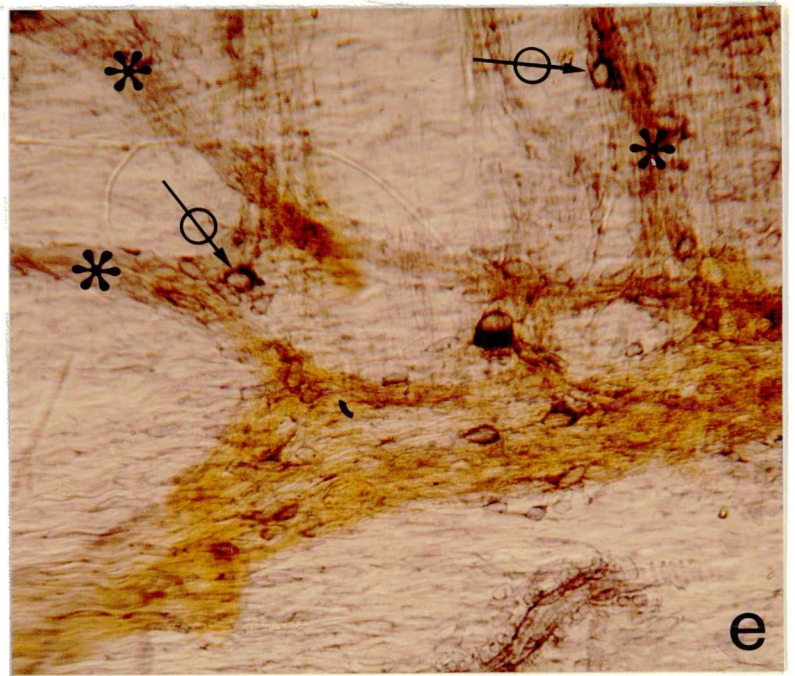
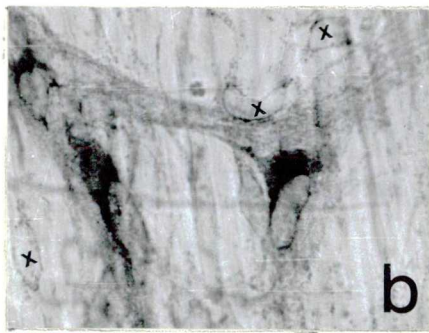
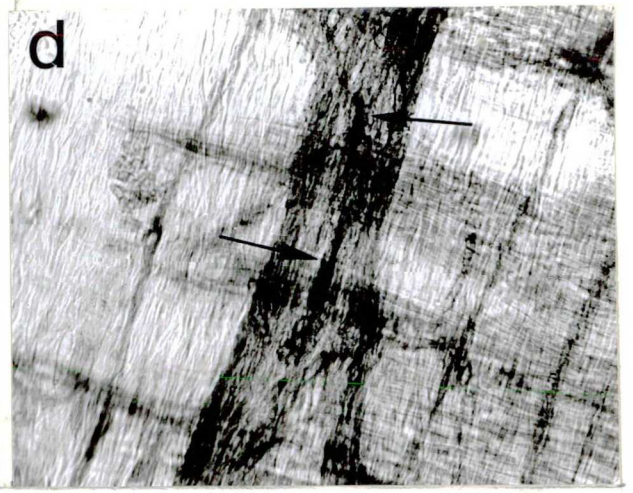
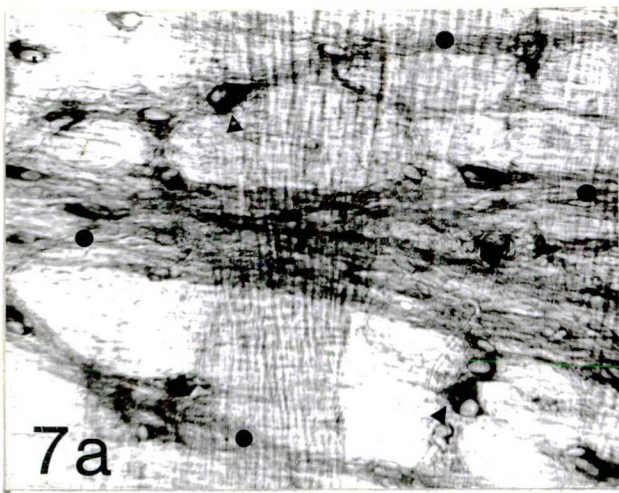
- a. A vékonybél AChE-pozitív hálózatának fő lefutási iránya hosszanti (csillagok). Nagyítás: 40x-es.
- b. A hálózat az antimezenteriális oldalon ritkább. Nagyítás: 40x-es.
- c. Az extrinsic idegek a bélcsatorna falába a mezenteriális szélen lépnek be (csillag: belépési hely; nyíl: hosszanti lefutású hálózat; nyílhegyek: neuronok). Nagyítás: 60x-os.
- d. Az idegrost bélbe való belépése gyakran a nagy vérerek (ÉR) mentén történik (csillag: belépő idegtörzs). Nagyítás: 200x-os.
- e. A plexus rostjainak száma kevés és azok AChE-pozitivitása gyenge a gyomoréval összehasonlítva (ÉR: vérér; nyilak: a plexus rostjai). Nagyítás: 200x-os.
- f. Az idegtörzsekben (nyilak) helyenként AChE-pozitív neuronokat (nyílhegy) és AChE-negatív udvarokat (kereszt) találunk. Nagyítás: 200x-os.
- g. A vérereket (ÉR) is körülveheti egy AChE-pozitív rost-hálózat (nyilak). Nagyítás: 200x-os.



7. ábra

Kettős NADHd-AChE hisztokémia a béka gyomor myenterikus plexusán

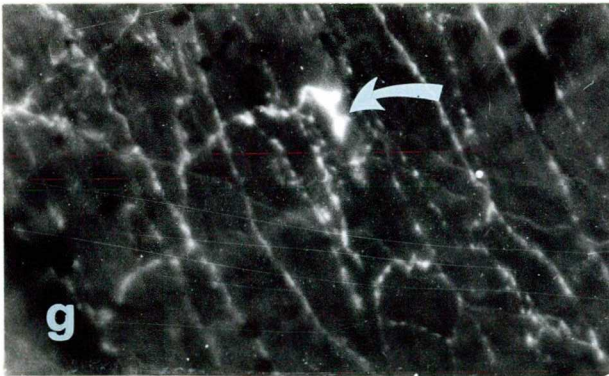
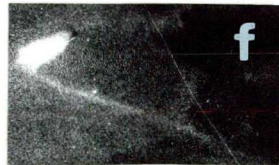
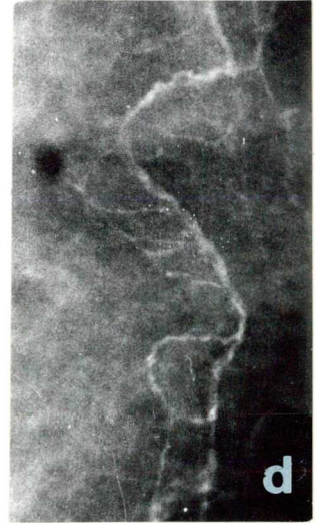
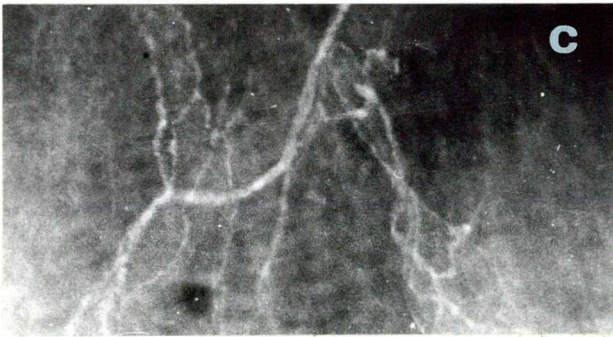
- a. A NADHd-reakció a plexus sejtjeit (nyílhegyek) az AChE pedig a rostokat jelöli intenzívebben (körök). Nagyítás: 200x-os.
- b. A Schwann-sejtek magvai (x-ek) jól megfigyelhetők: a sejt- 400x-os.
- c. A NADHd-jelölt neuron nyúlványa a sejttesttől nagy távolságra is követhető (nyilak: az axon lefutása mentén). Nagyítás: 200x-os.
- d. Az erősen AChE-pozitív rostkötegekben levő neuronok (nyilak) mindkét reakcióvégterméket tartalmazzák. Nagyítás: 200x-os.
- e. A NADHd és AChE-reakciók színbeli különbözősége feltűnő. Csak NADHd-jelölt rostokat (csillag) és sejteket (nyilak) is megfigyelhetünk. Nagyítás: 200x-os.
- f. A vastag rostkötegeken kívül elhelyezkedő NADHd-pozitív neuronok környezete sem tartalmaz AChE-t (nyíl: NADHd-pozitív magányos neuron). Nagyítás: 200x-os.
- g. A kétszeresen jelölődött neuronokban (n) a csapadékok (NADHd: lila; AChE: barna) kolokalizációja is jól megfigyelhető. Nagyítás: 800x-os.



8. ábra

A GIF, mint a monoamin transzmitterek lokalizálási lehetősége

- a. Magányos entero- endokrin sejt a nyelőcső területéről.
Nagyítás: 300x-os.
- b. A gyomor területén az entero-endokrin sejtek csoportokba
tömörülnek. Nagyítás: 150x-es.
Insert: Két entero-endokrin sejt erősebb nagyítással.
Nagyítás: 300x-os.
- c. A vékonybél területén fluorescens rostkötegek figyelhetők
meg. Nagyítás: 150x-es.
- d. A rostok lefutásának fő iránya párhuzamos a bélcsatorna
hossztengelyével. Nagyítás: 150x-es.
- e. Bipoláris jellegű neuron a középbél területéről. Nagyítás:
150x-es.
- f. Unipoláris jellegű neuron a patkóbél területéről. Nagyítás:
150x-es.
- g. Fluoreszcens rostköteg a vékonybélből. A rostok helyen-
ként varikozusak: két sejttest (nyíl) is megfigyelhető a
kötegek között. Nagyítás: 150x-es.



g. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei

1. Nyelőcső

A nyelőcső területén az izomsejtek között többnyire néhány (3-6) axonból álló profilsoportokat találunk (9a ábra). A profilok az izomsejtek között általában egymás mellé rendeződnek (9b ábra). Ilyenkor a Schwann-sejtes boríték gyakran még megfigyelhető a profilok körül. A profilok felszíne a neuromuszkuláris kapcsolat helyén csupasz; néha a membránhoz kitapadt szemcsét is megfigyelhetünk (9c ábra). A profilokban leggyakrabban agranuláris vezikulákat (AGV) láthatunk. Nem ritka azonban az ún. nagy granulált magvú vezikula (LGV) sem. Olykor egyazon profilban mindkét vezikulatípus megfigyelhető (9d ábra). A neuromuszkuláris kapcsolat területén az axonprofilok mintegy 80-100 nm-nyire közelítik meg az izomsejtek membránját (9e ábra, insert). E területeken egymás mellett olykor 5-6 igen eltérő vezikulapopulációjú axonprofil is felismerhető. AGV és LGV itt is látható egyazon profilban; emellett találunk tiszta AGV-s, illetve AGV+DCV-s profilt is (profilok típus szerinti megoszlását a 6. táblázatban foglaltuk össze).

Egy-egy vastagabb, mintegy húsz axont tartalmazó rostköteget a Schwann-sejtes burkon kívül még egy

erős kötőszövetes állomány is körülvesz (10a ábra). Ezekből a vaskosabb törzsekből induló axonok néha egyszerre több ponton kerülnek közel egyazon simai-zomsejt szomszédos nyúlványaihoz: a két membrán közti távolság azonban itt sem csökken 100 nm alá (10c ábra).

A nyelőcsőben velőhüvellyel rendelkező axonokat - igaz, nagyon ritkán - is találunk. Ilyen típusú axonok csak a bélcsatorna e szakaszán figyelhetők meg (10b ábra). Az axonok közvetlen környezetében megtaláljuk azokat a Schwann-sejteket, amelyek valószínűleg részt vesznek e rostok hüvelyének képzésében. A velőhüvelyes axonok szomszédságában velőhüvely nélküli rostokat nem láttunk: a velőhüvelyes axonok külön kötegeket alkotnak.

2. Gyomor

Ahogy azt a fénymikroszkópos vizsgálatok során megismerhettük, a béka bélcsatorna esetében csak a gyomor rendelkezik figyelemreméltó (mintegy 50 μm) muscularis mucosae réteggel. A myenterikus plexussal való összehasonlítás megkívánta, hogy ezt az izomréteget beidegző plexus submucosust is vizsgálat tárgyává tegyük.

α . A gyomor muscularis mucosae rétege

Az itt elhelyezkedő izomsejtek haránt átmérője (5-8 μm) kisebb, mint a t. muscularis izomsejtjeié (12-14 μm). Az izomsejtek egymástól viszonylag távol helyezkednek el, a kötőszövetes állomány fejlett

(11a ábra). A sejtek helyenként nyúlványosak: a szomszédos sejtek nyúlványai érintkezhetnek egymással. Ehhez az izomréteghez igen erős, de idegsejteket nem tartalmazó plexus húzódik (11b ábra). A rostokat jól láthatóan a Schwann-sejtek citoplazmája öleli körül. Az axonokban több vezikulatípus különíthető el. A legtöbb rost kis átmérőjű (150-450 nm). A vastag idegtörzsek ezután elágazódnak és az egyes izomsejtek, valamint a nyálkahártya mirigyeinek ellátására már jóval kisebb axonkötegek szolgálnak (11c ábra). A rostok egy része elveszti Schwann-hüvelyét és csupán az axon membránja határolja az axoplazmát. E részben csupasz felszínű profilokban a vezikulatípusok is megfigyelhetők (11d ábra). Az un. nagy granuláris vezikulum (LGV) kétféle eloszlásban figyelhető meg: homogén populációt képezve, vagy pedig kis AGV-vel együtt fordul elő. E vezikulum alakja meglehetősen hasonlít a DCV-hez, de amíg a DCV átlag 60-80 nm átmérőjű, addig a LGV elérheti a 150-200 nm átmérőt is. Mindkét vezikulatípus "magja" változó denzitású lehet; ez a megállapítás különösen igaz a LGV-re. A profilok típus szerinti megoszlását a 6. táblázatban foglaltuk össze.

A simaizomsejtek közelében az axonok membránja rövidebb-hosszabb szakaszokon elveszti a Schwann-burkot: a profilok szabaddá válnak (12a ábra).

Az axolemma és az izomsejt membránja közötti távolság mintegy 0,5-1,0 μm lehet.

Entero-endokrin sejtek (12b ábra)

Bár az entero-endokrin sejtek elhelyezkedésüket tekintve a hámrétegben található, mégsem hagyhatjuk őket figyelmen kívül, mert - különösen a gyomor esetében - a muscularis mucosae réteg izomsejtjeire erős hatást fejthetnek ki. A gyomor hámjában, inkább a lamina propria felőli oldalon, a muscularis mucosae rétegétől mintegy 10-40 μm -nyi távolságban található meg ezek a sejtek, viszonylag nagy gyakorisággal. Ultrastrukturájukra jellemző, hogy jól fejlett bab alakú sejtmaggal rendelkeznek. A mag kromatin-eloszlása egyenletes. A citoplazmaszegély vékony, benne jól fejlett Golgi-apparátust, kevés rER-t és mitokondriumokat találunk. A plazmában nagy számban fordulnak elő denz magvú szemcsék, amelyek erős biológiai hatású anyagokat tartalmaznak.

β . A tunica muscularis szerkezete és beidegzése

A tunica muscularis felépítése más, mint a vékony muscularis mucosae rétegé. Az izomsejtek átmérője itt lényegesen nagyobb (5-8 μm helyett 12-14 μm). Az izomsejtek helyenként junkcionális kapcsolattal illeszkednek egymáshoz (13a ábra). A közöttük elhelyezkedő kötőszöveti elemek mennyisége kevés, csak helyenként találunk párhuzamosan rendezett kötőszöveti rotokat. Az izomsejtek hosszmérete is nagyobb, mint

a muscularis mucosae-ban: egyes sejtek a 200 μ m-es hosszúságot is meghaladják. A tunica muscularis sejtjei kevesebb általános sejtorganelumot tartalmaznak, mint a muscularis mucosae sejtjei, viszont filamentáris elemekben lényegesen gazdagabbak. Az egyes izomsejtrétegek között gyakran észlelünk sok axonból álló vaskos idegkötegeket (13b ábra). A plexus fő törzse, mint azt fénymikroszkópos vizsgálataink alapján megállapítottuk, nem a körkörös és hosszanti izomréteg között, hanem a hosszanti izomrétegen kívül, a subserosa laza kötőszövetes, kevés sejtet és rostot tartalmazó állományába van beágyazva (13c ábra).

Innen indulnak az izomréteg belsejébe azok az erőteljes axonkötegek, amelyek a Schwann-sejtek plazmájába ágyazódva érik el célsejtjeiket. A Schwann-sejtek a plexus fő törzsét mind az izomréteg, mind a subserosa kötőszövetes állománya felől körülveszik. Ebben a fő plexustörzsben foglalnak helyet a myenterikus plexus intrinsic neuronjai. Az intrinsic neuronok körül terjedelmes neuropilt figyelhetünk meg (14. tábla). Szinapszist eddig sem a myenterikus neuronok testén, sem a neuropilben nem találtunk. A perineuronális plexus idegelemeinek átmetszetét két csoportba oszthatjuk: vannak olyan profilok, amelyek tartalmaznak vezikulákat, és vannak olyanok, amelyek nem. A vezikulákat tartalmazó elemek nagy

valószínűséggel axonok, míg a vezikulát nem tartalmazók is lehetnek axonok, illetve a myenterikus neuronok dendritjei. A dendritek átmetszetei egyes ultrastrukturális jegyek alapján (pl. ER, riboszóma tartalom) az esetek egy részében azonosíthatók.

A myenterikus neuronok körüli neuropil jellemzőit (a vezikulatartalomra és a vezikulaszámra vonatkozóan) a 6. táblázatban tüntettük fel. Feltűnő, hogy az AGV-t és FV-t tartalmazó profilok száma igen alacsony, ugyanakkor sok LGV-s és DCV-s átmetszetet ismerhetünk fel. Nem nagy a különbség a vezikulák számarányát tekintve: míg az LGV+DCV szám 278, addig az AGV+FV 207; a vezikulaarány tehát közelítően 4:3.

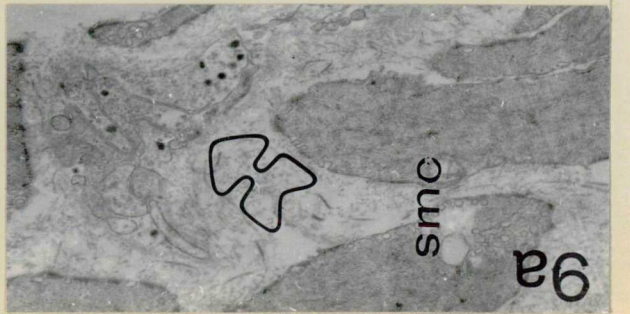
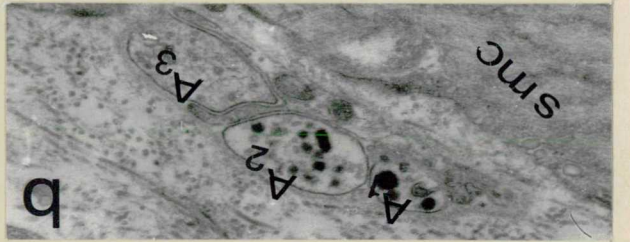
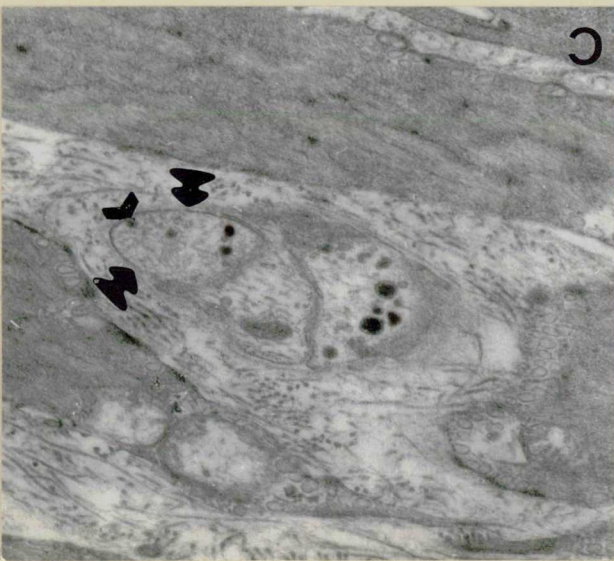
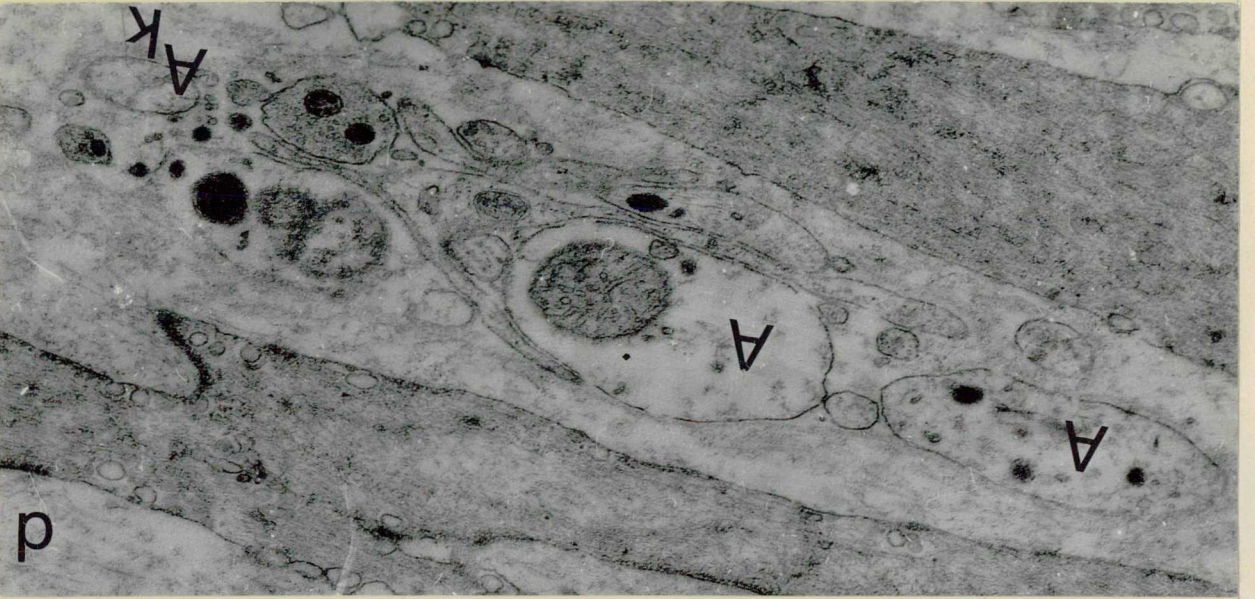
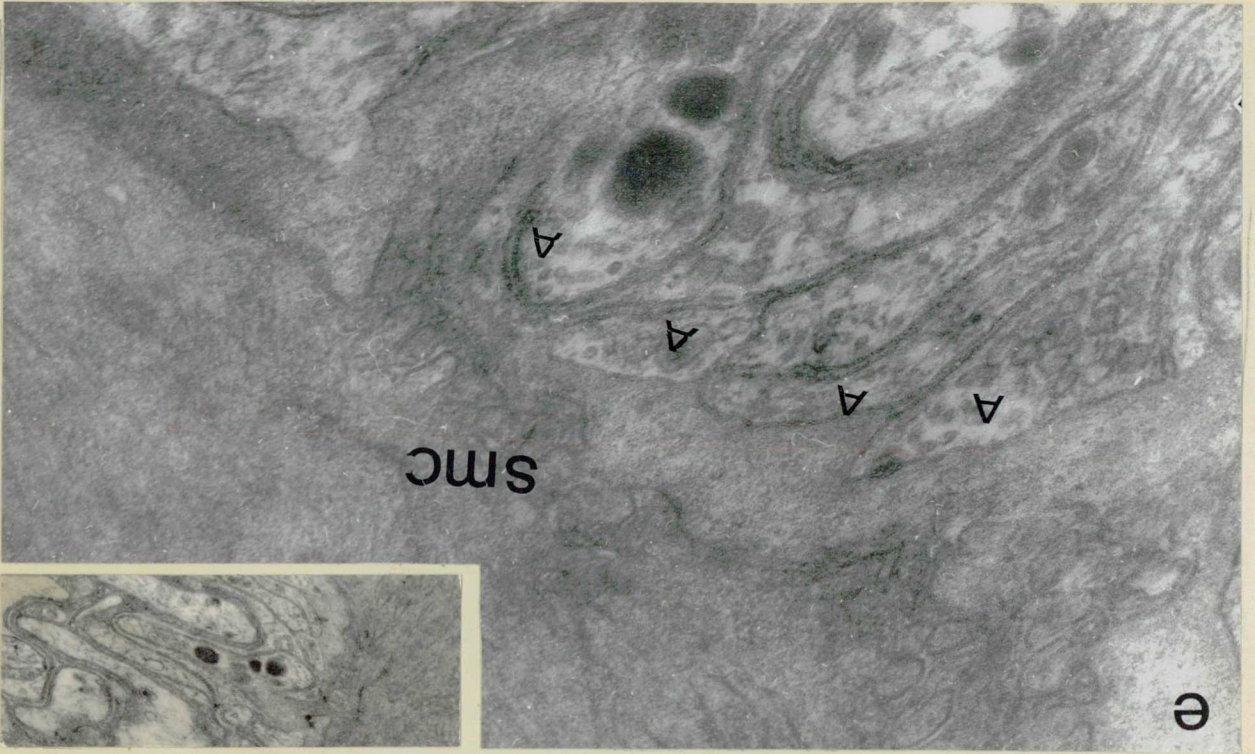
A 15. tábla felvételei a gyomorplexus egy, az izomsejtek közé behatoló részletét mutatják. Gyenge nagyításnál is világosan látható, hogy a plexus azon részletei, amelyek az ingerület átadásában játszanak szerepet, erősen megközelítik az izomsejteket, és az itt található axonok nagy része "csupasz": axolemmájukon nincs Schwann-hüvely (15a ábra). A profil- és vezikulapopulációt értékelve megállapíthatjuk, hogy a LGV-t tartalmazó profil a legtöbb.

Vezikulaszám szempontjából is az LGV populáció a legnépesebb. Az LGV+DCV vezikulaszám felülmúlja az AGV+FV-t; arányuk 3:2. A számlálásra vonatkozó részletes adatok a 6. táblázatban találhatóak meg.

9. ábra

A nyelőcső myenterikus plexusának ultrastruktúrája I.

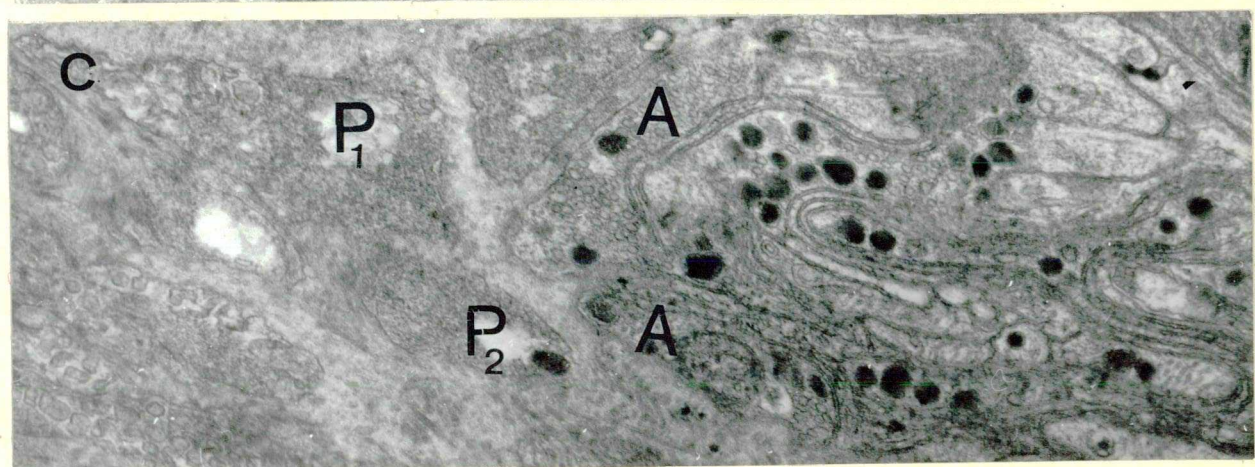
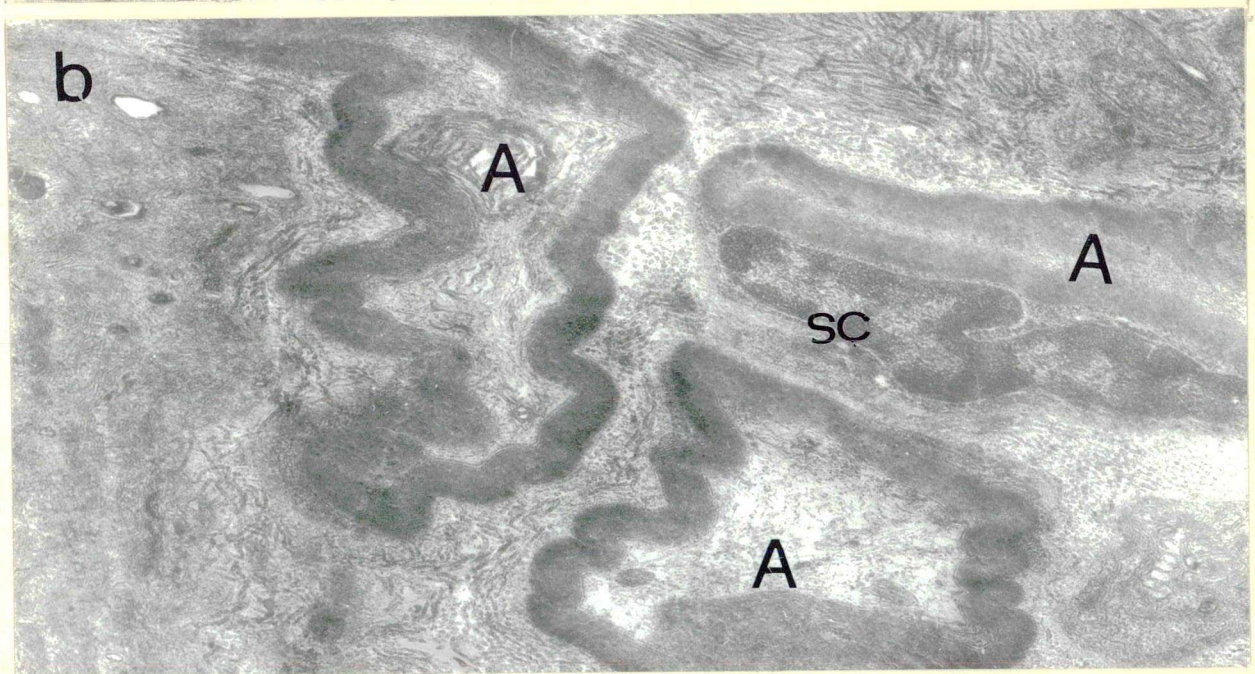
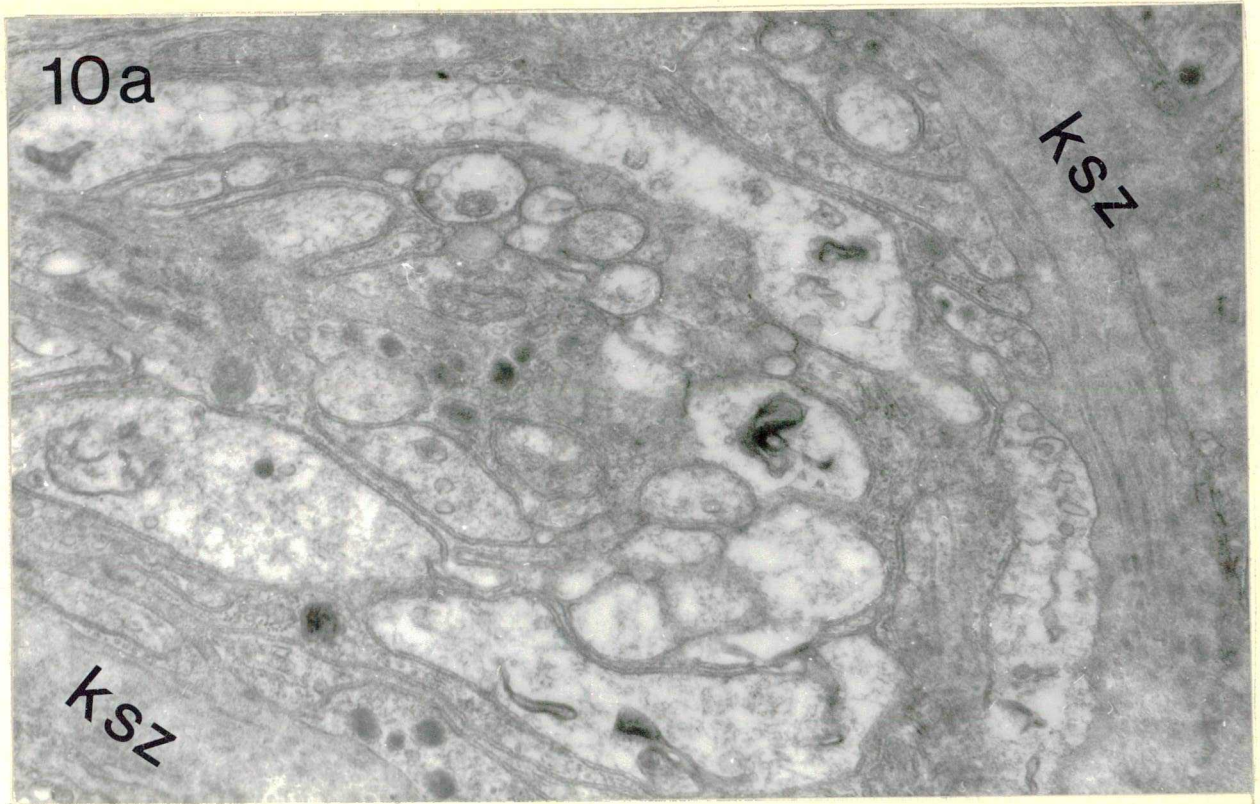
- a. Az izomsejtek között három-hat axonból álló profilocsoportokat látunk. smc: simaizomsejt, üres nyíl: profilocsoport. Nagyítás: 12500x-os.
- b. A profilok egymás mellé rendeződnek. A_1 , A_2 , A_3 : axonátmetzetek, smc: simaizomsejt. Nagyítás: 17500x-os.
- c. A profilok felszíne a neuromuszkuláris kapcsolat helyén csupasz (nyíl). Nyílhegy: az axon membránjához kitapadt szemcse. Nagyítás: 17000x-os.
- d. A profilok vezikulapopulációja gyakran vegyes. A: axon A_k : kevert vezikulapopulációjú profil. Nagyítás: 22000x.
- e. Egymáshoz szorosan illeszkedve kerülnek közel a profilok (A) azonos helyen az izomsejt (smc) membránjához. Nagyítás: 15000x.



10. ábra

A nyelvőcső myenterikus plexusának
ultrastruktúrája II.

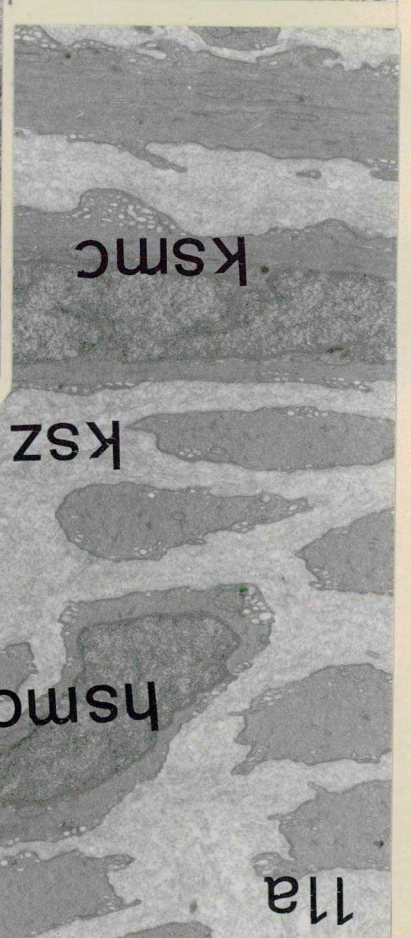
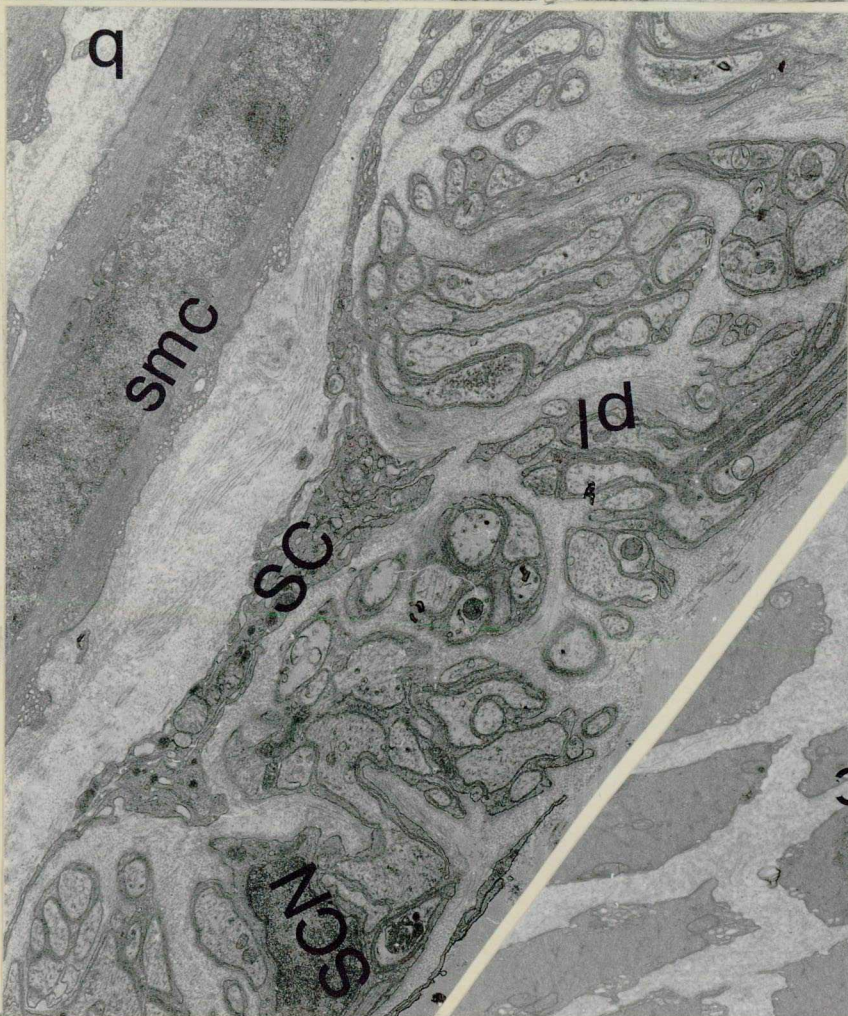
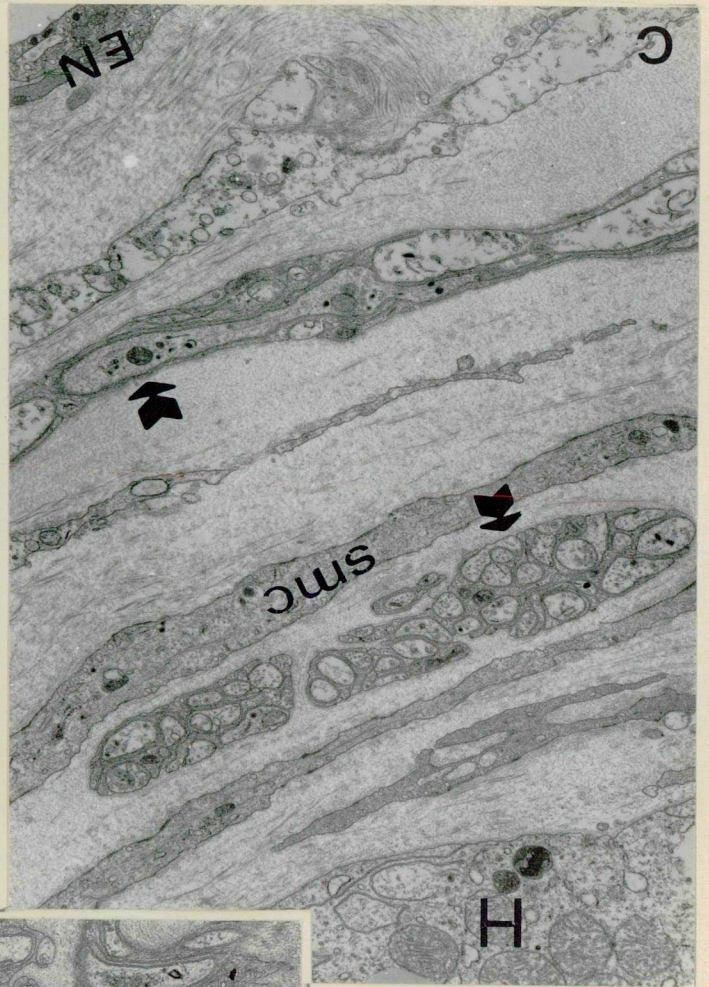
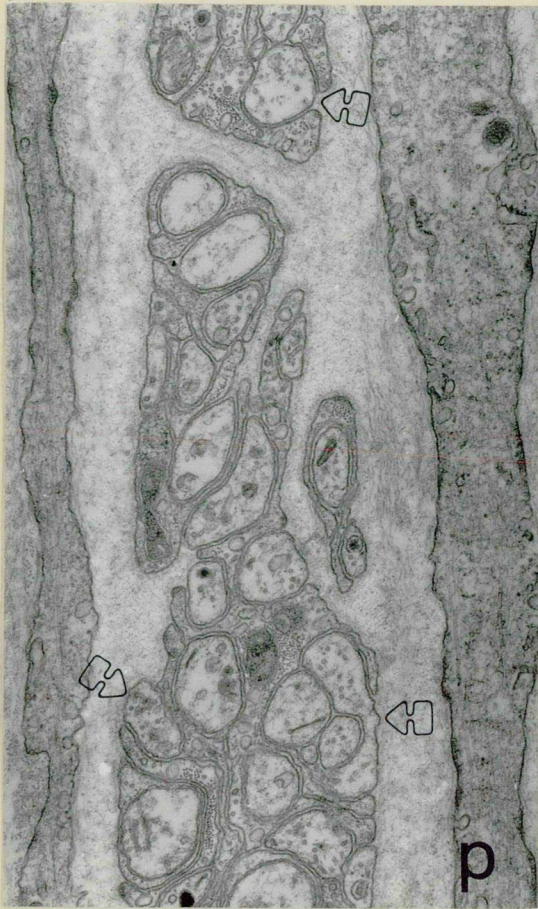
- a. Erős axonköteg átmetszete. A köteget vaskos kötőszövet (ksz) veszi körül. Nagyítás: 45000x.
- b. Myelinizált axonok (A) egy Schwann-sejt (SC) közvetlen közelében. Nagyítás: 31000x.
- c d. Több axon is megközelíti egyazon izomsejt szomszédos nyúlványait. A: axon, P_1 és P_2 : ugyanazon izomsejt két szomszédos nyúlványa. Nagyítás: 45000x.



11. ábra

A gyomor submucosus plexusának ultrastrukturális jel-
legzetességei I.

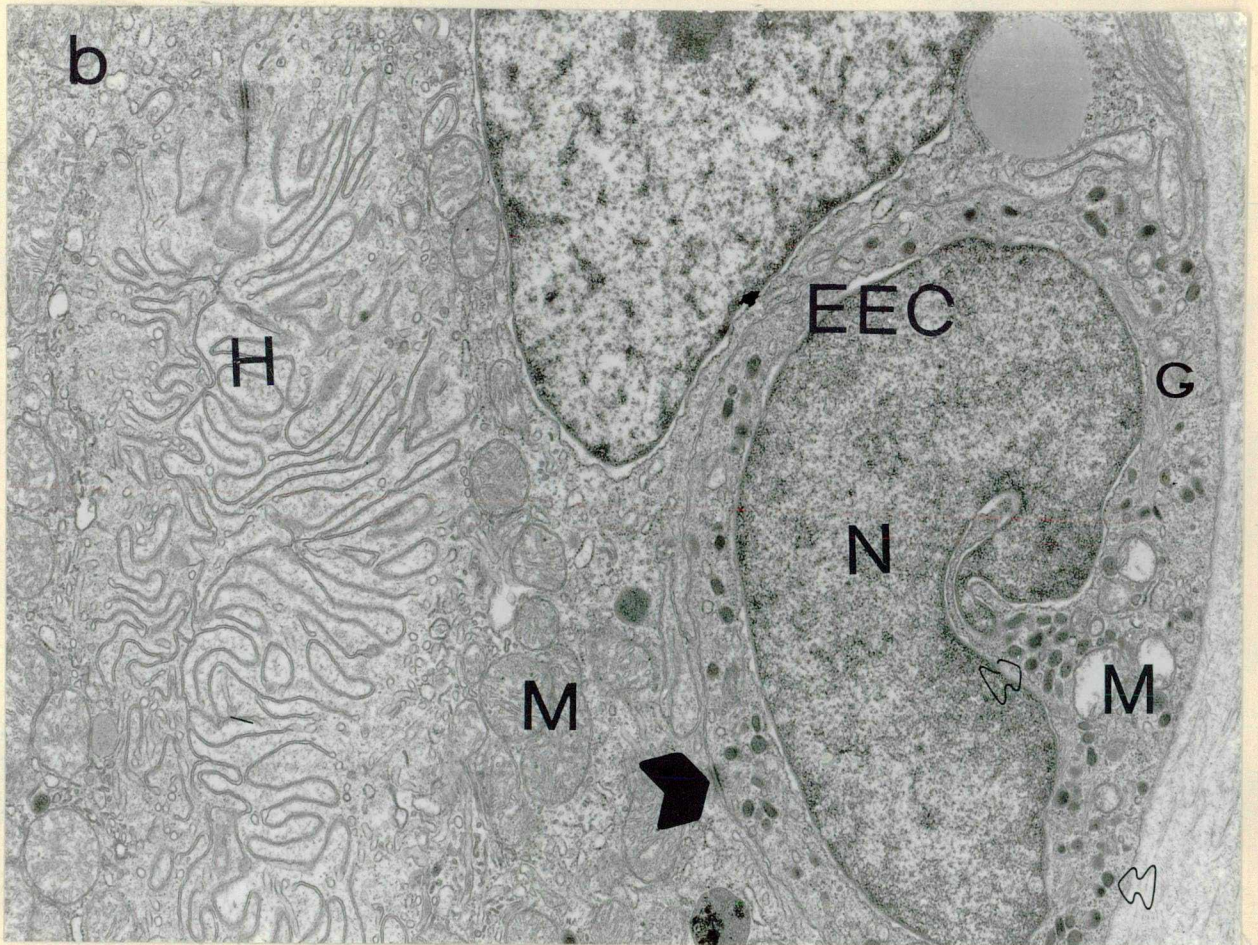
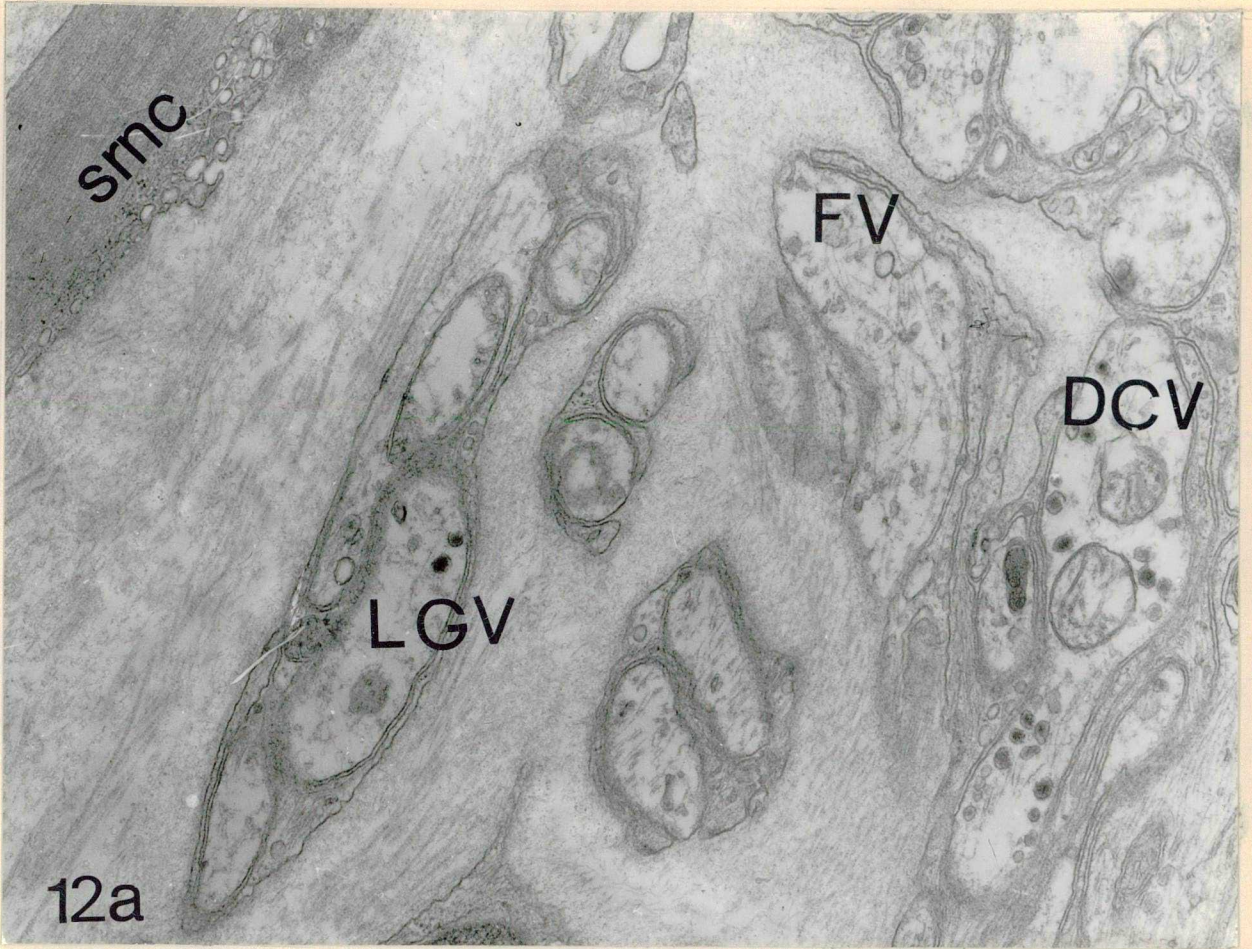
- a. A muscularis mucosae hosszanti és körkörös izomréteg-
ből épül fel. ksmc: körkörös simaizomsejt, hsmc: hosz-
szanti simaizomsejt, ksz. kötőszöveti alapállomány.
Nagyítás: 8300x.
- b. A plexus (pl) idegsejteket nem tartalmaz. SCN: Schwann-
sejt magja, smc: simaizomsejt, SC: Schwann-sejt cito-
plazmája. Nagyítás: 8300x.
- c. Az egyedi izomsejtek (smc) és a hámréteg (H) mirigyei-
hez kisebb rostkötegek (nyilak) futnak. EN: endothel.
Nagyítás: 8300x-os.
- d. Idegköteg a simaizomsejtek között. Az axonprofilok izom-
sejtek felé tekintő felszíne (üres nyilak) szabad.
Nagyítás: 20000x-os.



12. ábra

A gyomor submucosus plexusának ultrastrukturális jellegzetességei II.

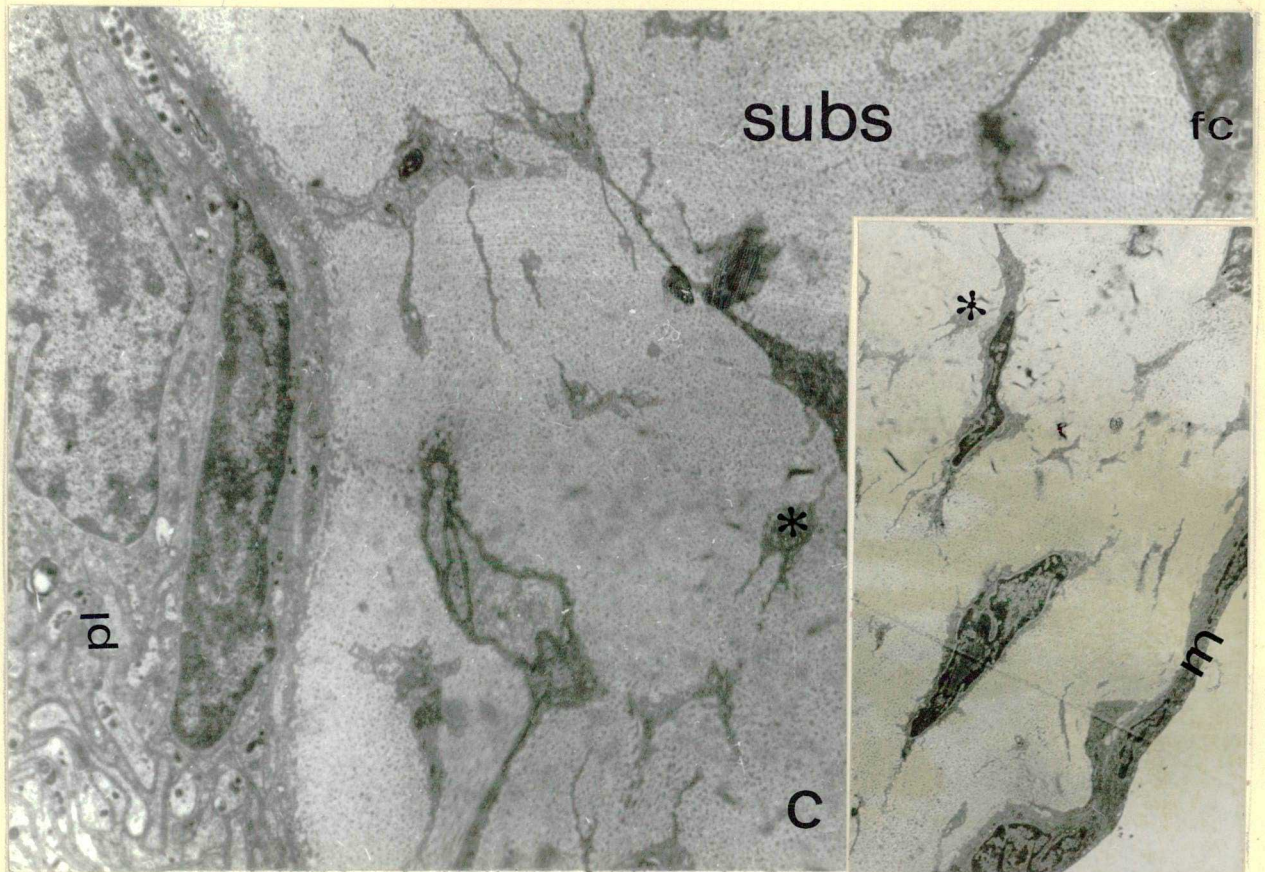
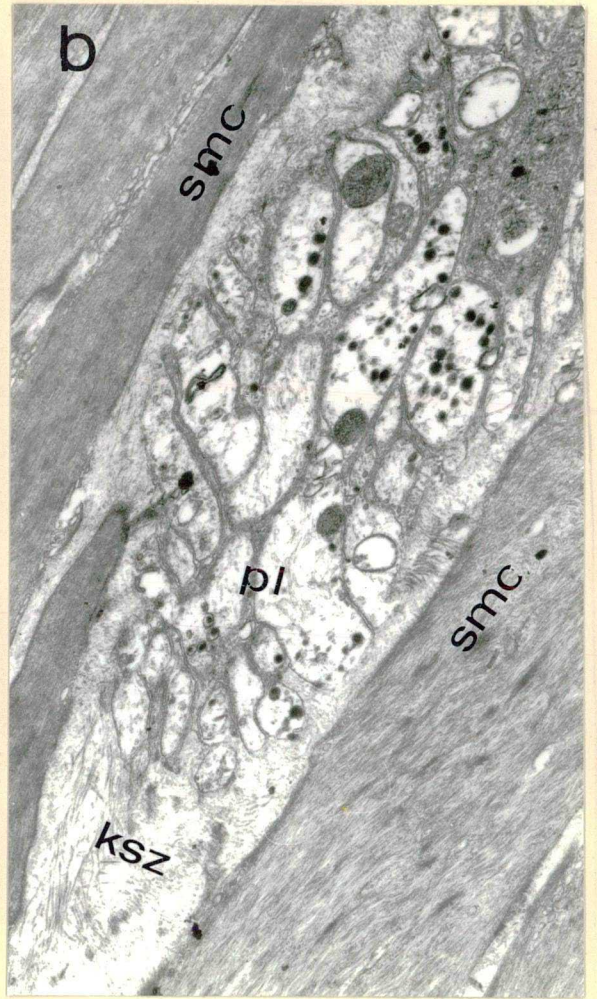
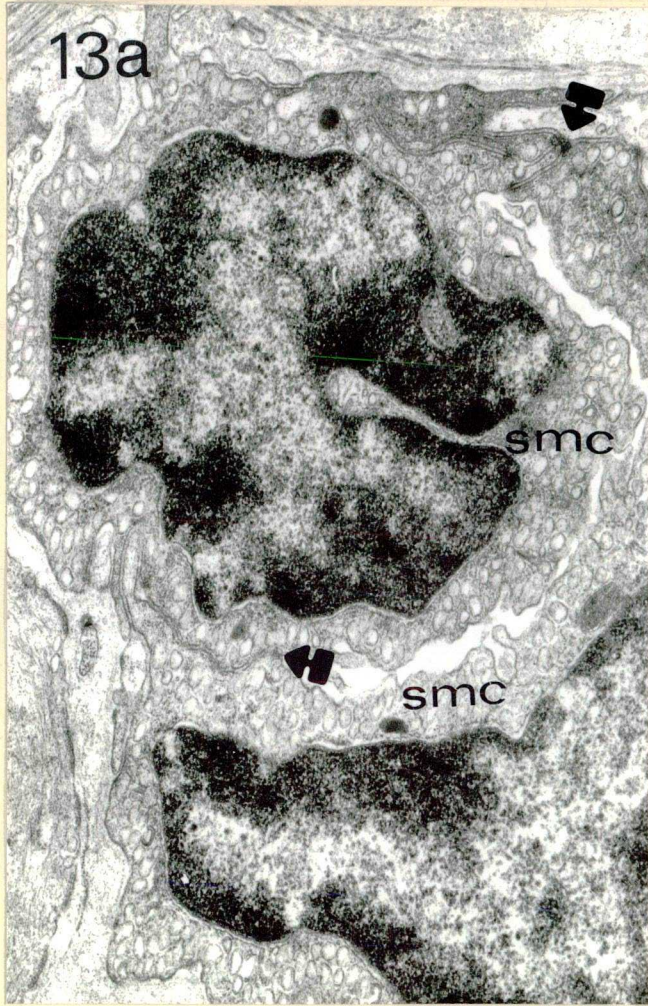
- a. Egyes axonprofilok csak részletesen borítottak Schwann-sejt nyúlványokkal. smc: simaizomsejt. LGV: nagy granulált magvú vezikula, DCV: dense-core vezikula, FV: lapított vezikula. Nagyítás: 25000x.
- b. A hámrétegben (H) elhelyezkedő entero-endokrin sejt (EEC) granulumai (üres nyilak) jól felismerhetők. M: mitokondrium, G: Golgi-apparátus, N: sejtmag, nyílhegy: junkcionális kapcsolat a szomszédos hámsejttel. Nagyítás: 12500x.



13. ábra

A gyomor myenterikus plexusának finomszerkezeti sajátságai

- a. Az izomsejtek hossza és átmérője nagyobb a t. muscularisban, mint a muscularis mucosaeben. A sejtek között gyakran juncionális kapcsolat (nyíl) figyelhető meg. smc: simaizomsejt. Nagyítás: 20000x.
- b. Az idegplexus ott jelenik meg, ahol a kötőszövet mennyisége megnő az izomsejtek között. smc: simaizomsejt, ksz: kötőszövet, pl. plexus. Nagyítás: 12500x.
- c. A plexus fő törzse a subserosa kötőszövetes állományában fekszik. Nagyítás: 8500x. pl: plexus, fc: fibrocita, subs: subserosa, Insert: A kötőszövetes állomány kiterjed a mesothel rétegig. A két ábrán az azonos részleteket csillaggal jelöltük. Nagyítás: 5000x.



14. ábra

Egy myenterikus neuron és a környező neuropil a gyomorból

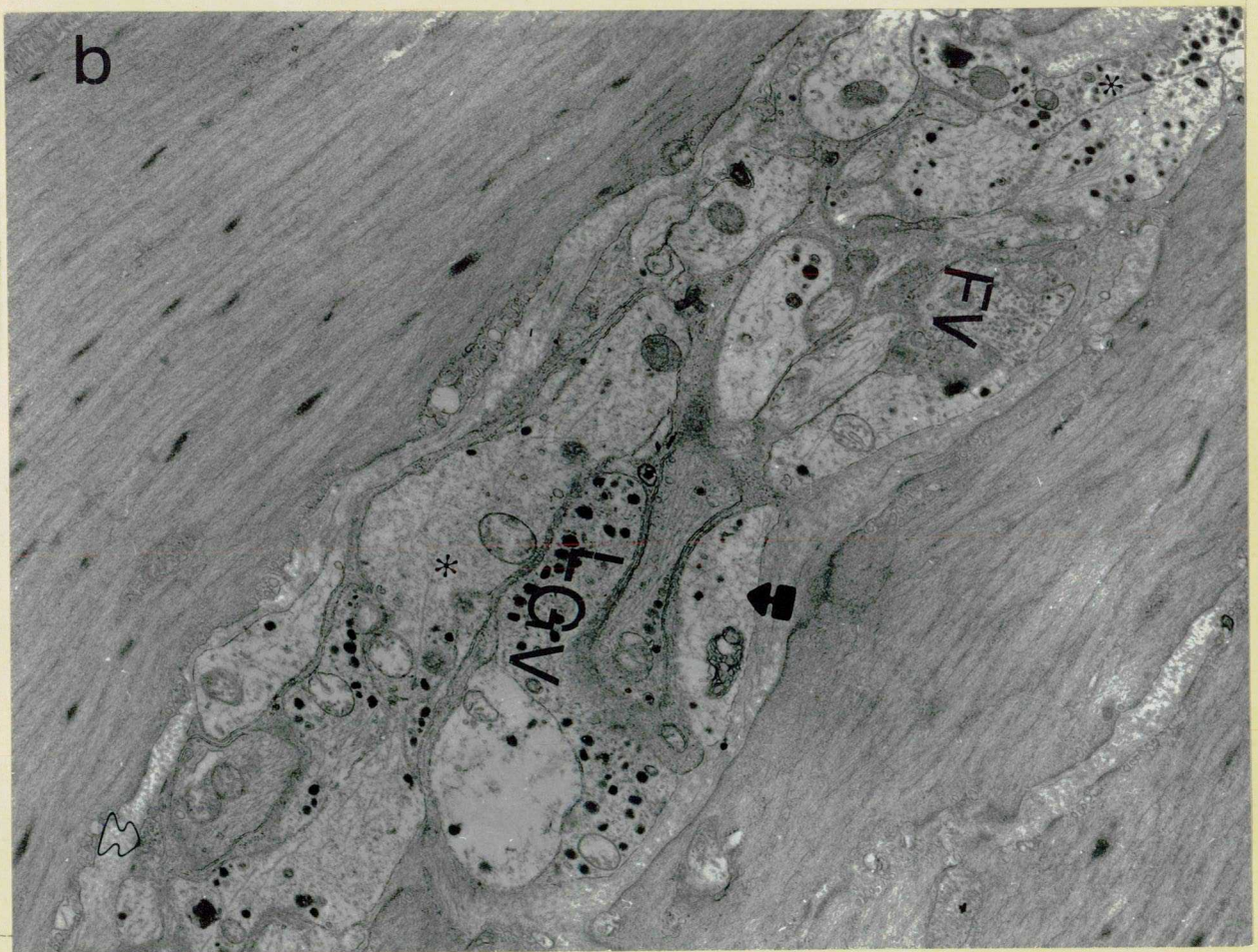
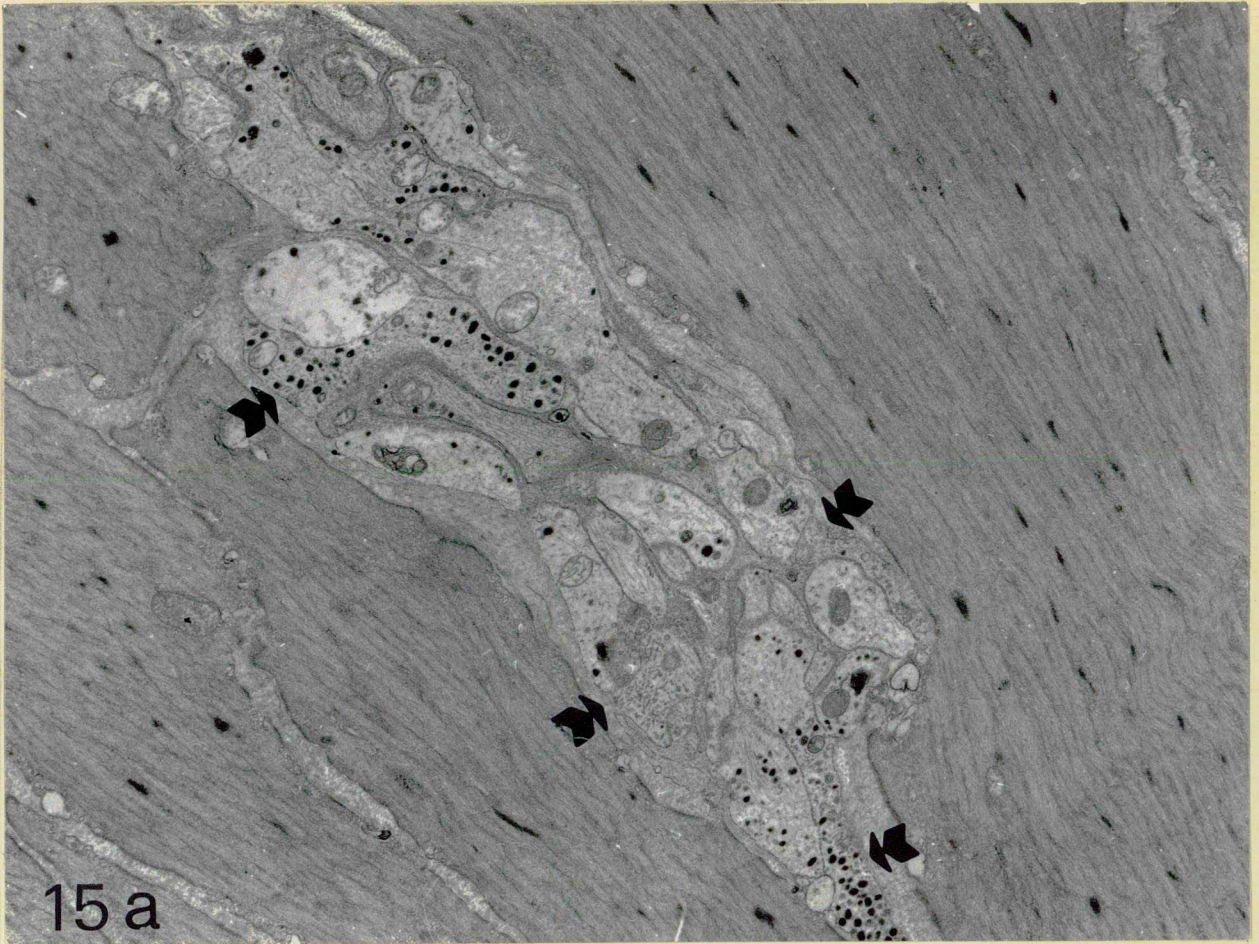
A neuron magja (N) némi marginalis heterokromatint tartalmaz, a perikaryonban a Golgi-apparátus (nyílhegy) és a mitokondriumok (csillag) is jól felismerhetők. Ezen kívül néhány szemcse (üres nyílak) is látható. A plexus két szélét az izomréteg sejtjei és a mezenteriális felszín felé is Schwann-sejtek (SC), illetve azok nyúlványai határolják. A sejtes határréteget kollagén rostokkal (coll) dúsán átszőtt kötőszövet veszi körül. Nagyítás: 12500x.



15. ábra

A gyomor myenterikus plexusának részlete

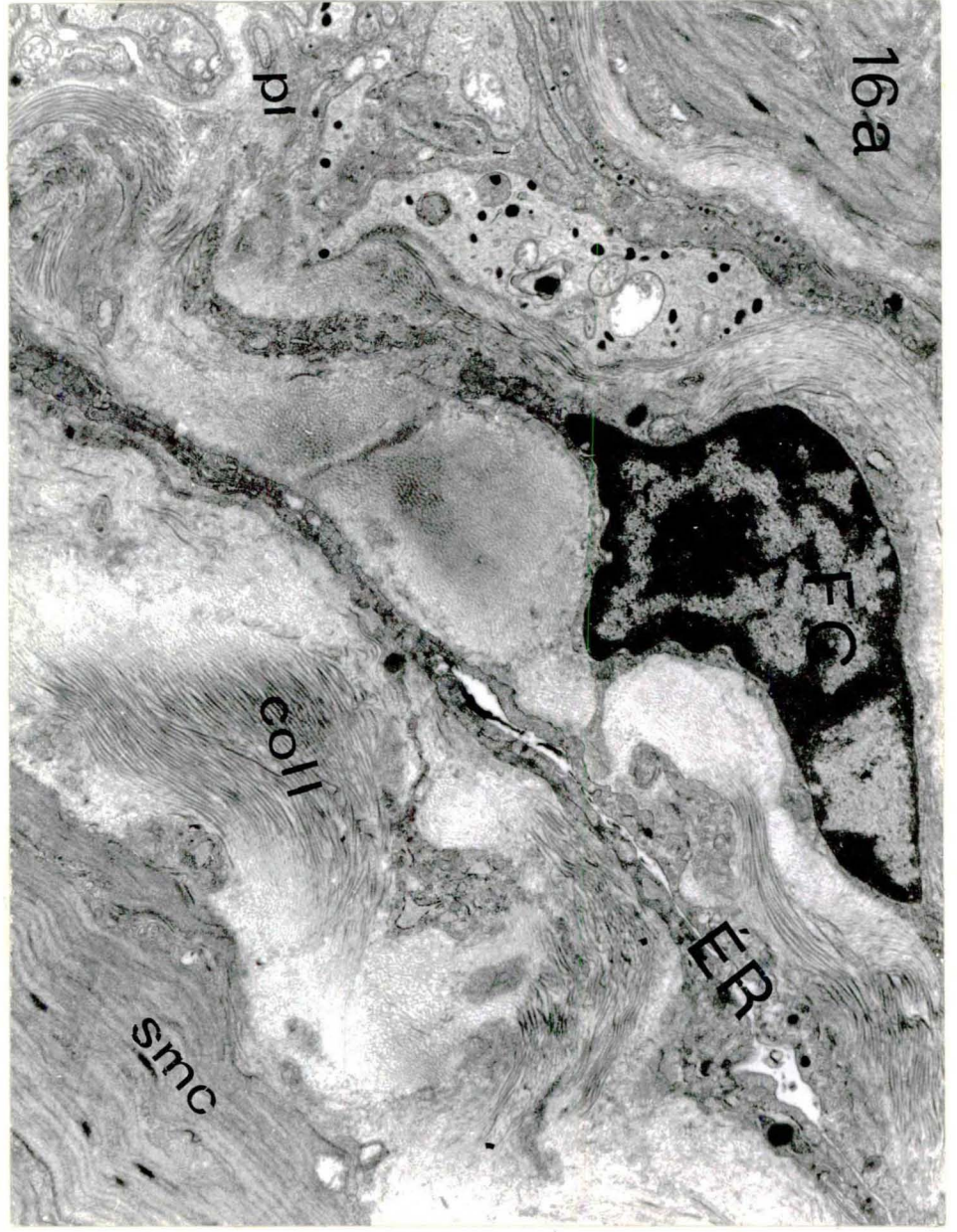
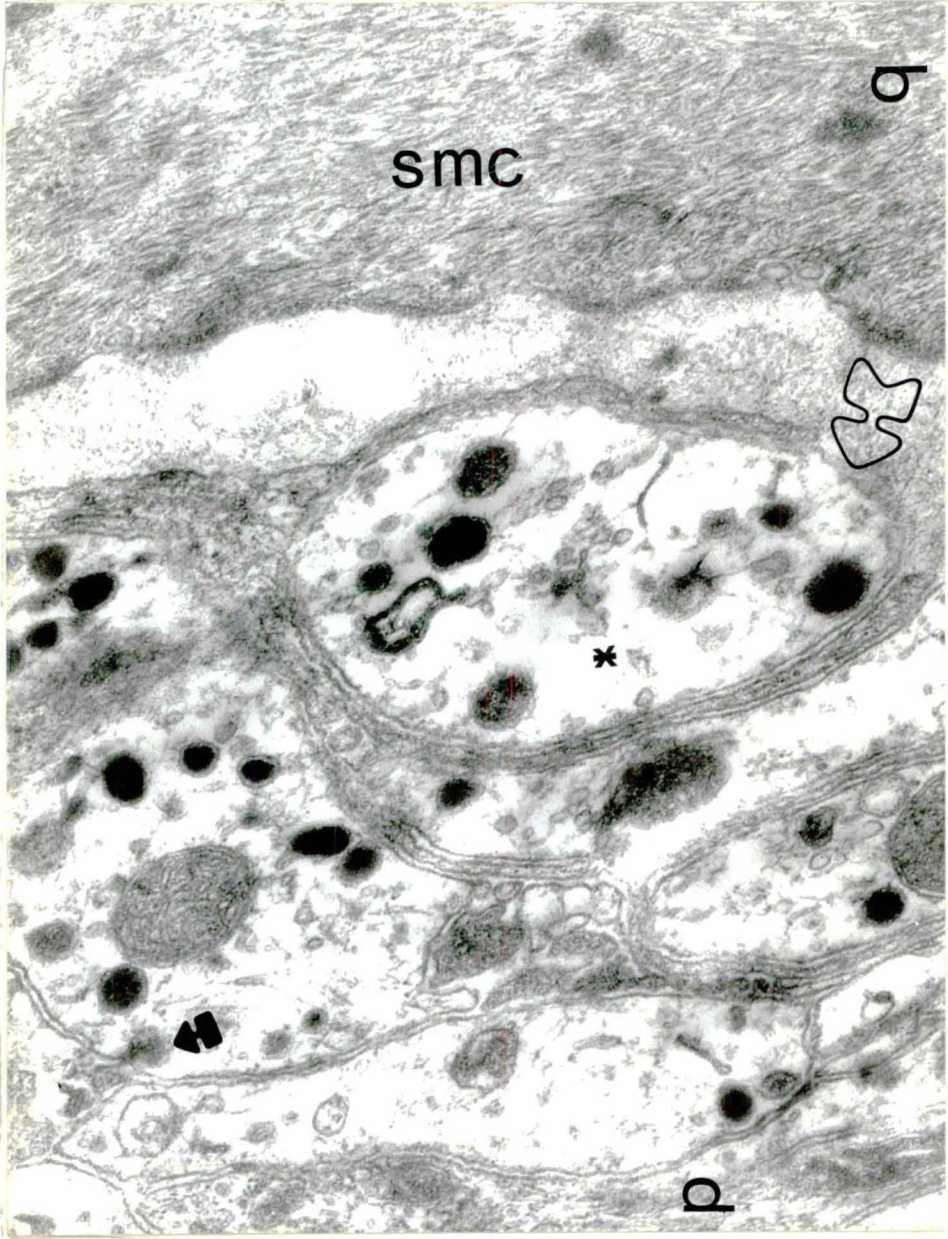
- a. Axonprofilok a myenterikus plexus izomközeli részéből. A csupasz profilokat nyilak jelzik. Nagyítás: 8500x.
- b. A myenterikus plexus azonos részlete. A képen bejelöltük néhány profil vezikulatípusait. üres nyíl: agranuláris vezikula, FV: lapított vezikula, nyíl: dense-core vezikula, LGV: nagy granulált magvú vezikula, csillag: vegyes vezikulapopuláció. Nagyítás: 12500x.



16. ábra

A gyomor myenterikus plexus izomközi részeinek
ultrastruktúrája

- a. A plexus (pl) mélybe húzódó ágait gyakran vérerek (ÉR) kísérik. smc.: simaizomsejt, coll: kollagén rostok FC: fibrocita. Nagyítás: 12500x.
- b. Erős nagyítással jól látható, hogy egy-egy axonprofilban gyakran két vezikulatípus is fellelhető egyszerre (AGV és LGV). Egy profil csupasz felszínét üres nyíllal jelöltük. A szemcsék exocitózissal ürülnek a profilokból (nyíl). smc: simaizomsejt, D: dendrit, csillag: vegyes vezikulatartalmú profil. Nagyítás: 50000x.



Az előbél területén a denz magvú vezikulák (LGV ill. DCV), illetve az ezeket a vezikulatípusokat (is) tartalmazó profilok vannak túlsúlyban.

A myenterikus plexus vaskos ágait gyakran vérerek kísérik az izomrétegben (16a ábra). Az erek környéke sok kollagén rostot tartalmaz: ennél lényegesen kevesebb a rostállomány az izomsejtek között, valamint a subserosa kötőszövetében.

Mint azt a neuronok közötti plexusrészletek leírásakor kifejtettük, nem találtunk szinapszist a plexus elemei között. Ez a megállapítás igaz az izomsejtek közé befutó plexusszakaszra is: eddig ezekben a plexusrészletekben sem észleltünk szinapszist. Néha azonban azt láthatjuk, hogy a vezikulák membránja fuzionál az axolemmával (16b ábra). Így tartalmuk az extracelluláris térbe kerülhet, és diffúzióval eljuthat a célsejtekhez.

A gyomor myenterikus plexusának axonprofiljai között sok olyan átmetszet van amelyik nem egy, hanem legalább két különböző vezikulatípust tartalmaz (16b ábra): ez a tény azt mutatja, hogy ezekben a terminálisokban minimálisan két különböző neurotransmitter van jelen.

3. A patkóbél

Az izomréteg felépítése eltér mind a gyomor muscosae mind a tunica muscularis rétegétől: egészében a kettő közti átmeneti szerkezetet mutatja. Az izom



sejtek mérete (átmérő) átlagosan mintegy 10 μm . E tekintetben tehát inkább a tunica muscularisra emlékeztet, míg az izomelemek közötti bőséges kötőszövet a muscularis mucosae-t idézi.

A myenterikus plexus elemei a külső hosszanti izomrétegbe vannak beágyazva: a rostkötegek innen indulnak befelé a cirkuláris izomrétegbe. Maga a plexus nagyszámú, különböző vezikulákat tartalmazó rostokból épül fel (17a ábra). Schwann-sejtes borítéktól mentes profilok az izomsejteket erősen (kb. 1 μm -nyire) megközelítik (17b ábra). Az izomsejtek között ritkán neuronok is megfigyelhetők (17c ábra). Ezek finomszerkezeti jegyek alapján azonosíthatók: a nagyszámú mitokondrium, a szabad riboszómák jelenléte valamint a világos sejtplazma neuronok jelenlétére utal. A perikaryon és az izomréteg között jelentős kötőszövetes állomány, főleg kollagén rost figyelhető meg.

A plexus rostjai közül sok profil LGV-t tartalmaz (vagy legalábbis LGV-t is), de az AGV tartalmú profilok is csaknem ugyanolyan gyakoriak (18a ábra). A vezikulapopuláció emlékeztet a gyomoréra, a rostpopuláció azonban lényegesen eltér attól (lásd a 6. táblázatot). Ezen a bélszakaszon lényegesen megemelkedik az AGV-s profilok aránya, de változatlanul a LGV a domináns vezikulatípus.

Az idegrostok helyenként szorosan az izomsejtekhez fekszenek, a két membrán között csupán 20-25 nm-nyi rés van (18b ábra). Az izomsejtek nyúlványaikkal

helyenként itt is kapcsolatba lépnek egymással (18c ábra). Az LGV-k igen gyakran az axonok membránjai mentén helyezkednek el, sőt membránjuk gyakran egybeolvad az axolemmával (18d ábra). Olykor az LGV tartalma kikerül az axolemma és a simaizomsejt közötti térbe (18e ábra). A benne lévő anyag ilyenkor diffúzióval eljuthat az izomsejtekig.

4. Vékonybél

A myenterikus plexus kötegei ezen a bélszakaszon sosem olyan vastagok, mint azt a gyomor vagy a patkóbél esetében megfigyeltük. A plexus elemei itt is Schwann-sejtekbe ágyazódva láthatók (19a ábra). Egyes idegrostok körül gyakran többszörösen feltekeredett a Schwann-sejtek membránja (19b ábra). A simaizomsejtek körül sok kötőszövetet találunk, és a plexus fő törzseit is meglehetősen széles kötőszöveti sáv határolja (19c ábra). A vékonybél simaizomsejtjei is nyúlványosak. E sejtek membránjai igen közel kerülhetnek egymáshoz (19c ábra). A simaizomsejtek átmérője meglepően kicsi, gyakran még a 6 μm -t sem éri el. Egyes Schwann-hüvely mentes axonok közel fekszenek ugyan az izomsejtekhez, de axolemmájuk mellett bőséges kollagén rostos állomány helyezkedik el. (19d ábra). A myenterikus plexus profiltípusai, ill. azok vezikulatartalma változatos. Négy alapvető vezikulatípus és számos profiltípus lelhető fel itt (20a ábra). Lényegesen kevesebb LGV-s profilt illetve LGV-t találunk, mint a patkóbél területén (6. táblázat).

A plexus izomsejtek között elhelyezkedő profiljai hasonló vezikulapopulációval rendelkeznek, mint a plexus fő törzsének profiljai. Egyes izomsejtek nyúlványaihoz az axonprofilok mintegy 50 nm-nyi távolságba kerülnek. Az axonokat ezen a területen nem borítja Schwann-hüvely (20b ábra). Az axonok lefutása sokszor párhuzamos az izomsejtekkel; egyes axolemma szakaszok csupaszok míg mások Schwann-sejtes burokkal rendelkeznek (21a ábra). Az un. szoros kapcsolatok területén a két sejt membránja közti távolság 20 nm alá csökkenhet.

5. Utóbél

A myenterikus plexus az utóbélben vaskos kötegek formájában látható az izomsejtek között. Az izomsejtek a bélcsatorna e szakaszán is nyúlványosak haránt-átmérőjük mintegy 8 μm (22a ábra). A plexus profiljai változatos vezikulapopulációjúak és már a gyenge nagyítású képeken is feltűnik, hogy sok LGV-t tartalmaznak.

A Schwann-sejtek nyúlványai nagy területen ölelik körül a plexus 1-1 részletét és ezen kívül egy kötőszövetes tér biztosítja a plexus fő törzsének elválasztását (22b ábra) az izomtól.

A plexus elemei között neuron is felismerhető (22c ábra). A neuronok mellett - de azokkal szinapszist nem létesítve - axonprofilokat láthatunk. A közepes nagyítású felvételek azt mutatják (23a ábra), hogy

az LGV-k mellett az AGV-k is nagy számban vannak jelen a profilokban. DCV és FV alig található (lásd 6. táblázat).

A plexus és az izomsejtek között elterülő kötőszövetes állomány rostokban viszonylag szegény (23b ábra).

Az idegrostok és az izomsejtek közötti távolság a szoros kontaktusok területén nem több, mint 40-80 nm (23c ábra). A profilok membránjához igen közel vezikulák figyelhetők meg.

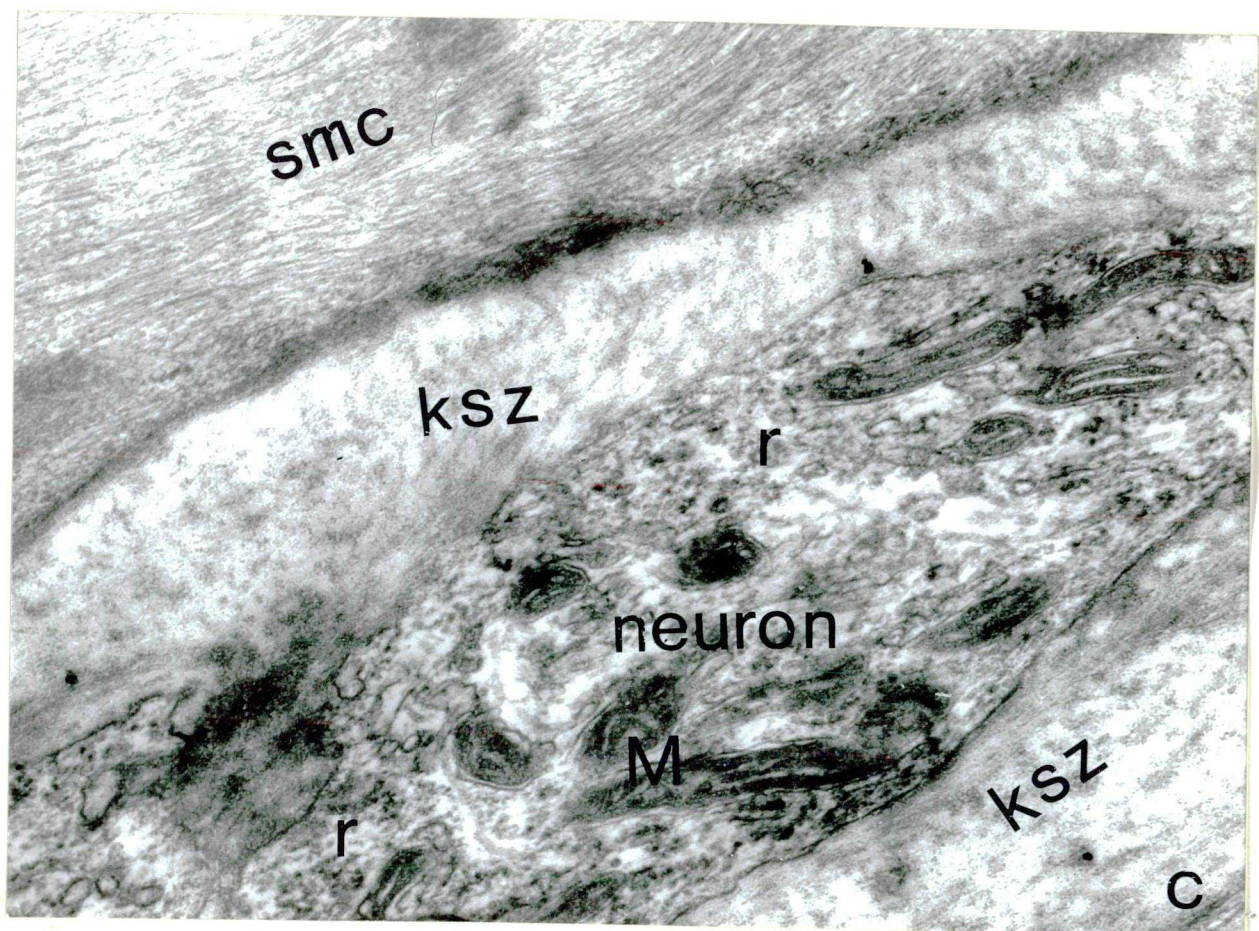
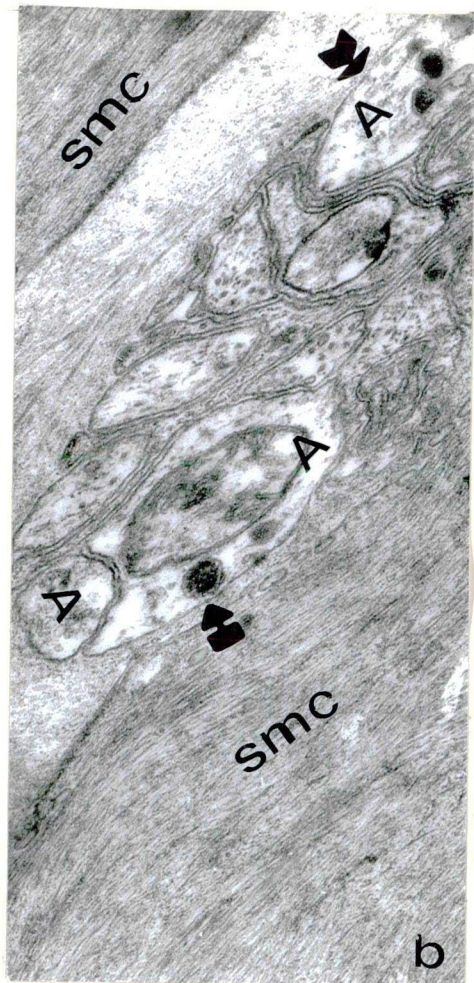
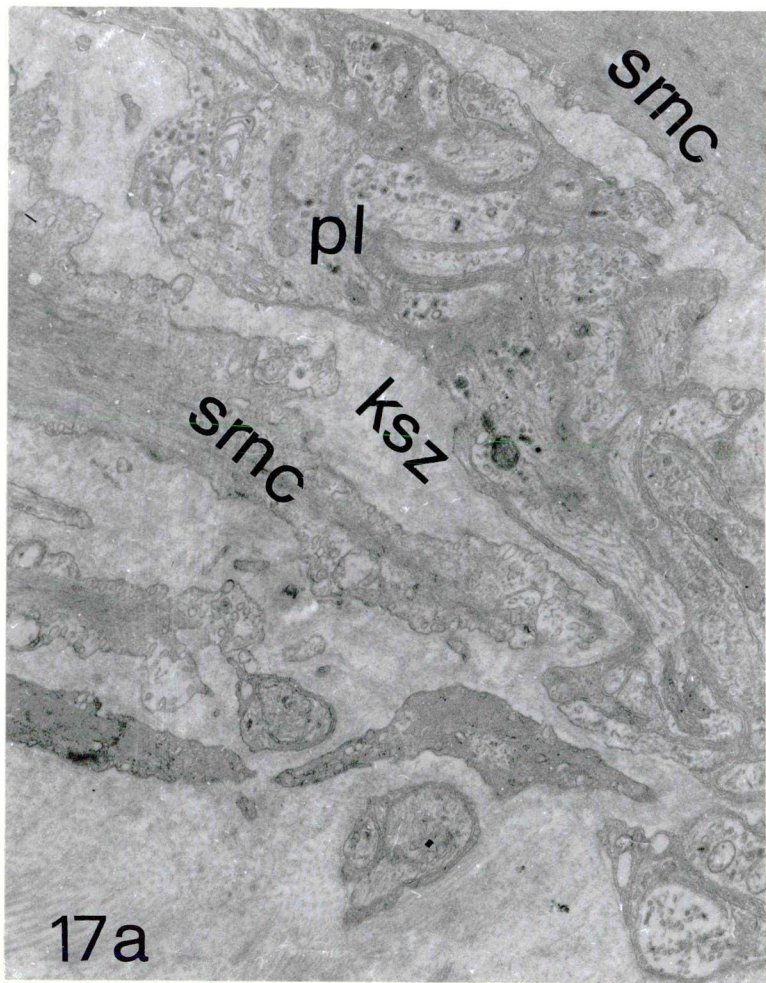
V. Az eredmények megbeszélése

A munkánk során alkalmazott módszerek nagy száma miatt célszerűnek látszik a módszertani tapasztalatokat a tápcsatorna beidegzéséről nyert adatoktól elkülönítve megvitatni, hiszen ezen észrevételek a tápcsatorna minden szakaszára egyaránt vonatkoznak. Ezután az egyes bélszakaszok myenterikus plexusáról nyert eredményeket szeretném összegezni és megvitatni, majd a "Megbeszélés" harmadik részében az egész bélcsatorna innervációjára általános an érvényes problémákat kívánom megvitatni. Ebben az utóbbi fejezetben próbálkozom meg a törzsfajlódástani összehasonlítással is.

17. ábra

A patkóbél myenterikus plexusának ultrastruktúrája I.

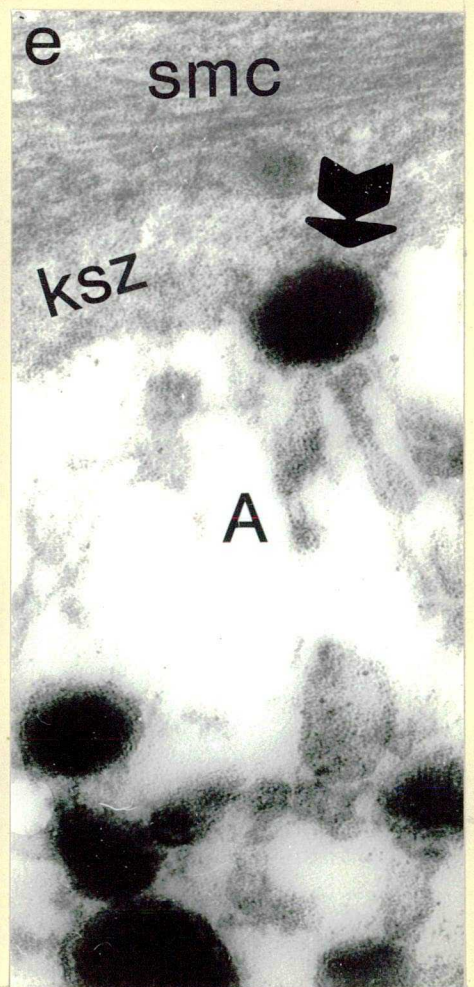
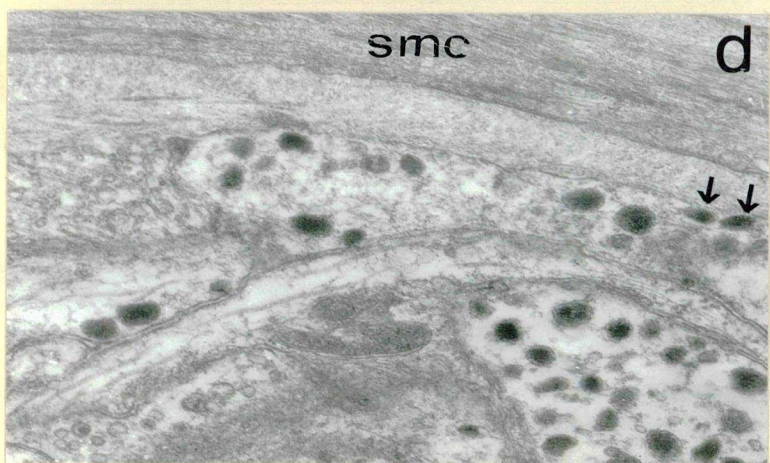
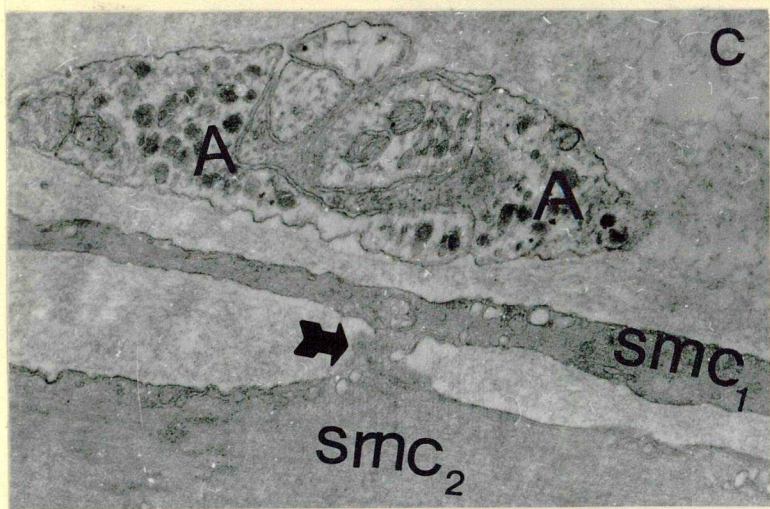
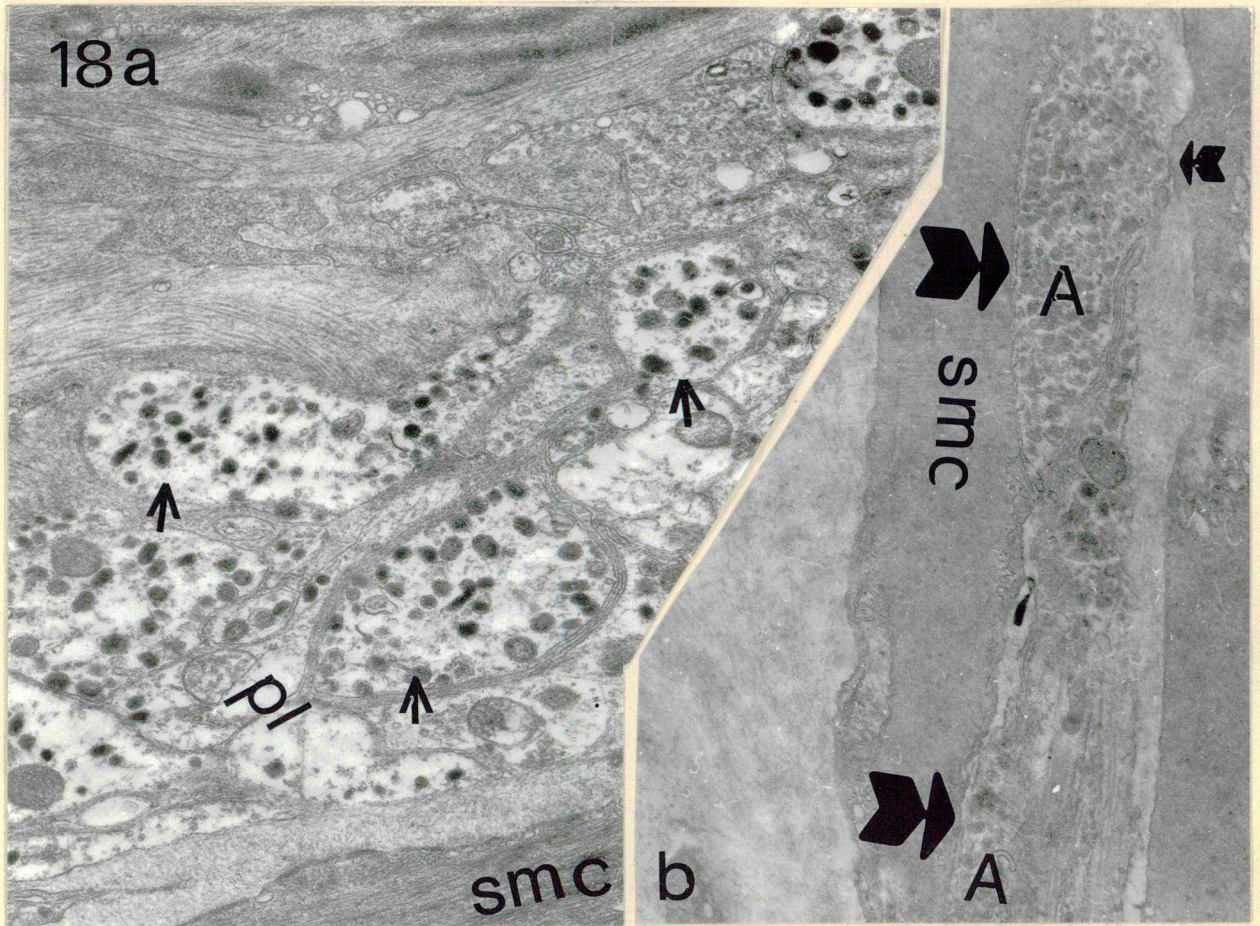
- a. A plexus benyúlik a körkörös izomréteg sejtjei közé. pl. plexus, smc: simaizomsejt, ksz. kötőszövet. Nagyítás: 12500x.
- b. A Schwann-sejtes borítéktól mentes profilok megközelítik az izomsejteket. smc: simaizomsejt, A: axonterminális, nyilak: csupasz profilok Nagyítás: 25000x.
- c. A külső hosszanti izomrétegben neuronok (neuron) találhatóak. Ezek nyúlványai mitokondriumaik (M) és szabad riboszómáik (r) alapján azonosíthatók. ksz: kötőszövet, smc: simaizomsejt. Nagyítás: 50000x.



18. ábra

A patkóbél myenterikus plexusának ultrastruktúrája II.

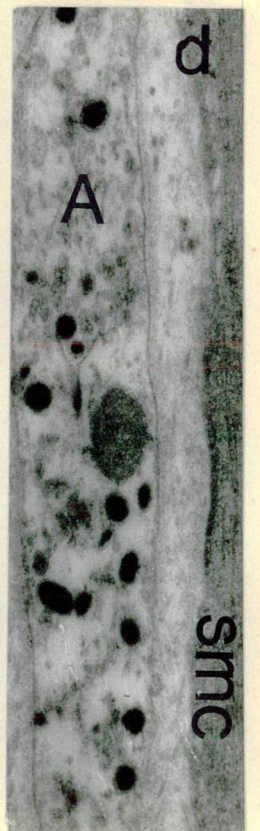
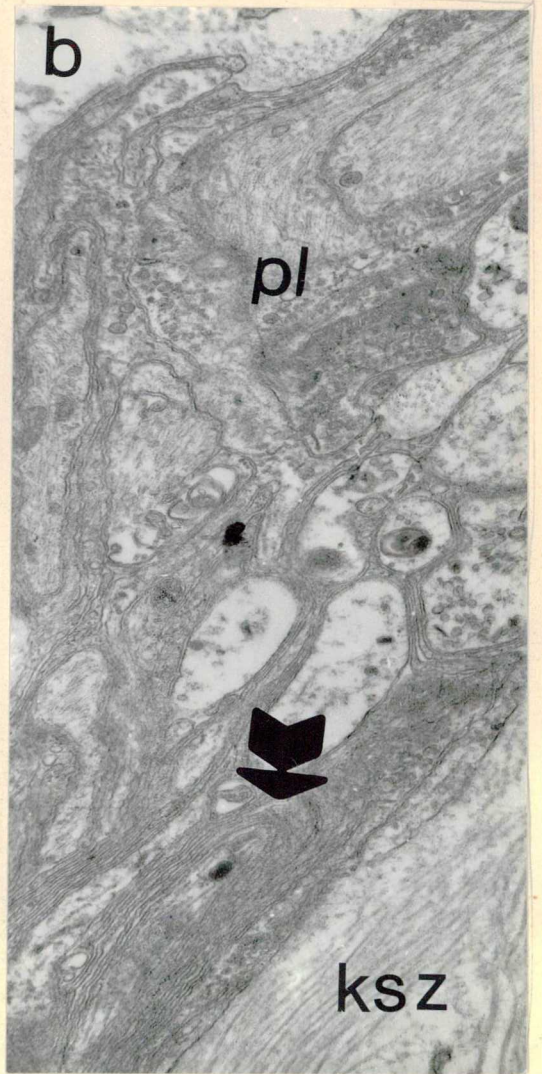
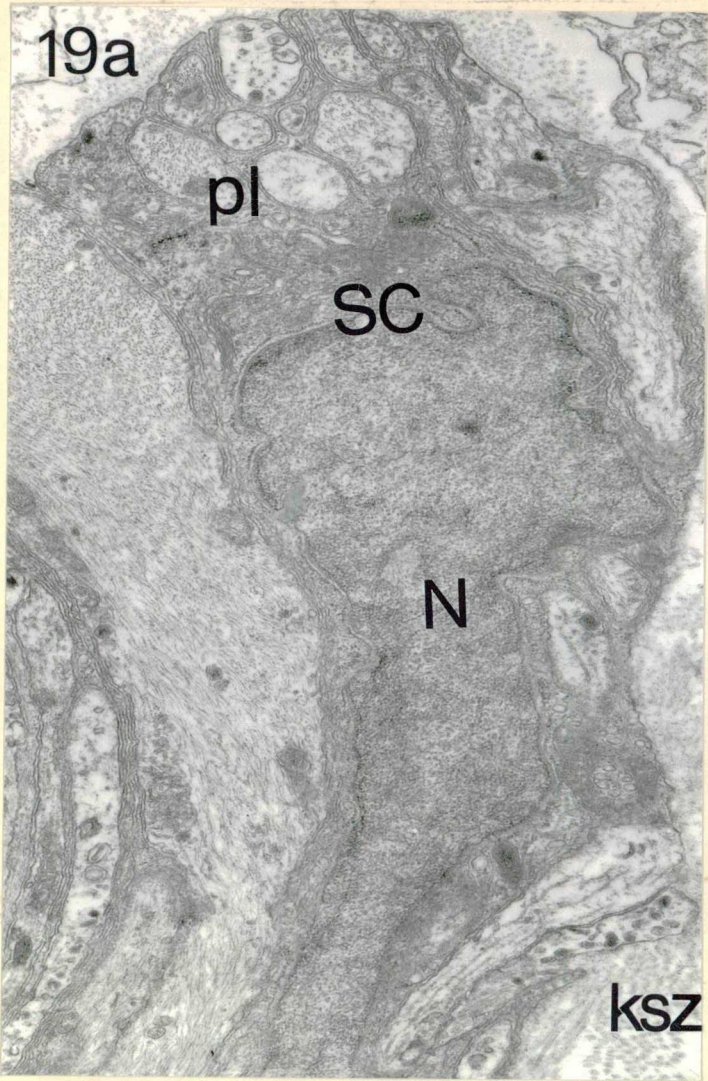
- a. A profilok nagy része tartalmaz LGV-t. smc: simaizomsejt; nyíl: LGV-s profil; pl: plexus. Nagyítás: 17500x.
- b. Az idegvégződések e bélszakaszon gyakran formálnak un. szoros kontaktust. A: axon, nyilak: szoros érintkezés az axonok és az izomsejtek között, smc: simaizomsejt. Nagyítás: 22000x.
- c. A csupasz felszínű axonok (A), melyek főleg LGV-t tartalmaznak, két, nyúlványaival kapcsolódó (nyíl) simaizomsejtet (smc_1 és smc_2) közelítenek meg. Nagyítás: 22000x.
- d. Az LGV-k membránjai néha összeolvadnak az axolemmával. smc: simaizomsejt, nyilak: az axolemmához kitapadt LGV-k. Nagyítás: 30000x.
- e. Az LGV tartalma (nyíl) kikerül az axon (A) és a simaizomsejt (smc) közti kötőszövetes térbe (ksz). Nagyítás: 125000x.



19. ábra

A vékonybél myenterikus plexusának ultrastrukturális sajátságai I.

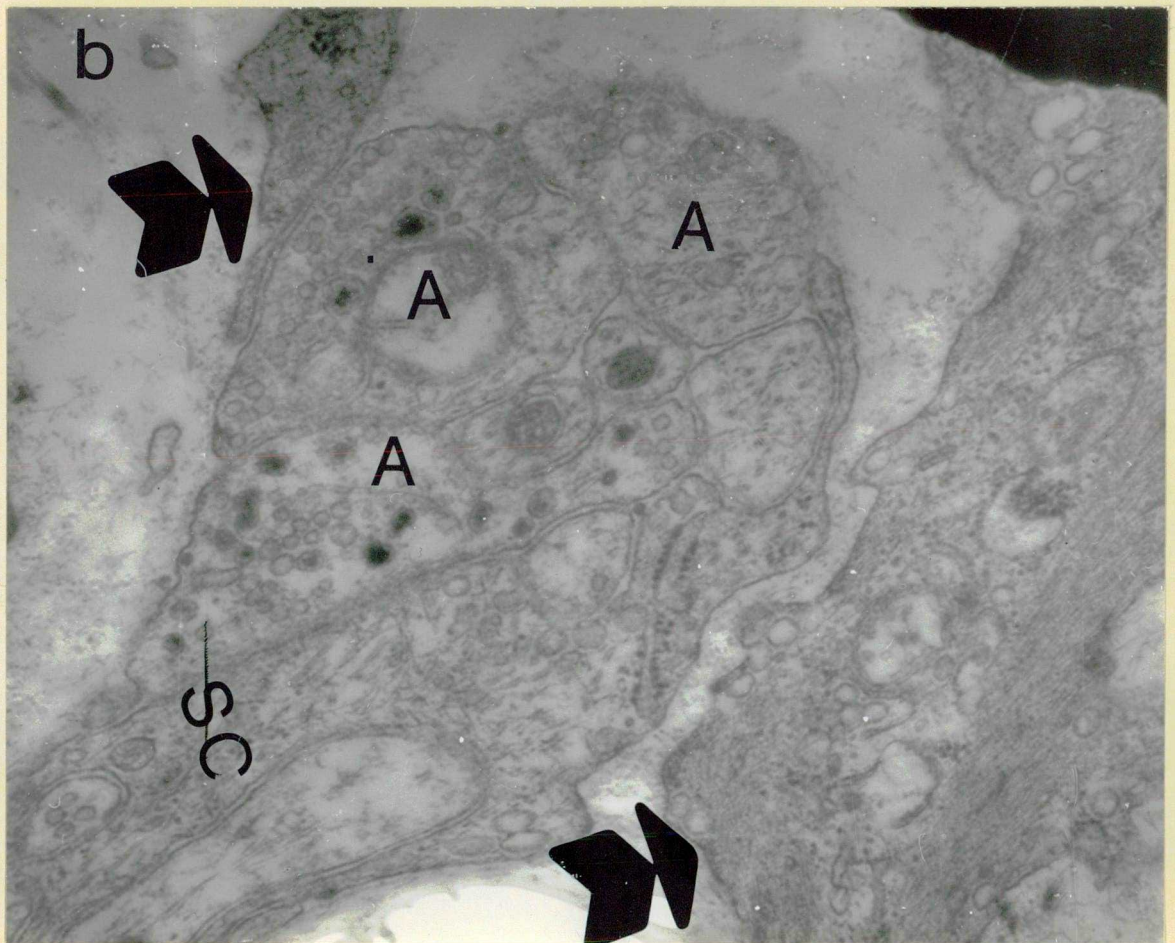
- a. A plexus fő törzsei nem vaskosak. pl: plexus; SC: Schwann-sejt; N: a Schwann-sejt magja; ksz: kötőszövet. Nagyítás: 17500x.
- b. Az idegrostok körül a Schwann-sejtek membránja gyakran többszörösen feltekeredik (nyíl). ksz: kötőszövet, pl: plexus. Nagyítás: 17500x.
- c. A simaizomsejtek membránjai szoros kontaktusba kerülnek egymással (nyíl). smc: simaizomsejt; ksz: kötőszövet; pl: plexus. Nagyítás: 25000x.
- d. A kollagén rostokban gazdag kötőszöveti állományban helyenként különálló axonokat (A) találunk. smc: simaizomsejt. Nagyítás: 30000x.



20. ábra

A vékonybél myenterikus plexusának ultrastrukturális
sajátságai II.

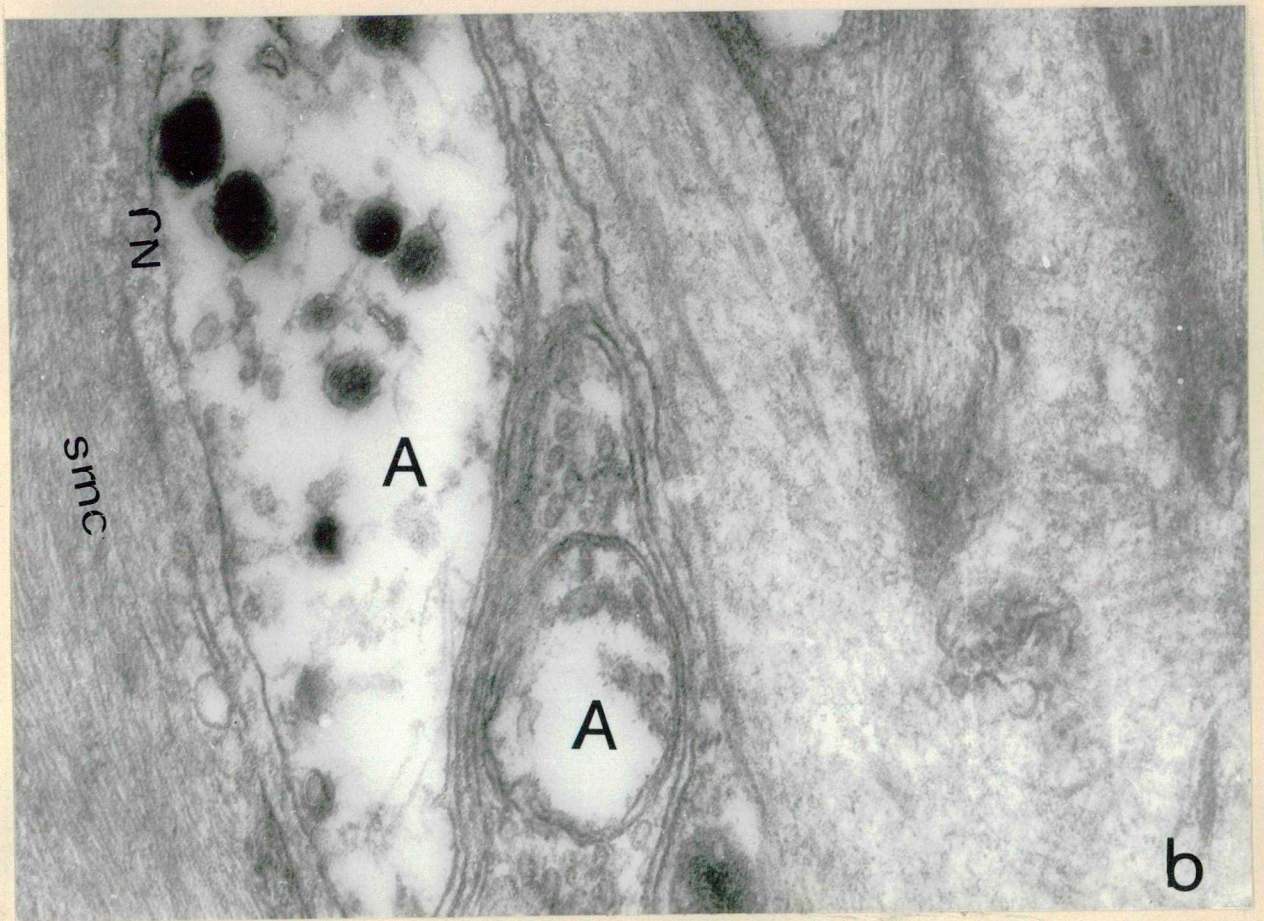
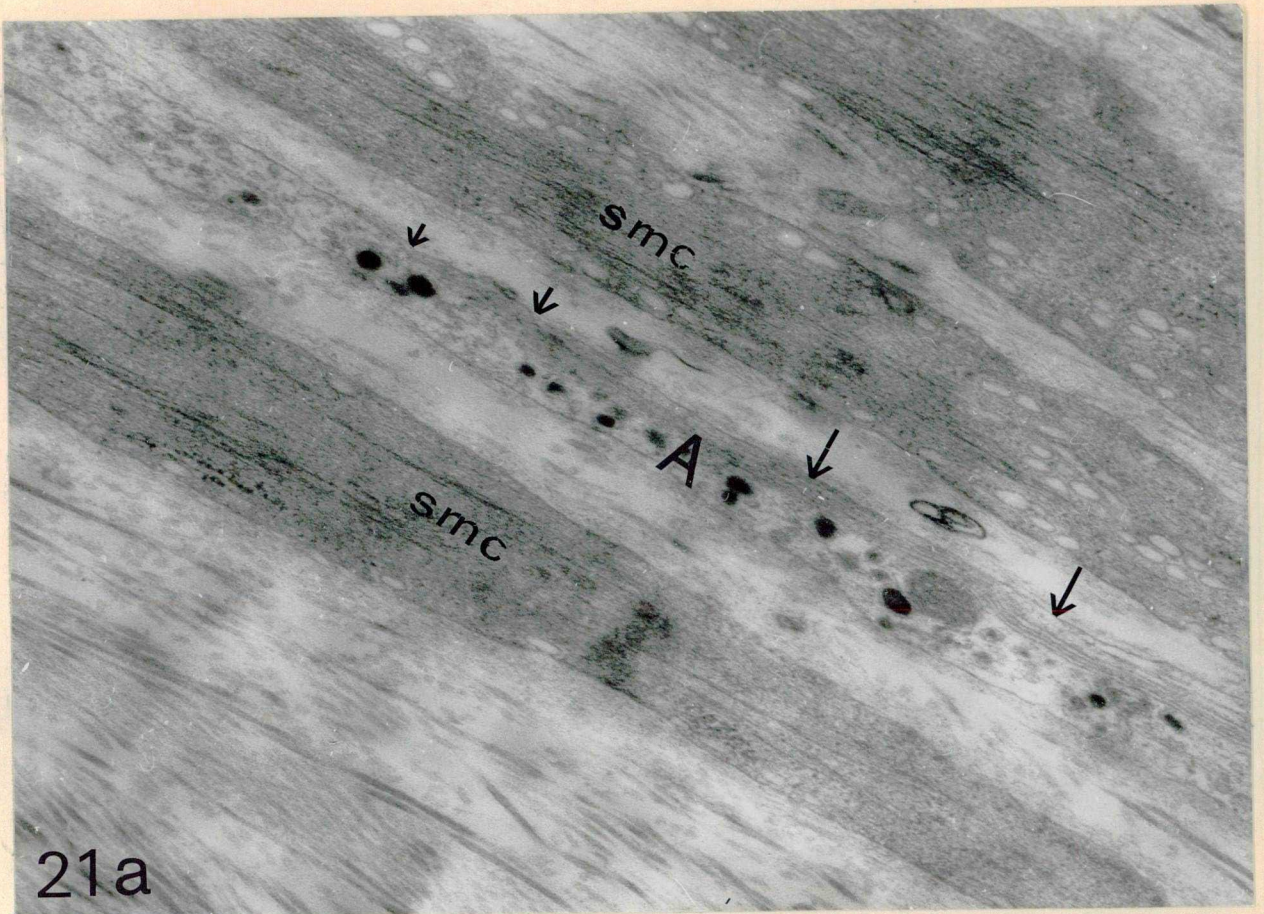
- a. A plexus profil- és vezikulatípusai változatosak. AGV: agranuláris vezikula, LGV: nagy granulált magvú vezikula; FV: lapított vezikula. Nagyítás: 40000x.
- b. Egyes izomsejtek nyúlványai igen közel kerülnek az axonterminálisokhoz. Nyíl: izomsejt részletek; A: axonok; SC: Schwann-sejt. Nagyítás: 33000x.



21. ábra

A vékonybél myenterikus plexusának ultrastrukturális sajátságai III.

- a. Az axonok (A) több um-en keresztül párhuzamosak az izomsejtekkel, Schwann-hüvelyük elvékonyodik, majd hiányzik (fokozatosan kisebbedő nyilak). smc: simaizomsejt. Nagyítás: 40000x.
- b. A neuromuszkuláris jukció (NJ) területén a két membrán 20 nm-nél is közelebb kerülhet egymáshoz. smc: simaizomsejt, A: axon. Nagyítás: 75000x.



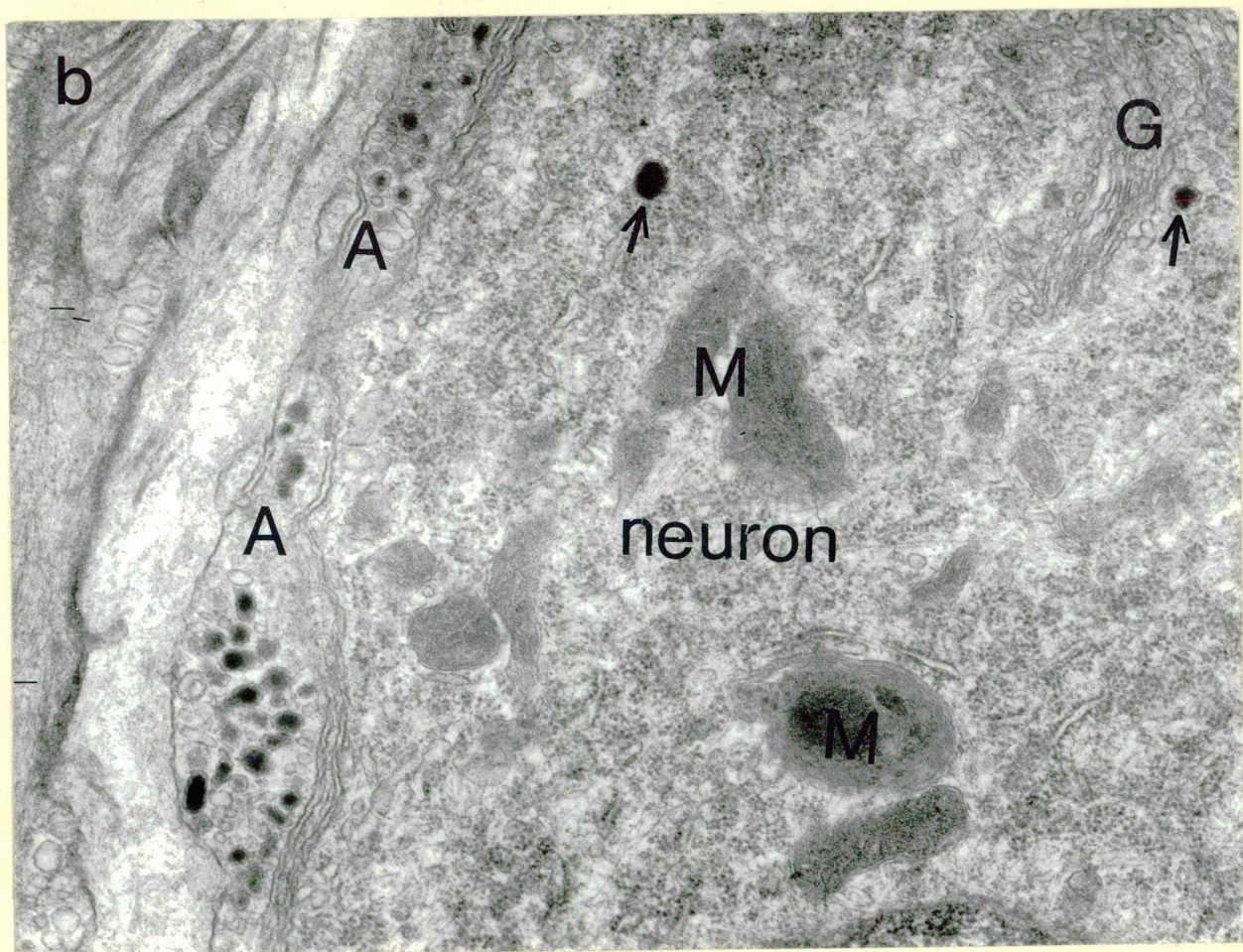
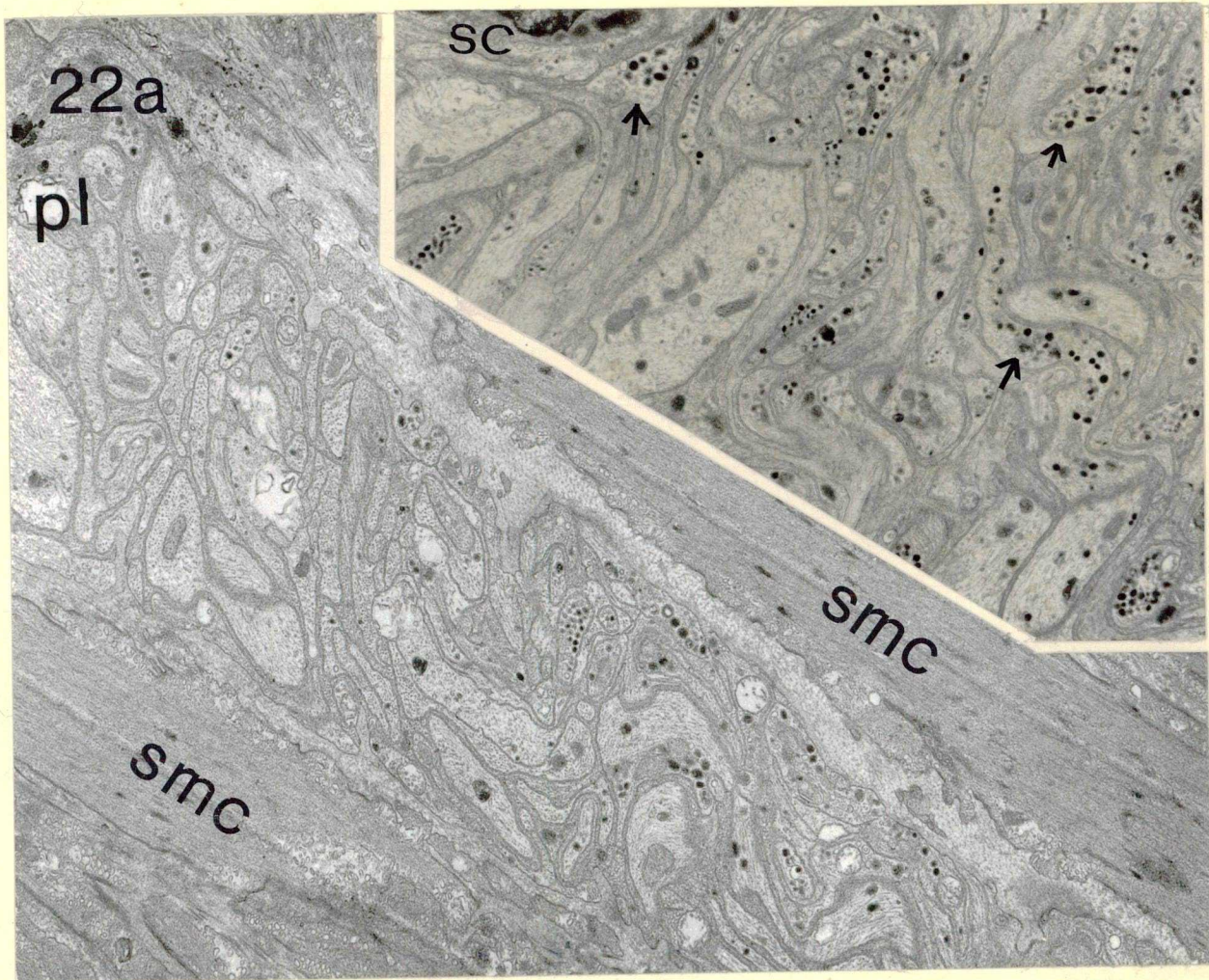
22. ábra

Az utóbél myenterikus plexusának finomszerkezete I.

a. Az izomsejtek (smc) között egy jól fejlett plexus (pl) látható. Nagyítás: 10000x. Insert: Schwann-sejt (SC) és myenterikus neuropil az utóbélben. Feltűnően sok az LGV-t tartalmazó profil (nyilakkal jelölve).

Nagyítás: 20000x.

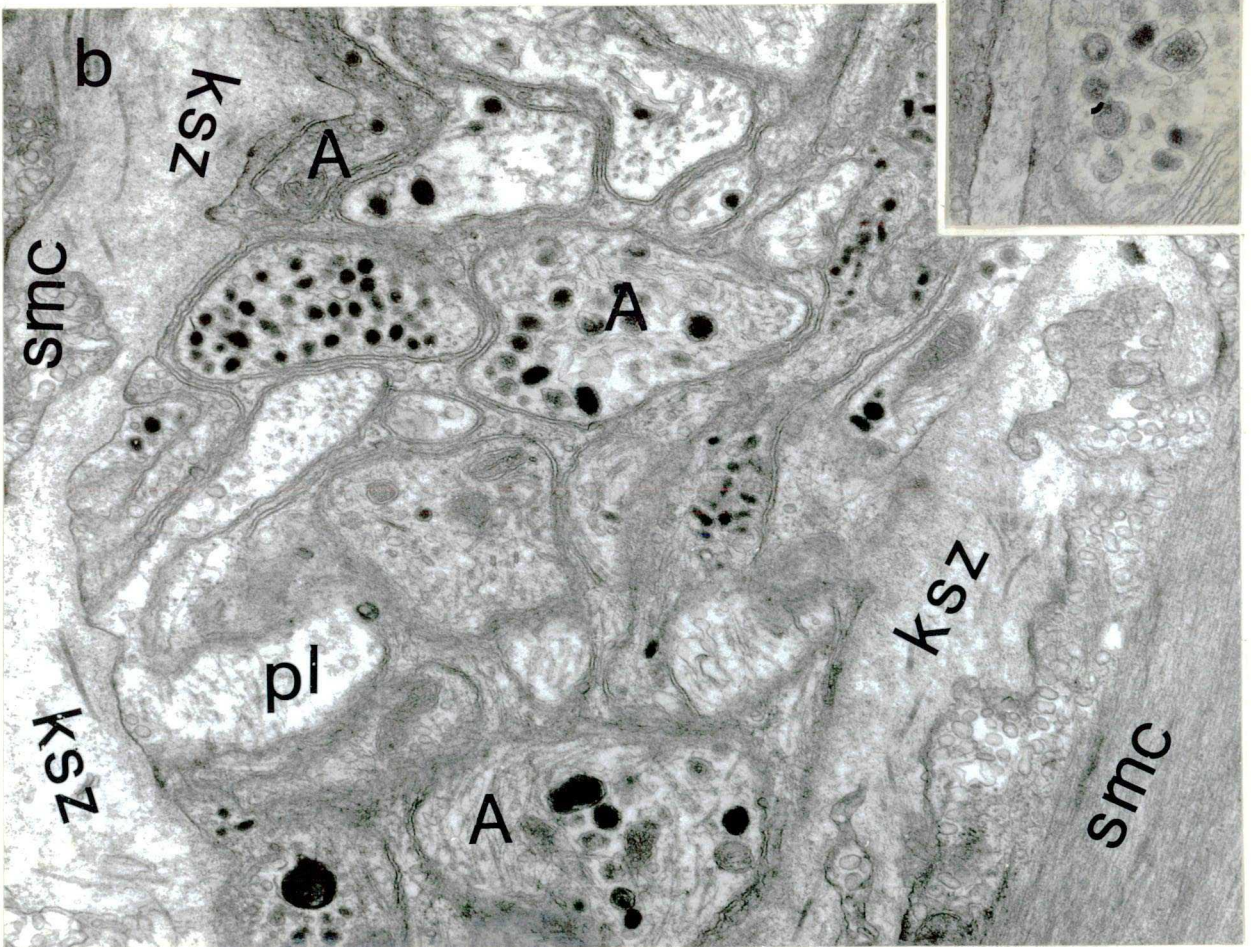
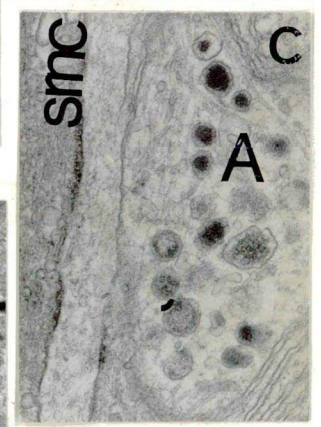
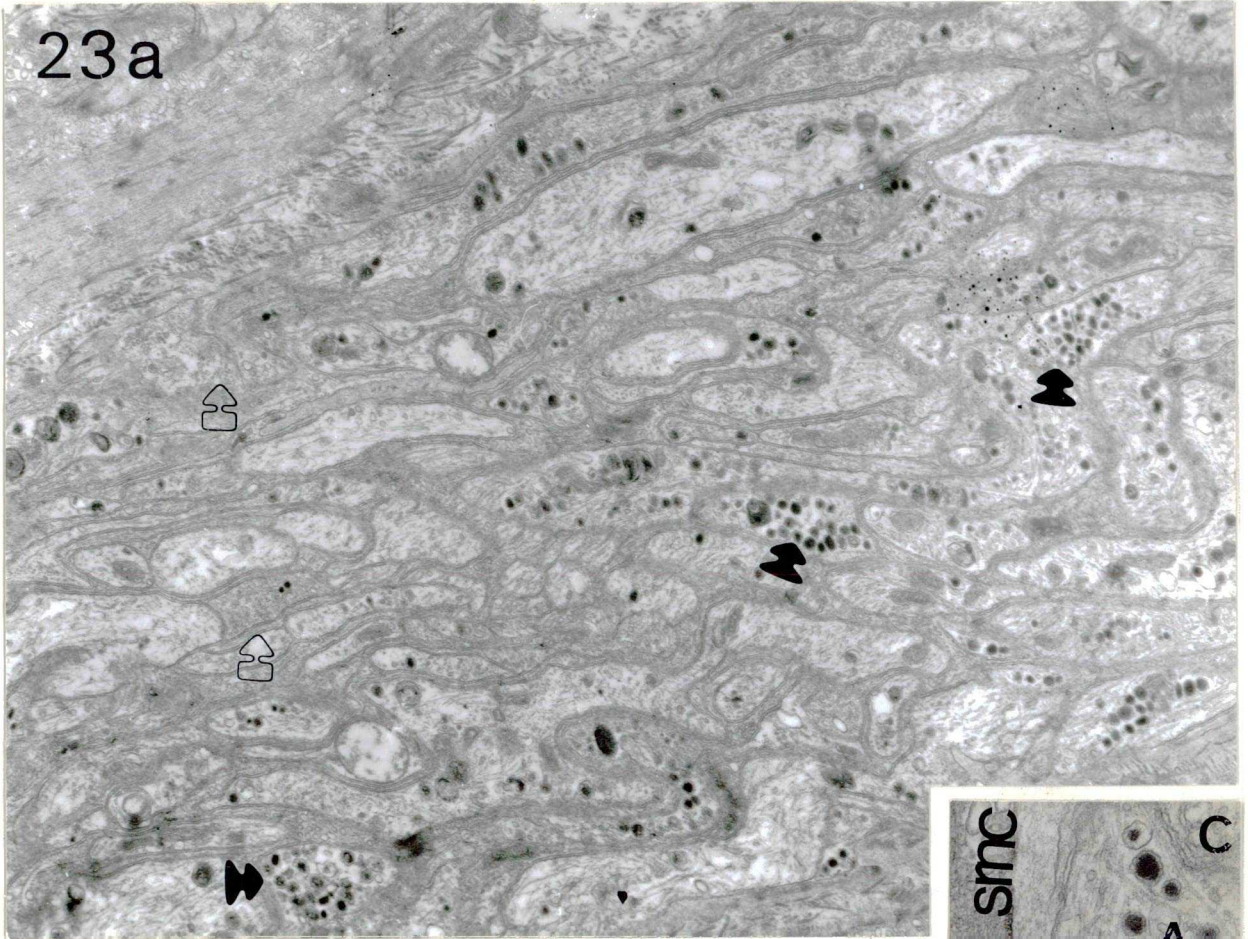
b. Néhány esetben neuront (neuron) is megfigyelhettünk az izomsejtek (smc) között. A neuronok mellett axon-profilok (A) is felismerhetők. A neuronban jól fejlett Golgi-apparátus (G), mitokondriumok (M) és szemcsék (nyilak) figyelhetők meg. Nagyítás: 37500x.



23. ábra

Az utóbél myenterikus plexusának finomszerkezete II.

- a. A profilokban nagyszámú LGV figyelhető meg (nyilak: LGV-s profilok). Magas az AGV-s profilok száma is (üres nyilak). Nagyítás: 22000x.
- b. A plexus (pl) és az izomsejtek (smc) között helyenként vastag kötőszövet húzódik (ksz: kötőszövet). A profilok (A) helyenként még zártak. Nagyítás: 25000x.
- c. Az idegrostok (A) mintegy 40-100 nm-nyi közelségbe kerülnek a simaizomsejtekhez (smc). A profilt LGV-k és néhány AGV tölti ki. A: axonprofil. Nagyítás: 50000x.



a.) Metodikai észrevételek

1. Hisztokémiai technikák

Mint azt a bevezető irodalmi áttekintésben már ismertettük, az elmúlt kilencven évben számos módszert használtak a kutatók a myenterikus plexus neuronjainak és rostrendszerének láthatóvá tételére. Az ezüstimpregnációs eljárások (Csoknya és Benedeczy 1986, Gunn 1959, Leaming és Cauna 1961) elsősorban a sejttípus elkülönítésére, a plexus rostrendszerének feltérképezésére alkalmasak. A sejtszámlálási adatokat a régebbi szerzők (Burnstock 1959, Irwin 1931, Okhubo 1936a és b, Sauer és Rumble 1946) metilénkéssel történt festés illetve tioninos kezelés után nyerték. Részben a plexus elemeinek nem teljes körű jelölődése, részben éppen ellenkezőleg, az aspecifikus jelölődés miatt az így nyert számlálási adatok ma már nem tekinthetők elfogadhatónak. Az említett szerzők eredményei igen nagy szórást mutatnak. A Gabella (1969) által bevezetett NADHd eljárás lényegesen pontosabb számlálást tesz lehetővé. Az AChE technika és a fluorescens módszerek is széles körben alkalmazottak a neurobiológiai kutatásokban.

α. Ezüstimpregnáció

Az ezüstimpregnáció nem jelöli meg hiánytalanul a sejteket (sem az egyes sejt összes nyúlványát nem tünteti fel maradéktalanul, sem az egyes ganglionok összes sejtjét), mégis széles körben használatos

a myenterikus plexus sejttípusainak vizsgálatára (Csoknya és Benedeczky 1986; Gunn 1959, 1968; Leaming és Cauna 1961). Ezen felül kirajzolja a technika a ganglionok közötti összeköttetéseket, de nem az egész együtt haladó rostköteget, hanem csak egyes rostokat jelöl. Ennek ellenére a plexus és a benne helyet foglaló idegsejtek feltüntetésére alkalmas ez az eljárás.

β . NBT/NADHd hisztokémia

A módszer - Gabella (1969) szerint - a myenterikus plexus valamennyi neuronját feltünteti, és a plexus rostrendszerét - habár gyengén - de szintén jelöli. A bél feltöltése miatt azonban a térbeli- főleg a keresztmetszeti- viszonyok erősen torzulnak, nagyobbá válik a bél külső felülete. Így cm^2 -enként kisebb lesz a neuronszám, mintha a bél eredeti, ki nem tángított állapotát vizsgálnánk. Tudjuk azonban azt is, hogy a bél fiziológiás körülmények között is igen erősen elernyedhet, más helyeken ugyanakkor összehúzódhat. Ekkor azonban a szövetek össztérfogata nem változik.(és ez a paraméter a feltöltés során is állandó marad), ezért a bélizomzat térfogategységére jutó neuronszám is állandónak tekinthető. Ha tehát minden kísérleti objektumot ugyanezen feltöltéses módszerrel vizsgálunk, úgy az általunk elkövetett relatív hiba igen kicsi lesz.

γ. AChE hisztokémia

Az AChE enzim jelenlétét, illetve annak kimutathatóságát ma már nem fogadják el kizárólag a kolinerg sejtek ismérveként. Az utóbbi időben a kolinerg sejtek markerének a kolin-acetitranszferáz (ChAT) enzimet tartják (Burt és Silver 1973), ami az acetilkolin (ACh) szintetizáló enzime. Mivel azonban ez az enzim igen erősen fajspecifikus, rendkívül nehéz és költséges az immuncitokémiai kimutatása. Az AChE reakció ezért még ma is használatos a kolinerg rendszerek jelölésére. A legnagyobb problémát a lehetséges diffúziós műtermékek képződése okozza (Pearse 1960). Mivel az AChE reakció terméke nagyrészt extracelluláris elhelyezkedésű az enzim molekuláris formáinak eloszlása és elhelyezkedése miatt (Brimijoin 1983), a reakciótermék a sejtek közötti résben könnyen diffundálhat. Ezért viszonylag rövid inkubációs idők betartása ajánlatos az eljárás során. Különösen két erőteljes AChE-pozitív rostköteg közötti tér válhat könnyen fals pozitívvá. További veszély a nem specifikus kolinészterázok jelenléte: ezek azonban etopropazinnal kielégítően gátolhatók (Pearse 1960).

δ. Kettős NBT/NADHd- AChE hisztokémia

A közép- és utóbél gyenge AChE reaktivitása miatt ez a módszer csak a gyomor esetében adott értékelhető eredményt. A diffúziós műtermékek képződése

miatt a vastag rostokban illetve azok között helyet foglaló neuronokról nem minden esetben tudjuk eldönteni, hogy vajon a szóban forgó sejtek kettősen jelöltek-e avagy sem. A NADHd jelölt neuronok fölé az AChE reakció végterméke ugyanis odadiffundálhat, ha a reakció inkubálási ideje túlságosan hosszú, illetve ha az inkubálás túl magas hőmérsékleten történik. A rostok melletti, illetve a vékony kötegek lefutásába illeszkedő neuronok egyes vagy kettős jelölődöttsége ellenben könnyen felismerhető.

É. GIF, a monoaminok kimutatására

A béka bélcsatornájában kevés aminerg elemet sikerült kimutatni és ezek fluoreszcenciaintenzitása is gyenge volt. Az aminerg elemek mennyisége a békánál kevesebb, mint bármely más állatcsoportnál, amit e szempontból vizsgáltak (Benedeczy és mtsai 1986 - csiga, csirke; Fekete 1984 - csiga; Halasy és mtsai 1988 - halak; saját nem publikált adatok - gyík, illetve Fekete és Csoknya /nem publikált adatok/ - csirke). Egyes szerzők bizonyos béka fajok belének aminerg innervációja tekintetében a noradrenalin (Read és Burnstock 1968) mások a szerotonint (Anderson és Campbell 1984) helyezik előtérbe. Gershon és Tompson (1973), azt hangsúlyozzák, hogy az emlős bélcsatorna adrenerg innervációja önmagában nem elégséges a bélizomzat fiziológias mértékű relaxációjához. Bár kísérleteiket nem békán végez-

ték, ezen elvi szempontból igen jelentős megállapításra még visszatérünk.

2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az általunk alkalmazott fixálási módszerek közül mindkettő alkalmas arra, hogy kielégítően megőrzött strukturát nyerjünk elektronmikroszkópos vizsgálatok céljaira. A különbség a két módszer között az, hogy perfúzióval némileg jobban megőrződnek a szövetek, ám a fixálás minősége még egyazon állat azonos bélszakaszán belül is változik, mivel a szerveket ellátó vérerek perfúzió közben elnyomódhatnak illetve eltömődhetnek. Perfúzióval rendszerint jó megőrzöttséget sikerült elérni a gyomor, a patkóbél és az utóbél esetében, kevésbé kielégítő a nyelőcső és a középbél megőrzöttsége. A különbség oka nem tisztázott.

Ennek megfelelően a nyelőcsőből és a középbélből elsősorban feltöltés utáni fixálással nyertünk vizsgálati anyagot, míg a gyomor, patkóbél és utóbél területéről a perfúziós fixálás után vágunk ki mintákat.

b. Az egyes bélszakaszokra vonatkozó eredmények értékelése

1. Nyelőcső

A nyelőcső anatómiai és fénymikroszkópos szerkezete lényegesen eltér az emlős nyelőcsőtől. Anatómiailag abban, hogy a kardiátájékon nincs kifejezett szűkület és szfinkter a nyelőcső és a gyomor között.

Fénymikroszkópos struktúrája tekintetében eltér a hám is; az emlősnél található többrétegű el nem szarusodó laphám helyett itt többrétegű hengerhámot találunk; ezen kívül az izomzat a béka esetében a nyelőcső egész hosszában simaizomsejtekből áll. Az irodalomban a hám, mint csillós hám ismeretes (Boselova és Meitner 1976). Megjegyezzük, hogy a csillózat a nyelőcső alsó részében fokozatosan eltűnik, majd a hám is ellaposodik és úgy megy át a gyomor egyrétegű hengerhámjába.

Ezüstimpregnációs vizsgálataink során erős rostkötegeket találtunk a szerv felszíne közelében; ez az adat egyezik Gunn (1959) közlésével. Idézett szerző azonban nem végzett elektronmikroszkópos vizsgálatokat az idegrostok pontos lokalizációjának és profilpopulációjának feltérképezésére. Az egyéb általunk vizsgált fénymikroszkópos hisztokémiai sajátosságok egyeznek a gyomoréval, így ezek tárgyalását a gyomor innervációjának értékelése kapcsán végezzük el.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink azt mutatják, hogy a nyelőcső területén mind velőhüvelyes, mind velőhüvely nélküli rostok találhatóak: a velőhüvelyes rostok valószínűleg extrinsic eredetűek (Taxi 1982). A simaizomsejtek beidegzését a csupasz rostok biztosítják: a nyelőcső területén ezek a rostok nem jutnak közelebb az izomsejtekhez, mint 80-100 nm. A további bélszakaszokon kialakuló szoros kontaktusok esetében az izomsejt és az idegrost közötti távolság mintegy 20-30 nm.

Nem tudjuk, hogy ez a morfológiai sajátosság gyakorol-e hatást az ingerületáttevődés gyorsaságára illetve a perisztaltikára.

2. Gyomor

A gyomor területén fejlett ganglionáris felépítésű myenterikus plexust találunk. Fénymikroszkópos ezüstimpregnációs vizsgálataink alapján feltételeztük, majd elektronmikroszkópos felvételeken bizonyítottuk, hogy a gyomor myenterikus plexusa az izomrétegen kívül, a tunica subserosa kötőszövetes állományában fekszik (Gábrriel és mtsai 1987). A korábbi leírások (Cole 1925, Yuh 1931, Wong és mtsai 1971) - igaz, más Amphibia fajokon - a myenterikus plexus helyét a körkörös izomrétegen kívülre, a hosszanti izomréteg sejtjei közé teszik. E különbség oka lehet az eltérő vizsgálati objektum, valamint az is, hogy az elektronmikroszkópos technika a finomabb részletek pontosabb megfigyelését teszi lehetővé.

A neuronok előfordulási sűrűségére vonatkozóan sem a gyomorban sem más bélszakaszokon az irodalomban eddig nem állt rendelkezésre adat. Gabella (1969) módszerével a bélcsatorna valamennyi szakaszának neuronsűrűségét meghatároztuk. A gyomor területén, adataink szerint változó a neuronsűrűség; mintegy 500 (fundus) és 1000 (pylorus) közé tehető cm^2 -ként. Ezen adatok szórásukat tekintve igen jónak mondhatók,

hiszen az irodalomban (lásd Gabella 1979-es összefoglaló közleményét) azonos bélszakaszon belül 8-10-szeres, a különböző bélszakaszok között gyakran 15-szörös neurondenzitásbeli különbséget mutatnak az adatok. E nagy különbségek okát abban látom, hogy a plexus neuronális elemei (a korábban idézett szerzők által alkalmazott különböző hisztokémiai technikákkal) eltérő számban jelölődnek, illetve esetlegesen bizonyos nem neuronális elemek (makrofágok, intersticiális sejtek, Schwann-sejtek, vér alakos elemek, fibrociták) is jelölődhetnek a korábban alkalmazott nem neuronspecifikus módszerekkel.

Vizsgálataim során a gyomor területén erőteljes AChE aktivitást észleltem, csakúgy, mint néhány korábbi szerző (Wong 1973; Wong és mtsai 1971). Az ACh jelenlétét és transzmitter szerepét sokan annak tulajdonították, hogy a béka előbele a vagus beidegzése alatt áll (Aikawa 1931; Botazzi 1899; Dixon 1902; Rashid 1972; Singh 1964; Yuh 1931). Ma azt mondhatjuk, hogy az itt jelen lévő AChE nagyrészt a kolinerg innervációt fogadó lokális neuronok termékének tekinthető. Ugyanakkor kaphatnak közvetlenül kolinerg rostokat az itt helyet foglaló simaizomsejtek is, bár eddig még nem sikerült kimutatni AChE-t az idegprofilok és a simaizomsejtek közötti résben (Halasy és mtsai 1988). Ennek magyarázata az lehetne, hogy itt szolubilis kolinészterázok fordulnak

elő és ezek a fixálási, mosási és inkubációs procedúrák során kioldódhatnak. Egy másik lehetséges magyarázat az lenne, hogy az izomsejtek nem is kapnak kolinergerg innervációt, ám ennek ellentmond az a tény, hogy kis agranuláris vezikulákkal telt axonprofilok (amelyek kolinergerg jellege feltételezhető) gyakran figyelhetők meg szoros közelségben az izomsejtek membránjához.

A gyomor myenterikus plexusában GIF-et nem sikerült kimutatnunk, csupán a nyálkahártya entero-endokrin sejtjei mutattak igen intenzív fluoreszcenciát. E sejteket később ultrastrukturális szinten is megtaláltuk. Nagyszámú szemcse volt megfigyelhető bennük, ami intenzív monoamin termelésre vall, de nem valószínű, hogy pótolhatnák a hiányzó aminerg rostokat és sejteket, hiszen más szövettani rétegben helyezkednek el. A gyomor aminerg innervációja - ha van ilyen - igen gyenge. Ugyanakkor más alacsonyabbrendű gerinces és gerinctelen fajok esetében az irodalom nem tesz említést a funkcionálisan igen fontos aminerg rendszer hiányáról (Ali és McLelland 1978; Anderson 1983; Baumgarten és mtsai 1973; Fekete 1984; Nemcsók és mtsai 1986; Vig és mtsai 1985; Watson 1979).

A GIF vizsgálatokkal együtt és azzal összefüggésben a kettős NADHd-ACHe reakció tájékoztatott bennünket arról, hogy létezik a gyomorban egy olyan "lapangó" neuronpopuláció és rostrendszer, amely funkcionálisan helyettesítheti a hiányzó aminerg rend-

szert. E rendszer transzmittere(i) jelenleg ismeretlen(ek), indirekt módon azonban következtethetünk az ide tartozó idegelemek neurokémiai természetére: létezhet a gyomorban egy olyan nem-kolinerg, nem-aminerg rendszer, aminek a transzmitter anyaga az ATP (vagy vele rokon szerkezetű nukleozid-trifoszfát). Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény, hogy a béka közép- és utóbelében sikerült lokalizálni egy purinerg rendszert (Burnstock 1970; Burnstock és mtsai 1972, Sneddon és mtsai 1973). Ez a rendszer létezhet a gyomorban is. A másik elméleti lehetőség egy tisztán peptiderg rendszer feltételezése. A peptid transzmitterek közül néhányat (NPY, Enk, SOM) úgy írtak le (Hökfelt és mtsai 1982), mint amelyek a katecholaminerg neuronokban van jelen elsősorban, mint kotranszmitter. Más peptidek (VIP, CCK, SP) általában, mint az acetilkolinnal együtt előforduló kotranszmitterek (Furness és Costa 1980; Vincent és mtsai 1986). Ezt a tényt a bélcsatornát beidegző extrinsic és intrinsic neuronok esetében is igazolták, emlős kísérleti objektumokon (Costa és Furness 1984; Ekblad és mtsai 1984; Ekblad és mtsai 1987; Schultzberg és mtsai 1980; Sundler és mtsai 1983). Ennél is pontosabb közös lokalizációt állapítottak meg Pelletier és mtsai (1981), akik a szerotonin és a P-anyag immunreaktivitását egyazon dense-core vezikulán belül mutatták ki.

A béka gyomor perisztaltikus mozgásainak fenn- tartásában tehát az igen erős, serkentő jellegű kolinerg és egy gátló természetű, nem-kolinerg, nem-aminerg rendszer vesz részt.

Az általunk alkalmazott módszerekkel nem lehetett eldönteni, hogy ez a rendszer peptiderg vagy purinerg természetű-e.

Az uralkodó profil- és vezikulatípus (mintegy 35%) az LGV a gyomor myenterikus plexusában; így a profilpopuláció alapján nem lehet eldönteni, hogy a nem-kolinerg, nem aminerg innerváció milyen jellegű, minthogy a korábbi és részben más objektumokon elvégzett vizsgálatok mind a peptid, mind a purin transzmitterek jelenlétét összefüggésbe hozzák az LGV-populáció jelenlétével (Boyd és mtsai 1964; Gabella 1972, 1979; Richardson 1958; Rogers és Burnstock 1966).

A peptiderg innerváció jelenlétét látszik alátámasztani az a tény, hogy a központi idegrendszer számos strukturájában kolokalizálták a NAD/P/Hd enzimet és bizonyos peptid transzmittereket (Scherer-Singler és mtsai 1983; Vincent és mtsai 1983; Vincent és mtsai 1986).

Meglepő volt számomra az a tény, hogy a neuropilben szinaptikus kapcsolatokat nem találtam, holott ez a magasabbrendű gerincesek bélidegrendszerében igen gyakori (Burnstock 1986; Furness és Costa 1980;

Gabella 1972,1979). Minthogy szinapszist a további bélszakaszok neuropiljében sem észleltem, a probléma megvitatását a béka bélcsatorna általános tulajdonságainak megbeszélése kapcsán fogom elvégezni.

A myenterikus és submucosus plexus közötti összehasonlítás a béka esetében csak ultrastrukturális szinten érdeklős, mert mint azt Gunn (1951) munkája alapján tudjuk, a béka plexus submucosa neuronokat nem tartalmaz. Ez a plexus részben a myenterikus plexus neuropiljéből a submucosába átlépő rostokból, részben az extrinsic idegek (ez esetben a vagus) közvetlenül ide futó rostjaiból áll. Vegyes vezikulatartalmú profilból viszonylag keveset találunk itt, az uralkodó profil (70%)- és vezikulatípus (65%) az AGV. E tények a plexus rostjainak viszonylag egységes eredetét látszanak alátámasztani (t.i. a rostok jelentős százaléka talán a vagusból származik).

E rostok feladata nyilván a gyomormirigyek, a submucosában helyet foglaló feszülési receptorok és a muscularis mucosae izomrétegének beidegzése. A submucosus plexus profil- és vezikulapopulációja legjobban a vékonybél myenterikus plexusáéhoz hasonlít. E sajátság oka, illetve a jelenség magyarázata nem ismeretes.

3. Patkóbél

A különböző módszerekkel (ezüstimpregnáció, NADHd, AChE, GIF) nyert eredményeket összegezve megállapíthatjuk, hogy fénymikroszkópos szinten a patkóbél innervációja átmeneti jellegű az előbél ganglionáris és a bélcsatorna további szakaszainak nem-ganglionáris szerveződése között. A neuronok száma is közti értéket mutat: a gyomor funduséhoz képest itt nagyobb a neuronozsűrűség, de ugyanakkor nem éri el a pylorus vagy a vékonybél területén számlálható értéket. A neuronok méret szerint is "átmenetiek" az előbél nagyobb és a további bélszakaszok kisebb neuronjai között. A szoliter neuronok aránya patkóbél disztális vége felé haladva növekszik. Ez jelzi az átmenetet a ganglionáris és a nem-ganglionáris innerváció között.

Az AChE-reakció végtermék mennyisége lecsökken ezen a bélszakaszon a gyomorhoz képest olyannyira, hogy az itt fellelhető AChE-pozitív mintázat nem tér el lényegesen a középbél további területein tapasztalttól: ezért nem is tárgyaltuk külön alfejezetben e bélszakasz AChE reaktivitását. Az AChE pozitívitás szegényessége illetve hiánya arra enged következtetni, hogy a vagus rostjai ezen a bélszakaszon véget érnek. A béka esetében ezideig még nem tisztázott az, hogy a nervus vagus mely bélszakaszokon,

illetve milyen hosszan képes befolyásolni a bélperisztaltikát (Taxi 1982). A vagus rostjainak szerepét a további bélszakaszokon az alsó gerincvelői szelvényekből származó vegetatív rostok veszik át (Taxi 1982).

A béka esetében különösen érdekes az, hogy a felsőbb bélszakaszokat ellátó szimpatikus idegrostok is a vagusszal együtt lépnek be a bélcsatorna szövetei közé, ezért a belépő extrinsic rostokat itt mint vagoszimpatikus köteget írja le az irodalom (Taxi 1982).

Az anatómiai leírással összevágunk azok a fiziológiai adatok, melyek szerint a vagus törzsének ingerlése nem tisztán paraszimpatikus hatásokat vált ki az előbél perisztaltikájára és szekretoros működésére (Botazzi 1899; Singh 1964). A fiziológiai vizsgálatok ezuttal megelőzték a morfológiai vizsgálatokat.

A patkóbél nemcsak a kolinerg, hanem az aminerg innerváció tekintetében is igen hasonlít a vékonybélhez. Ezért a két bélszakasz aminerg innervációját közösen tárgyaltuk az "Eredmények" című fejezetben. Megállapítottuk, hogy az aminerg innerváció ezen a bélszakaszon is gyenge, de mind fluoreszcens rostok, mind sejtek - kis számban bár, de - megfigyelhetők. A középbél aminerg (és ezzel kapcsolatos szimpatikus) innervációját a vékonybélről nyert egyéb hisztokémiai és ultrastrukturális adatokkal együtt vitatjuk meg.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a profil- és vezikulapopuláció összetétele eltér a gyomorétól, az innerváció jellege átmeneti az elő- és középbél között.

Az LGV-s profilok közel azonos számban vannak jelen az AGV-sekkel, ám vezikulaszám tekintetében - eltérően e gyomor esetében tapasztaltaktól, ahol az LGV-k domináltak - itt az AGV-k vannak többségben.

A patkóbél myenterikus plexusa profiltípusainak aránya átmeneti jellegű a gyomor és a vékonybél profilarányai között, a profilok vezikulatartalma pedig jellegzetes: a denz magvú vezikulák és a világos típusú vezikulák csaknem egyenlő számban vannak itt jelen.

A fénymikroszkópos szinten észlelt organizációbeli változás (ti. a ganglionáris rendszer átmege nem-ganglionárisba) elektronmikroszkópos szinten is észlelhető, és egyúttal valószínűleg összefüggésben áll az extrinsic innerváció eredetének megváltozásával. A középbél extrinsic innervációjáról, a vékonybél myenterikus plexusáról nyert eredmények értékelése kapcsán ejtünk szót.

4. Vékonybél

A plexus elrendeződése ezen a bélszakaszon válik teljes egészében nem-ganglionárisrá: a sejtek elszórtan, de nem egyenletes eloszlásban helyezkednek el: a mezenterialis szegély mentén a sejtszám maga-

sabb, mint az ellenkező oldalon. Ez valószínűleg az-
zal magyarázható, hogy az extrinsic innervációt kapó
sejtek elsősorban itt helyezkednek el. Az extrinsic
rostok viszonylag rövid bélfalbeli lefutás után érik
el célsejtjeiket. A neuronszám magasabb ($1100/\text{cm}^2$),
mint pl. a gyomor fundusánál vagy a patkóbélben volt,
ezenfelül határozott emelkedés észlelhető a vékonybél
disztális szakaszán. Ez a megfigyelés összhangban áll
azzal az anatómiai ténnyel, hogy a vékonybél legdisz-
tálisabb szakasza szfinkterként szolgál a közép- és
utóbél között. Hasonló neuronszám növekedés volt meg-
figyelhető előzőleg a gyomor fundusa és pylorusa kö-
zött is: a pylorus szfinkter funkciójához nem férhet
kétség. Itt a növekedés még erőteljesebb volt, mint
a közép- és utóbél határán. Ennek valószínű oka az,
hogy az elő- és középbél közötti szfinkter szakasz
egyrészt hosszabb, másrészt a térfogatváltozás a két
bélszakasz között nagyobb mérvű ott, mint a közép-
és utóbél határán. E szfinkterszerű bélrészletek va-
lószerűleg igen fontos szerepet töltenek be a táplá-
lék továbbításának időbeli szabályozásában.

Az acetilkolinészteráz jelölt struktúrák jóval
szerényebb számban vannak jelen a középbélben, mint
az előbél területén. Ezenfelül a reakció végtermék
denzitása is jóval az előbélben tapasztalt szint
alatt van. Az bizonyosnak tűnik, hogy az AChE pozitív

rostok jelentős hányada extrinsic eredetű, mert a mezenterium felől belépő nagy idegtörzsek erősen AChE-pozitívak. Ez azonban nem jelenti azt, hogy ezek a rostok valóban kolinergiek is lennének. A bélcsatorna e szakaszát extrinsic rostokkal ellátó struktúrák a hasüri szimpatikus dúcok, amelyeknek pre-ganglionáris rostjai a béka esetében a gerincvelő IV.-V.-VI.-VII. szelvényéből erednek (Taxi 1982). A posztganglionáris rostok egy része is lehet kolinerg, szimpatikus jellegétől függetlenül is. Lehetnek azonban a béka bélben olyan myenterikus neuronok (mint ahogy az emlős bélben vannak is, lásd pl. Willard és Nishi 1987), amelyek kolinergiek. Tehát az AChE lehetséges forrásai az intrinsic kolinerg neuronok, valamint az extrinsic és intrinsic kolinerg rostok által innervált helyi idegsejtek, ezenfelül maguk a kolinerg rostok is.

Mind aminerg rostok, mind aminerg sejtek találhatóak a vékonybél területén, ám ezek kis számban vannak jelen és fluoreszcenciájuk is gyenge, ami azt mutatja, hogy alacsony a katecholamintartalmuk.

Hogy az aminerg innerváció mellett még egy másik, szintén inhibitorikus jellegű innerváció is létezik ezen a bélszakaszon, azt Burnstock és mtsai (1972) valamint Sneddon és mtsai (1973) bizonyították. Ők ezt az innervációt purinerg jellegűnek tartják. Elképzeléseiket elsősorban fiziológiai vizsgálatokkal tá-



masztották alá, miszerint az ATP gátolja a perisztaltikát ezen a bélszakaszon.

Elektronmikroszkópos szinten korábban már elemezték a középbél beidegzését (Rogers és Burnstock 1966). Megállapították, hogy az itt helyet foglaló simaizomzat beidegzése nem tér el a viscerális simaizmoknál megszokottól. Eredményeink továbblépést elsősorban azon a ponton jelentenek, hogy képet tudunk adni az itt helyet foglaló vezikulapopulációról, másrészt munkánkban bizonyítottuk, hogy az egyes idegrostok gyakran intim közelségbe kerülnek a simaizomzattal, amit az idézett szerzők nem írtak le munkájukban. Nem tesznek említést arról sem, hogy magában a myenterikus neuropilben nem található szinapszisok, holott ez a magasabbrendű gerinceseknél igen közönséges (Gabella, 1972, 1979; Furness és Costa 1980).

A vezikula- és profilpopuláció vizsgálata igen érdekes eredményekre vezetett. Mint azt megállapítottuk, mintegy háromszor annyi AGV-s profil van jelen, mint LGV-s. A vezikulaszámok aránya még nagyobb eltérést mutat (428 ill 40). Ezt a megállapítást azért nehéz interpretálni, mert a fénymikroszkópos vizsgálatok során azt találtuk, hogy az AChE mennyisége viszonylag kevés az előbélhez képest, aholis az AGV-s profil- illetve vezikulapopuláció arányait tekintve kisebb volt, mint ezen a bélszakaszon. Ugyanakkor a klasszikus neuromorfológiai vizsgálatok az acetil-

kolint, mint neurotranszmittert ehhez a vezikula-populációhoz kötik (Peters és mtsai 1976). A magyarázatot talán azon esetben adhatjuk meg, ha az extrinsic idegelemek abszolút száma az előbélben magasabb, mint ezen a bélszakaszon, így a vékonybélben az intrinsic elemek által kibocsátott rostok nagyobb arányban vesznek részt a plexus terminálisainak formálásában.

Ugyancsak érdekes az is, hogy a DCV-s profilok száma ezen a bélszakaszon volt az egyik legmagasabb, sőt, az egyes DCV-s profilok magas vezikulaszámmal képviseltették magukat. Ez az elektronmikroszkópos észlelés egybevág azzal a fénymikroszkópos megfigyeléssel, hogy az aminerg innerváció - ha gyenge is, de - jelen van ezen a bélszakaszon.

Hogy a vékonybél profil- és vezikulapopulációja miért a gyomor plexus submucosusáéhoz hasonlít legerősebben annak okát és magyarázatát eddigi eredményeink alapján nem tudjuk megadni.

5. Utóbél

Az intrinsic neuronok száma csökken ezen a bélszakaszon a vékonybélhez képest. A sejtek alakjukat tekintve nagyrészt multipolárisak, elrendeződésük nem-ganglionáris. A neuronok között futó idegrostok erőteljesebbek, mint a vékonybélben, akár az ezüstimpregnáció, akár a NADHd módszer eredményeit tekintjük.

Az intrinsic neuronok számának csökkenése valószínűleg összefüggésbe hozható a bélszakasz lanyha perisztaltikájával.

Az AChE és GIF reakciók által nyert reakcióvégtermék mennyisége és eloszlása igen hasonló volt a középbelben tapasztaltakhoz. Ennek oka a közel azonos morfológiai felépítettségben részben abban keresendő, hogy az extrinsic szimpatikus innervációt közel ugyanazok a gerincvelői szegmentumok (ti. az V.-VI.) adják (Taxi 1982), mint az előző bélszakaszét. A paraszimpatikus innerváció úgyszintén gerincvelői eredetű (a VII., VIII. és kisebb mértékben a IX. gerincvelői szegmentumból; Taxi 1982). Miután igen kisszámú AChE pozitív (tehát potenciálisan kolinerg) és GIF-et mutató (tehát aminerg) sejt mutatható ki ezen a bélszakaszon, a kérdés az, hogy milyen egyéb transzmitter anyagok találhatóak az utóbél myenterikus plexusában.

Neuropeptideket ebben a bélszakaszban - csakúgy mint a többiben - még nem írtak le az irodalomban. Boyd és mtsai (1964) azonban felvetik egy nem-kolinerg, nem-aminerg rendszer létezését az utóbél területén is, és ezt a nézetet támasztja alá Read és Burnstock (1968, 1969) munkája is. E rendszer transzmitter anyaga nem ismeretes. Burnstock (1972) purinerg beidegzésről tesz említést. Fénymikroszkópos vizsgálataink során ezt az elképzelést nem tudtuk

alátámasztani, ugyanis kettős hisztokémiai kísérletünk (a konszekutív NADHD-AChE technika) az AChE gyenge reaktivitása miatt nem adott egyértelműen értékelhető eredményt. Másrészt a GIF-pozitivitás miatt az aminerg rendszer létezése sem zárható ki úgy, mint a gyomor esetében.

Elektronmikroszkópos szinten a profilpopuláció lényegesen eltér az előző bélszakaszokétól, és alapjában véve leginkább a gyomoréhoz hasonlítható. Ez egyúttal talán jelzi azt is, hogy az extrinsic innerváció jellegét tekintve jobban közelít a gyomorhoz, mint a vékonybélhez. Az ebből levonható további következtetés az lehet, hogy e bélszakasz perisztaltikáját a gerincvelő alsó, lumboszakrális szakaszából érkező paraszimpatikus jellegű innerváció jobban befolyásolja, mint a háti szakasz szimpatikus neuronjai.

c.) A tápcsatorna myenterikus plexusának egészére vonatkozó sajátságok összehasonlító összefoglalása

1. A myenterikus plexus egészének morfológiájára vonatkozó általános észrevételek

Mint azt az eredmények megvitatása során megállapítottuk, a bélcsatorna előbéli szakaszán ganglionáris a myenterikus plexus, míg a további szakaszon nem ganglionáris. Felvetődik a kérdés: miért

eltérő a myenterikus plexus szerveződése a különböző bélszakaszokon?

Az eltérő organizáció részben a plexus sejtes elemeinek eltérő eredeteivel és embrionális vándorlásával magyarázható. Andrew (1971) összefoglaló cikkében számba veszi az enterikus neuronok lehetséges forrásait és megállapítja, hogy az enterikus neuronok vagy a vagus központi idegrendszeri telepéből származnak, vagy a velőcső a törzs területére eső szakaszának ventrális oldalából (ez esetben a sejtek vándorlását szerző a szimpatikus határköteg ducain keresztül képzelel el). Véleményünk szerint lehetséges, hogy a két eltérő szerveződésű plexusrészlet eltérő eredetű, ami magyarázná a hisztokémiai különbségeket, nevezetesen azt, hogy miért csökken le igen erősen az AChE mennyisége és miért jelennek meg aminerg sejtek a bélcsatorna közép- és utóbéli szakaszán.

2. A myenterikus plexus sejttípusai

Mint azt Dogiel (1896, 1899) két közleménye óta tudjuk, a vegetatív neuronok alapvetően két fő csoportba sorolhatók: szerzőről elnevezett Dogiel I. és Dogiel II. típusba. Az I.-es típust Dogiel úgy jellemezte, hogy az hosszú axonnal, kevés és rövid dendrittel bír, és inkább nagy távolságokra küldi axonját (projekciós jellegű). A II.-es típus éppen

ellenkező tulajdonságú: viszonylag rövid, a sejttest közelében dúsan elágazó axon, sok, bár nem túlságosan gazdagon elágazó dendrit jellemzi ezt a típust (lokális jellegű). A későbbiekben más szerzők (Csoknya és Benedeczy 1986; Stach 1980, 1981, 1982a és b, 1985) már 3 illetve 5 neurontípust írtak le a különböző fajok (a csirke illetve a sertés) bélcsatornájából.

Gunn a béka bél enterikus plexusainak morfológiai sajátosságait elemezve (1951) tartja magát a Dogiel-féle beosztáshoz. Ő a gyomor myenterikus neuronjait Dogiel I.-es típusúaknak írja le, míg a középbél idegsejtjei szerinte Dogiel II.-es típusúak. Nem karakterizálja azonban az utóbél idegsejtjeit. Munkánk eredményeképpen a myenterikus neuronok morfológiai leírását megadtuk, sőt méretadatokkal is szolgáltunk. Következtetéseinkben részben egyetértünk, részben nem az idézett szerző munkájával. Közös az álláspontunk a gyomor neuronjai esetében; ezeket mi is a Dogiel I.-es sejttypusba soroljuk. A középbél neuronjai nagyrészt a Dogiel II.-es típusba sorolhatók, ugyanakkor nem szabad elfeledkeznünk arról, hogy a mezenteriális szegély mentén elhelyezkedő nagy multipoláris neuronok nem egyeznek morfológiai sajátágaikban a középbél több neuronjával. Ezek a sejtek valószínűleg a Dogiel I.-es típusba tartoznak. Az utóbél neuronjait Gunn nem osztályozta. Eredmé-

nyeink alapján e neuronokat egy külön morfológiai csoportba lenne célszerű sorolni, mivel - bár méretüket tekintve csak alig nagyobbak a középbel idegsejtjeinél - az esetek túlnyomó többségében multipolárisak, excentrikusan elhelyezkedő sejtmaggal bírnak, míg a vékonybél neuronjai zömükben bipoláris jellegűek centrálisan elhelyezkedő sejtmaggal. Az utóbél idegsejtjei nem azonosíthatók a gyomor neuronjaival sem, mert méretük a gyomor neuronjaiénál lényegesen kisebb. Indokolt tehát egy III. típusú neuron megjelölése, amely multipoláris, excentrikusan elhelyezkedő sejtmaggal bír és mintegy $50-150 \mu\text{m}^2$ maximális profilú.

3. A myenterikus plexus lehetséges ingerületátvivő anyagai

Az acetilkolin a bélcsatorna teljes hosszában szerephez jut a perisztaltika szabályozásában (Taxi 1982), eloszlása azonban valószínűleg egyenetlen; az előbél területén lényegesen nagyobb mennyiségben lehet jelen, mint a bélcsatorna további szakaszain.

A kateholaminok jelenlétét fluorescens hisztokémiai eljárással nem sikerült bizonyítanunk a bélcsatorna teljes hosszában; az előbél myenterikus plexusa nem (vagy csak az általunk alkalmazott technika kimutathatósági határánál kisebb mennyiségben) tartalmazza ezeket a transzmittereket. A többi bélszakasz tartalmaz kateholaminokat.

Vizsgálataink során sikerült bizonyítanunk, hogy a gyomor (és valószínűleg az egész előbél) területén létezik egy nem-kolinerg, nem-adrenerg intrinsic neuronrendszer, amelynek ingerületátvevő anyagai purinok vagy a közelebbről még nem meghatározott neuropeptidek lehetnek.

Végeztünk immunhisztokémiai kísérleteket néhány, az alacsonyabbrendűekre jellemző peptid kimutatására (proctolin, FMRF-amid) békán is, de ezek a próbálkozások negatív eredménnyel jártak. Az ezzel egyidőben csigán illetve tücskön végzett kísérletekben pozitív eredményt kaptunk. A jövőben további kísérleteket tervezünk más neuropeptidek jelenlétének igazolására.

A közép- és utóbél területén a NADHd/AChE hisztokémiával illetve a párhuzamosan elvégzett GIF-reakcióval nem sikerült a gyomoréhoz hasonló intrinsic neuronrendszert kimutatni (főleg az AChE gyenge reaktivitása miatt). Más szerzők (Boyd és mtsai 1964, Read és Burnstock 1968) kimutatták ugyan, hogy az ATP transzmitter funkciót tölt be ezeken a bélszakaszokon, de nem bizonyították, hogy ez az anyag egy morfológiai módszerekkel elkülöníthető neuronpopulációban van jelen, mint az a gyomor esetében demonstrálható volt.



4. A hisztokémiai sajátosságok évszakos változása

Singh (1964) adatai szerint a szerotonin tava-
vasszal illetve ősszel eltérő mértékű dilatációt
vált ki a béka gyomor izomzatában. Mindaddig ez az
egyetlen adat állt rendelkezésre arra vonatkozóan,
hogy egy transzmitter évszakonként változó mértékben
hoz működésbe egy innervált területet.

Most morfológiai módszerekkel sikerült kimutatni
munkánk során a kateholaminok jelenlétének éves rit-
musát a béka bél myenterikus plexusában. Ezek szerint
a legintenzívebb a GIF a májustól szeptemberig ter-
jedő időszakban. Nyilvánvaló tehát, hogy a kateholami-
nok jelenléte nagymértékben függ a külső hőmérséklet-
től és miután a békák tudvalevőleg poikilotherm álla-
tok, ez összefüggésben van a testhőmérsékletükkel is.
A hőmérséklet csökkenésével a kateholaminok szinté-
zise is csökken, az idegvégződéseken lévő transz-
mittermennyiség pedig vagy kibocsátódik, vagy a sejt-
testbe visszashállítódva lizoszomális emésztés áldo-
zata lesz.

A NADHd és AChE enzimek mennyiségét állandónak ta-
láltuk minden évszakban. Ennek valószínűleg az a ma-
gyarázata, hogy miután ezek az enzimek konstituti-
vak a rájuk pozitív neuronokban, folyamatosan ter-
melődnek a fehérjeszintézis során.

5. A transzmitter ürítés mechanizmusa

Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a béka myenterikus plexusában sem az ideg-ideg, sem az ideg-izom kapcsolatok esetében az elemek között szinaptikus specializációt nem találtunk. Az ideg-izom kapcsolatok esetében ez nem meglepő, mert a viscerális simaizomzat vonatkozásában ez a megfigyelés meggyezik az irodalomban általánosan elfogadott nézettel (Baumgarten és mtsai 1970; Burnstock 1970, 1983; Furness és Costa 1980; Gabella 1972, 1979; Halasy és Benedeczky 1985; Halasy és mtsai 1986; Komuro és mtsai 1982; Richardson 1958, 1966; Rogers és Burnstock 1966; Taxi 1982).

Az ideg-ideg közötti úgy nevezett nem-szinaptikus transzmitter kibocsátást, a jelen évtized elején többen is vizsgálat tárgyává tették (Buma és mtsai 1984; Cuello 1983; Thureson-Klein 1983; Vizi 1984). Elsősorban a kis és nagy dense-core vezikulák ürülését tekintették ilyen jellegű folyamatnak. Ebben a vonatkozásban a nézetek nem változtak a legutóbbi években sem: továbbra is ezeket a vezikulákat tekintik a nem-szinaptikusan kibocsátott transzmitterek fő forrásának (Benedeczky és Halasy 1988; Zhu és mtsai 1986).

Az exocitotikus helyek láthatóvá tételére Buma és mtsai (1984) kidolgozták a tanninsavas rögzítési eljárásokat (TAGO ill. TARI módszer). Más szerzők

szerint (Zhu és mtsai 1986) e helyek feltüntetésére a Karnovsky-fixálónál kevesebb aldehidet tartalmazó rögzítők is alkalmasak. Vizsgálataink során megpróbálkoztunk a tanninsavas és az alacsony aldehid-tartalmú fixálók alkalmazásával is és a béka bél esetében az utóbbi módszer látszik eredményesnek.

Az irodalmi adatok (Benedeczy és Halasy 1988; Zhu és mtsai 1986) és saját vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy a béka bél myenterikus plexusának elemei között az információcsere a nem-szinaptikus transzmitter ürítés mechanizmusa szerint történik. A szinaptikus integráció - ha van ilyen - szerepe alárendelt.

Állást foglalhatunk abban a kérdésben is, hogy tartalmazhat-e egyszerre több transzmittert egy-egy idegvégződés. Miután a myenterikus plexusban igen eltérő profiltípusokat találunk, valószínűsíthető, hogy a vegyes vezikulatartalmú profilok több transzmittert tartalmaznak.

Ezt a megállapítást támasztja alá, hogy a ko-transzmisszióról eddig megjelent közleményekben (lásd pl. Burnstock 1976, 1978; Costa és Furness 1984; Hökfelt és mtsai 1977; Hökfelt és mtsai 1982; Osborne 1977) az eltérő típusú transzmitterek egyidejű jelenlétét ugyanazon terminálisban vegyes vezikulapopulációhoz kötötték. Van azonban adat arra vonatkozóan is, hogy

ugyanabban a vezikulában egyszerre több transzmitter is jelen lehet (Pelletier és mtsai 1981). Így - legalábbis a vegyes vezikulapopulációjú profilokról - kijelenthető, hogy bennük nagy valószínűséggel több neurotranszmitter illetve modulátor foglal helyet. Az idézett szerzők megállapították továbbá azt is, hogy a kis átmérőjű világos típusú vezikulák többnyire az ún. aminosav transzmittereket illetve az acetilkolin-t tartalmazzák, míg az aminok a kis dense-core, a peptidek pedig a nagy dense-core vezikulapopuláció jelenlétéhez köthetők. Ennek ellenére - miután citokémiaailag nem vizsgáltuk a profilokat - transzmittertartalmukra vonatkozóan konkrét megállapításokat nem tehetünk.

6. A myenterikus plexus fejlettségének törzsfejlődéstani összehasonlító értékelése

A béka bélcsatorna myenterikus plexusának törzsfejlődéstani összehasonlító vizsgálatakor két szempontot [?] kell figyelembe vennünk:

a. Van-e összefüggés az egyes gerinces osztályok fejlettségi foka és a myenterikus plexusban a területegységre eső neuronszám között?

b. Milyen neuronális integrációs lehetőségeket rejt magában a plexus morfológiai szervezettsége?

Az első kérdésre nehéz megadni a választ az igen hiányos irodalmi adatok miatt. Az emlős myenterikus plexus vonatkozásában az adatokból (Filogamo és Viguliani 1954; Gabella 1971, 1979, 1987; Irwin 1931 Leaming és Cauna 1961; Maslennikova 1962; Okhubo 1936a és b) megállapíthatjuk, hogy a neuronszám a különböző fajok különböző bélszakaszain 1300 és 20000 közé tehető. A legtöbb szerző 7 és 13 ezer közé teszi a neurondenzitást.

Alacsonyabbrendű gerincesek esetében csupán Burnstock (1959) nyert számolási adatokat a pisztráng myenterikus plexusára. A pisztráng myenterikus plexus neuronsűrűsége igen nagy; mintegy 20000 neuron/cm². Ez a szám meglehetősen magas, ami részben annak lehet a következménye, hogy a szerző metilénkék festéssel nyerte az adatokat, ami nem elég specifikus a neuronok kimutatására.

A további gerinces osztályok tekintetében (kétéltűek, hüllők, madarak) támaszkodhatunk saját méréseinkre (Gábrriel és mtsai, nyomdában).

A béka myenterikus plexusa mintegy 500-1000 neuront tartalmaz cm²-enként. Az előbél neuronszáma valamivel kisebb, mint a közép- illetve utóbélé, leszámítva a szfinkter funkciójú pylorikus régiót.

A gyík bélcsatorna valamivel több intrinsic elemet tartalmaz; itt a neuronszám cm²-enként több, mint 1100 és még a gyomor neurondenzitása is meghaladja az 1000-et.

Meglepő, hogy a magasabb törzsfejlődési fokon álló csirke myenterikus neuronjainak cm^2 -enkénti száma nem éri el a gyík bélcsatornáét: mintegy 7-800 neuron található itt. Az előző két adat ismeretében azt várnánk, hogy a csirkénél tovább növekedjék a neurondenzitás. Feltűnő azonban, hogy egy neurondenzitásbeli csökkenést már a hal és a béka myenterikus plexusa között is tapasztalhattunk. A probléma vizsgálata ezen a ponton átvezet a különböző plexustípusok integrációs folyamatainak kérdéséhez. A ganglionokba tömörülő neuronok ugyanis lényegesen kevesebb és rövidebb nyúlvánnyal létesíthetnek ugyanolyan számú kapcsolatot más neuronális elemekkel (szinapszis vagy nem-szinaptikus kommunikációs hely), mint a szórt elhelyezkedésű neuronokból felépülő plexus idegsejtjei.

Ebben a vonatkozásban is érdekes a béka myenterikus plexusa. Az előbbiben ganglionáris a szervezettség, majd a duodenális átmeneti szakasz után az addig ganglionáris plexus szoliter sejtekből és vékony rostokból álló hálózattá esik szét. Valószínűleg ezzel hozható összefüggésbe a középbél területén megnövekedő neurondenzitás is. Több intrinsic neuronra van ugyanis szükség ugyanolyan szintű neuronális integrációs működéshez ezen a bélszakaszon.

Figyelmet érdemlő a myenterikus neuropil szinapszisainak kérdése is. A halak esetében szinapszist itt elvétele lehet csak találni (Halasy és mtsai 1986), a békák esetében sem más szerzők, sem jómagam nem találtam szinapszist a neuropilben. Ugyanakkor a madarak és az emlősök esetében bőségesen vannak irodalmi adatok arra vonatkozóan, hogy - elsősorban a myenterikus neuronok sejttestén - igen gyakoriak a szinapszisok (Furness és Costa 1980; Gabella 1972, 1979; Halasy és mtsai 1987; Komuro és mtsai 1982). Jelen adatok alapján azt a következtetést szűrhetjük le, hogy a magasabbrendű gerincesek esetében mind a központi idegrendszer, mind a helyi neuronok specifikusabb és gyorsabb beavatkozásra képesek a perisztaltika megváltoztatása érdekében, mint az alacsonyabbrendű állatok. Ezzel a kérdéskörrel állhat összefüggésben egy specifikusan gátló transzmitternek, a gamma-amino vajsavnak (GABA) a jelenléte is a plexus intrinsic és extrinsic elemeiben.

A GABA jelenléte a madarak (Baetge és Gershon 1986), továbbá az emlősök (Cherubini és North 1984; Davanger és mtsai 1987; Jessen és mtsai 1979; Taniyama és mtsai 1982) myenterikus plexusában mind morfológiai, mind fiziológiai módszerekkel bizonyított. Nem tisztázott azonban az, hogy közvetlenül részt vesz-e a GABA a perisztaltika szabályozásában.

vagy csak modulálja azt a plexus intrinsic és extrinsic elemeire kifejtett hatásával. Nem tisztázott továbbá az sem, hogy extrinsic, intrinsic, vagy mindkét forrásból származnak-e a rostok? Intrinsic GABA-tartalmú neuront eddig csak a fürj myenterikus plexusából sikerült kimutatni (Baetge és Gershon 1986). Miután az elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok hiányoznak, nem tudni azt sem, hogy a myenterikus plexusban mely profiltípushoz kötött a GABA innerváció jelenléte. Az közzismert, hogy a központi idegrendszerben a GABA jelenléte a lapított (FV) vezikulapopulációval mutat összefüggést.

Az alacsonyabbrendű gerincesek bélcsatornájában ez a vezikulatípus csak igen kis százalékban fordul elő (lásd a halak vonatkozásában Halasy és Benedeczy 1985; Halasy és mtsai 1986; Halasy és mtsai 1988 - a béka esetében a disszertáció adatait). Így tehát e specifikus gátló innerváció jelenlétével a béka myenterikus plexusa esetében csak igen kis mértékben számolhatunk.

Összefoglalva megállapítható, hogy a béka bélidegrendszere morfológiai felépítése átmeneti jelleget mutat a halak nem-ganglionáris alacsony integrációs szintet képviselő bélidegrendszere és a madarak, valamint emlősök ganglionáris, magas integrációs fokon álló myenterikus plexusa között. Nem tudjuk azonban,

hogy ez a morfológiai heterogenitás milyen funkcionális következményekkel jár az egyes neuronok, ganglionok, illetve a myenterikus plexus egészének szintjén. E kérdés megválaszolására komplex morfológiai és fiziológiai vizsgálatokra lenne szükség, amely egyes ganglionok, illetve neuronok szintjén egyszerre képes regisztrálni az aktuális fiziológiai állapotot, és morfológiai módszerekkel annak változását is meg tudja mutatni. Az elektrofiziológiai mérések, majd az utánuk végrehajtott citokróm-oxidáz enzimhisztokémia alkalmazása (Mawe és Gershon 1986) e területen meghozta az első eredményeket, emlősök esetében.

Szerzők fiziológiailag azonosított működő myenterikus neuronokat képesek voltak megjelölni a fent említett enzimhisztokémiai módszerrel, így a fiziológiai tulajdonságok után a morfológiai sajátosságok is megfigyelhetők voltak. Transzmitter anyagokkal, azok agonistáival és antagonistáival az így azonosított myenterikus neuronok farmakológiai sajátosságait is képesek voltak vizsgálni. Ioncsatorna gátló anyagokkal szelektív működési állapotot értek el és ezt a citokróm-oxidáz enzimhisztokémia segítségével morfológiailag is követhetővé tették.

A jövőbeni vizsgálatoknak ki kell terjednie továbbá a neurotranszmitterek minél szélesebb körű immun-citokémiai azonosítására. Morfológiai, fiziológiai és

biokémiai módszereket együtt alkalmazva az eddiginél teljesebb képet kaphatunk a béka bél myenterikus plexusának szerkezetéről és működéséről.

VI. Összefoglalás

Munkánk során a következő, szakirodalomban még nem publikált megállapításokat tettük:

1. A béka bél myenterikus plexusában a Dogiel I. és II. típusú neuronokon kívül egy harmadik típusú, az előző kettőtől eltérő morfológiájú neuron is előfordul. (2)
2. Megállapítottuk a különböző bélszakaszokon a neuron-denzitást: ennek értéke 500 és 1100 közé esik. / cur²
3. Az eddigi irodalmi adatoktól eltérően a gyomor myenterikus plexusát nem az izomréteg belsejében, hanem az izomrétegen kívül, a tunica subserosa kötőszövetén találtuk meg.
4. Megállapítottuk, hogy az előbélben a katecholaminok nem fordulnak elő a myenterikus plexusban; a középbél és az utóbél területén ugyanakkor az aminerg innerváció detekálható. or
5. A 4. alatt említett vizsgálattal párhuzamosan elvégzett kettős hisztokémia (NADHd-AChE) segítségével bizonyítottuk, hogy a gyomor területén létezik egy nem-aminerg, nem-kolinerg intrinsic neuron- és rostrendszer. Ennek transzmitterét nem sikerült azonosítani eddig.
6. A GIF évszakonkénti vizsgálata során megállapítottuk, hogy a katecholaminok legnagyobb mennyiségben májusban, legkisebb mennyiségben január-februárban vannak jelen a myenterikus plexusban. (82)

Az ezzel egyidejűleg vizsgált egyéb hisztokémiai markerek (NADHd, AChE) nem mutattak évszakos változást.

7. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során felmértük valamennyi bélszakasz profil- és vezikulapopulációját, megállapítottuk a tendenciózus változásokat. (1) ebben meghatároz
8. Megállapítottuk továbbá, hogy a szinaptikus integráció szerepe valószínűleg alárendelt a myenterikus plexusban, mert vizsgálataink során eddig egyetlen bélszakaszon sem találtunk szinapszist sem a neuronok felületén, sem a neuropilben. sz
9. Miután helyenként exocitózisra utaló morfológiai jeleket figyeltünk meg az axonok membránján, feltételezzük, hogy az un. nem-szinaptikus transzmitter kibocsátás útján történik a neurotranszmisszió. φ
10. Az irodalmi és a saját adatok összevetésével megállapítottuk, hogy a béka részben ganglionáris bélidegrendszere az átmeneti lépcsőfok a halak nem ganglionáris myenterikus plexusa és a magasabbrendű gerincesek fejlett, teljes hosszában ganglionáris bélidegrendszere között. (w)

VII. Köszönetnyilvánítás

E disszertáció elkészítésénél igen sok segítséget kaptam az Állattani Tanszék munkatársaitól. Köszönöm Benedeczky István professzor úrnak a disszertáció írása során nyújtott igen értékes segítségét, ami nélkül e munka aligha készülhetett volna el.

Az egyes kísérleti módszerek kipróbálása és alkalmazása során értékes segítséget kaptam a következő munkatársaktól:

Dr. Kovács Gáborné (hematoxilin-eozin festés)

Dr. Csoknya Mária (ezüstimpregnáció)

Dr. Halasy Katalin (NADHd hisztokémia)

Dr. Fekete Éva (fluoreszcens vizsgálatok)

Dr. Benedeczky István (elektronmikroszkópia).

A fotótechnika Acsai Ferenc, a gépelés Ács Sánta Ágnes munkáját dícséri.

A fent említett munkatársak mellett hálás köszönettel tartozom családomnak, elsősorban feleségemnek, aki a disszertáció írása alatt átvállalta a családdal kapcsolatos terhek igen jelentős hányadát.

A számos további, itt nem felsorolt segítőm munkáját is tisztelettel köszönöm.

VIII. Táblázatok

1. táblázat

A Krebs-oldat összetétele

Összetevő	Koncentráció(g/l)	Bemérés(ml)
KCl	11.5	5
NaCl	9	102
NaHCO ₃	13	13
NaH ₂ PO ₄	13	1
CaCl ₂	12	3
MgCl ₂ ×6 H ₂ O	21	1.5
Glükóz	54	5



2. táblázat

AChE inkubáló oldat összetétele

Összetevő	Bemérés(g)
CuSO ₄	0,3
Glicin	0,375
MgCl ₂ ×6 H ₂ O	1,0
Maleinsav	1,75
NaOH	1,2 (30 ml 4%-os oldat formájában)
Na ₂ SO ₄	68 (40% melegen telített oldat 170 ml)
Összesen	200 ml pH 6,0 -on.

Szubsztrátként 10 ml oldatonként 20 mg acetyl-tiokolin-jodidot használunk. A nem specifikus kolinészterázok gátlására 10^{-4} M etopropazint alkalmazunk.

3. táblázat

Nyári béka ringer összetétele

Összetevő	Bemérés (g)
NaCl	0,650
KCl	0,014
CaCl ₂	0,011
NaHCO ₃	0,020
glükóz	0,100

Összesen: 100 ml oldathoz pH: 7.0-7.2

4. táblázat

Elektronmikroszkópos beágyazás

Anyag	koncentráció (%)	idő(perc)
etanol	30	5
etanol	50	15
etanol (uranilacetáttal telítve)	70	60
etanol	96	30
etanol	100	3x20
propilénoxid	-	2x15
propilénoxid-durcupan 1:1		120
durcupan (56°C)	-	120

Polimerizálás termosztátban: 56°C-on 48 órán keresztül.

5. táblázat

NBT/NADHd sejtszámolási adatok (sejt/cm²)

Bélszakasz	1.	2.	3.	4.	5.	Átlag+s.d.
gyomor cardia- fundus	728	503	627	534	529	584 ₊₈₀
gyomor pylorus	1100	927	818	1433	1009	1057 ₊₁₆₁
patkóbél	844	700	-	553	533	658 ₊₁₀₅
vékonybél proximális	814	1083	1000	701	773	874 ₊₁₂₁
vékonybél disztális	975	1033	-	833	932	956 ₊₅₅
utóbél	-	-	686	-	733	710 ₊₂₃

Az 1. példányt februárban, a 2.-at és a 3.-at áprilisban
a 4.-et és 5.-et novemberben gyűjtöttük be és használtuk fel.

6. táblázat

	LGV	AGV	FV	DCV	LGV+ FV	LGV+ DCV	AGV+ DCV	DCV+ FV	AGV+ LGV	AGV+ FV	ÖSSZ:profil
nyelőcső myent.pl	18	14	4	-	36	24	8	4	24	6	138
gyomor submuc.pl.	2	82	8	16	-	-	7	-	-	5	120
gyomor myent. pl.felszíni	40	19	5	30	-	10	10	10	-	-	124
gyomor myent. pl.mély	31	8	7	3	3	11	11	4	-	1	79
patkóbél myent.pl.	41	33	12	4	12	13	20	4	31	-	170
vékonybél myent.pl.	24	48	8	16	-	-	19	9	-	-	124
utóbél myent.pl	65	12	-	-	12	26	14	4	30	2	165
ÖSSZESEN:	221	226	44	69	63	84	79	35	85	14	920

	LGV prof.vez.	LG vez.	AG prof.vez.	AG vez.	FV prof.vez.	F vez.	DCV prof.vez.	DC vez.	Össz. vez.	$\frac{LGP+DCP}{AGP+FP}$	$\frac{LGV+DCV}{AGV+FV}$
Nyelőcső myent.pl.	102	417	52	501	50	190	36	102	1210	1,35	0,75
Gyomor sub- muc.pl.	2	10	93	487	13	43	23	90	677	0,23	0,17
Gyomor myent. pl.felszíni	50	176	29	133	15	74	60	102	495	2,50	1,34
Gyomor myent. pl.mély	45	407	20	205	15	109	29	70	791	2,11	1,51
Patkóbél myent.pl.	97	701	84	721	28	272	41	280	1974	1,23	0,99
Vékonybél myent.pl.	24	40	67	428	17	190	35	140	798	0,70	0,29
Utóbél myent.pl.	133	808	58	821	18	90	44	139	1849	2,39	1,05
ÖSSZESEN (ill.átlag)	453	2559	404	3296	156	894	268	923	7672	1,50 1,29	0,87 0,83

Irodalomjegyzék

- Aikawa, T. (1931): On the innervation of frog stomach
Jap. J. med. Sci. biophys. 2, 91-129.
- Ali, H. and Mc Lelland, J. (1978): Avian myenteric nerve
plexuses. A histochemical study. Cell Tiss. Res.
189, 537-548.
- Anderson, C. (1983): Evidence for 5-HT containing intrinsic
neurons in the teleost intestine. Cell Tiss. Res.
230, 377-386.
- Anderson, C. and Campbell, G.; (1984): Evidence for 5-HT
neurons in the gut of the toad, *Bufo marinus*.
Cell Tiss. Res. 238, 313-317.
- Anderson, M. and Cochrane, D.G. (1977): Studies on the midgut
of desert locust, *Schistocerca gregaria* I. Morphology
and electrophysiology of the muscle coat.
Physiol. Entomol. 2, 243-253.
- Andrew, A. (1971): The origin of intramural ganglia.
J. Anat. 108, 169-184.
- Axelsson, S.; Björklund, A.; Falck, B.; Lindwall, O. and
Svensson, L.A. (1973): Glyoxylic acid condensation: a new
fluorescence method for the histochemical demonstration
of biogenic monoamines.
Acta Phys. Scand. 87, 57-62,
- Ábrahám, A. (1983): Ultrastructural studies on the gastro-
intestinal nervous system of *Helix pomatia*.
Acta biol. Szeged, 29, 129-136.
- Barthó, L. and Holzer, P. (1985): Search for a physiological
role of substance P in gastrointestinal motility.
Neuroscience 16, 1-32.
- Baetge, G. and Gershon, M. D. (1986): GABA in the PNS:
Demonstration in enteric neurons.
Brain Res. Bull. 16, 421-424.
- Baumgarten, H.G.; Holstein, A.-F. and Owman, C.H. (1970):
Auerbach's plexus of mammals and man: electron micros-
copic identification of three different types of
neuronal processes in the myenteric ganglia of the
large intestine of rhesus monkeys guinea-pigs and man.
Zeitschr. Zellforsch. mikr. Anat. 106, 376-397.
- Baumgarten, H.G.; Björklund, A.; Lachenmayer, E.; Nobin, A.
and Rosengreen, E. (1973): Evidence for existence of
serotonin, dopamine and noradrenalin containing
neurons in the gut of *Lampetra fluviatilis* Z. Zell-
forsch. 141, 33-46.
- Benedeczky, I. and Miller, T.A. (1983): Ultrastructure of
the neuromuscular junction in the hindgut of *Peri-
planeta americana* and *Locusta Migratoria*.
Z. Mikrosk.-Anat. Forsch. (leipzig) 97, 505-519.
- Benedeczky, I. and Halasy, K. (1988): Visualization of
non-synaptic release sites in the myenteric plexus of
snail.
Neuroscience in print.

- Benedeczky, I.; Halasy, K.; Fekete, É.; Gabella, G.; Csoknya, M.; Tóth, L, and Gábríel, R. (1986): Comparative ultrastructural and histochemical investigation of the enteric nervous system. Congress of the Hungarian Society of Anatomists, Histologists and embryologists, Szeged, Abstracts.
- Björklund, A.; Lindwall, O. and Svensson, L.A. (1972): Mechanism of fluorophore formation in the histochemical glyoxylic acid method for monoamines. *Histochemia*, 32, 113-131.
- Boselová, L. and Meitner, E.R. (1977): Komparative mikromorphologie der Speiseröhre einiger Wirbeltiere. *Gegenbaurs, morph. Jahrb.* 123, 1-17.
- Botazzi, e. (1899): The action of the vagus and the sympathetic on the oesophagus of the toad. *J. Physiol. (Lond.)* 25, 152-164.
- Boyd, H.; Burnstock, G. and Rogers, D. (1964): Innervation of the large intestine of the toad (*Bufo marinus*) *Brit. J. Pharmacol.* 23, 151-163.
- Brimijoin, S. (1983): Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Progr. in Neurobiol.* 21, 291-322.
- Buma, P., Roubos, E. W. and Buijs, R. M. (1984): Ultrastructural demonstration of exocytosis of neural neuroendocrine and endocrine secretions, with an in vitro tannic acid (TARI) method. *Histochemistry* 80, 247-256.
- Bust, A.M. and Silver, A. (1973): Histochemistry of choline acetyltransferase: A critical analysis. *Brain Res.* 62, 509-516.
- Burnstock, G. (1959): The innervation of the gut of the brown trout (*Salmo trutta*). *Q. J. Micr. Sci.* 100, 199-220.
- Burnstock, G. (1970): Structure of smooth muscle and its innervation. In: *Smooth muscle*, London, Arnold.
- Burnstock, G. (1972): Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509-581.
- Burnstock, G. (1976): Do some nerve cells release more than one neuro-transmitter? *Neuroscience* 1, 239-248.
- Burnstock, G. (1978): Do some sympathetic neurons release both adrenalin and acetylcholine. *Prog. Neurobiol.* 11, 205-222.
- Burnstock, G. (1983): Autonomic neurotransmitters and torfic factors. *J. Aut. Nerv. Syst.* 7, 213-217.
- Burnstock, G. (1986): Autonomic neuromuscular junction: current developments and future directions. *J. Anat.* 146, 1-30.
- Burnstock, G.; Satchell, D. G. and Smythe, A. (1972): A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different Vertebratespecies. *Brit. J. Pharmacol.* 46, 234-242.

- Cajal, S.R.y (1902): Nota sobre al plexo de Auerbach de la Rana. Trab. Lab.Histol. Fac. Med. Barcelona 2, 23-24.
- Cauna, N. (1959): The mode of termination of the sensory nerves and its significance. J. comp. Neurol. 113, 169-210.
- Cherubini, E. and North, R.A. (1984): Action of aminobutyric acid on neurones of guinea-pig myenteric plexus. Br. J. Pharmacol. 82, 93-100.
- Cole, E.C. (1926): Notes on the extension and organization of the myenteric plexus of frog. J. Comp. Neurol, 41, 311-317.
- Costa, M. and Furness, J. B. (1984): Somatostatin is present in the subpopulation of noradrenergic nerve fibers supplying the intestine. Neuroscience 1, 911-919.
- Cuello, A.C. (1983): Nonclassical neuronal communications Fed. Proc, 42, 2912-2922.
- Csoknya, M. and Benedeczy, I. (1986): Cell types of the enteric nerve plexuses in the chicken. Acta Biol. Szeged, 32, 93-102.
- Davanger, S.; Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (1987): Immunocytochemical localization of GABA in cat myenteric plexus. Neurosci. Lett. 73, 27-32.
- Dixon, W.E. (1902): The innervation of frog stomach. J. Physiol. (London) 28, 57-75.
- Dogiel, A.S. (1896): Zwei Arten sympatischer Nervenzellen Anat.Anz. 11, 679-687.
- Dogiel, A.S. (1899): Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. Arch.Anat. Physiol. 5, 130-159.
- Eckert, M.; Agricola, H. and Penzlin, H. (1981): Immunocytochemical identification of proctolinlike immunoreactivity in the terminal ganglion and hindgut of the cockroach *Periplaneta americana* (L). Cell Tiss. Res. 217, 633-639.
- Ekblad, E.; Hakanson, R. and Sundler, F. (1984): VIP and PHI coexist with an NPY-like peptide in intramural neurons of the small intestine. Regulatory Peptides 9, 279-287.
- Ekblad, E.; Winter, C.; Ekman, R.; Hakanson, R. and Sundler, F. (1987): Projections of the peptide containing neurons in rat small intestine. Neuroscience 20, 169-188.
- Falck, B.; Hillarp, N.A.; Thieme, G. and Torp, A. (1962): Fluorescence of catecholamine and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 10, 348-354.
- Farber, E.; Sternberg, W. H. and Dunlap, C.F. (1956): Histochemical localization of specific oxidative enzymes I. Tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotide diaphorase. J. Histochem. Cytochem. 4, 254-265.
- Fekete, É. (1984): Distribution of fluorogenic monoamines in the gastrointestinal musculature of *Helix pomatia*. Histochemistry, 81, 311-312.

- Filogamo, G. and Viguliani, F. (1954): Ricerche sperimentali sulla correlazione tra estensione del territorio di innervazione e grandezza e numero delle cellule gangliari del plesso mienterico (di Auerbach) nel cane. *Riv. patol. nerv. ment.* 75, 1-32.
- Furness, J. B. and Costa, M. (1980): Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5, 1-20.
- Gabella, G. (1969): Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experientia* 25, 218-219.
- Gabella, G. (1971): Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109, 81-95.
- Gabella, G. (1972): Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69-97.
- Gabella, G. (1979): Innervation of the gastrointestinal tract. *Int. Rev. Cyt.* 59, 129-193.
- Gabella, G. (1987): The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience* 22, 737-752.
- Gabella, G. and Halasy, K. (1987): On the nerve plexus of chicken gizzard. *Anat. Embryol.* 177, 97-103.
- Gábrriel, R.; Halasy, K. and Csoknya, M. (1987): Cytochemical detection of NADH-diaphorase positive nerve cells in the intestinal canal of frog. *Acta Biol. Szeged*, 33, 85-95.
- Gábrriel, R.; Halasy, K. and Csoknya, M. (1988): Visualization of neurons by NADH-diaphorase staining in the myenteric plexus of some invertebrate and vertebrate species. *Z. mikr.-anat. Forsch.* in print.
- Gershon, M. D. and Tompson, E. R. (1973): The maturation of neuromuscular function in a multiple innervated structure: development of the longitudinal smooth muscle of the fetal mammalian gut and its cholinergic, excitatory, adrenergic inhibitory and non-adrenergic inhibitory innervation. *J. Physiol.* 234, 257-278.
- Göracs, T.; Antal, M.; Oláh, É. and Székely, Gy. (1979): An improved cobalt labeling technique with complex compounds. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 30, 79-86.
- Gunn, M. (1951): A study of the enteric plexuses in some amphibians. *Q. Jl. microsc. Sci.* 92, 55-77.
- Gunn, M. (1959): Cell types in the myenteric plexus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 111, 83-100.
- Gunn, M. (1968): Histological, histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *J. Anat.* 95, 160-169.
- Halasy, K. and Benedeczký, I. (1985): Electron microscopic study on the innervation of the gut musculature in the carp. *Acta Biol. Szeged*, 31, 27-42.
- Halasy, K.; Benedeczký, I. and Abrahám, A. (1983): Light- and electron microscopical studies on the gastrointestinal tract of *Helix pomatia*: innervation of the muscular layer. *Abstr. VIII. Int. Malacological Congr. Budapest*, 95-99.

- Halasy, K.; Benedeczky, I. and Ábrahám, A. (1986): Fine structure of the neuromuscular junction in the small intestine of a teleostean fish: tench (*Tinca tinca* L.) *Acta Morph. Hung.* 34, 73-86.
- Halasy, K.; Benedeczky, I.; Fekete, É.; Tóth, L. and R. Gábríel (1988): Enteric neuromuscular junctions: comparison of ultrastructural features in different phylogenetic groups. *Neuroscience*, nyomdában.
- Halasy, K.; Fekete, É.; Csoknya, M.; Gábríel R. and Benedeczky, I. (1987): Fine structure and cytochemical features of enteric neuromuscular junctions in lower vertebrates. *Neuroscience* 22(S), 344.
- Hökfelt, T.; Elfvin, L.G.; Elde, R.; Schutzberg, M.; Goldstein, M. and Luft, R. (1977): Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic nerves. *PNAS* 74, 3587-3591.
- Hökfelt, T.; Lundberg, J. M.; Skirboll, L.; Johansson, O.; Schultzberg, M. and Vincent, S.R. (1982): Coexistence of classical transmitters and peptides in neurones. In: *Co-transmission* (ed. A.C. Cuellar) 77-125. MacMillan Press, London.
- Irwin, D. A. (1931): The anatomy of Auerbach's plexus. *Am. J. Anat.* 49, 141-166.
- Jensen, J.; Holmgren, S. and Jönsson, A.-C. (1987): Substance P-like immunoreactivity and the effects of tachykinins in the intestine of atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Aut. Nerv. Syst.* 20, 25-33.
- Jessen, K. R.; Myrsky, R.; Dennison, M. F. and Burnstock, G. (1979): GABA may be a neurotransmitter in the vertebrate peripheral nervous system. *Nature*, 281, 71-74.
- Karnovsky, M. J. and Roots, L. (1964): A direct coloring thiocolin method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 219-221.
- Koelle, G.B. (1954): The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 100, 211-228.
- Kolle, G.B. and Friedenwald, J.S. (1949): A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. (NY)*, 70, 617-622.
- Komuro, T.; Baluk, P. and Burnstock, G. (1982): An ultrastructural study of nerve profiles in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience* 7, 295-305.
- Kreutzberg, G.W. and Holländer, H. (1983): Compatibility of horseradish peroxidase tracing with the histochemical demonstration of oxydoreductases. *J. Neurosci. Meth.* 8, 177-181.
- Langley, J. N. (1921): The autonomic nervous system. Part 1. Heffer, Cambridge.
- Leaming, D.B. and Cauna, N. (1961): A qualitative and quantitative study of the myenteric plexus in the small intestine of the cat. *J. Anat.* 95, 160-169.
- Maslennikova, L. D. (1962): On the relation between the motor function of the intestine and the gradient of its nervous elements. *Bull. Exp. Biol. Med. USSR*, 52, 972-976.

- Mawe, G.M. and Gershon, M.D. (1986): Functional heterogeneity in the myenteric plexus: demonstration using cytochrome oxidase as a verified cytochemical probe of the activity of individual enteric neurons. *J. Comp. Neurol.* 249, 381-391.
- Nachlas, M. M.; Walker, D. G. and Seligman, A.M. (1958): The histochemical localization of triphosphoryridine nucleotide diaphorase. *Biophys. J. Biochem. Cytol.* 4, 467-473.
- Nemcsók, J.; Vigh, É.; Halasy, K.; Fekete, É. and Benedeczky, I. (1986): Localization and quantitative distribution of biogenic monoamines in the intestinal tract of locust, snail and carp. *Neurochem. Int.* 2, 505-510.
- Oka, Y.; Takeuchi, H.; Saton, M. and Ueda, K. (1987): Morphology and distribution of the preganglionic parasympathetic neurons of the facial, glossopharyngeal and vagus nerves in the Japanese toad: a cobaltic lysine study. *Brain Res.* 400, 389-395.
- Okhubo, K. (1936a): Studien über das intramurale Nervensystem des Verdauungskanals. II. Die plexus myentericus und plexus subserosus der Meerschweines. *Jap. J. med. Sci. Anat.* 6, 31-37.
- Okhubo, K. (1936b): Studien über das intramurale Nervensystem des Verdauungskanals III. Affe und Mensch. *Jap. J. med. Sci. Anat.* 6, 219-247.
- Osborne, N.N. (1977): Do snail neurones contain more than one neurotransmitter? *Nature (Lond.)*. 270, 622-623.
- Pearse, A.G.E. (1960): *Histochemistry, Theoretical and Applied* London, Churchill.
- Peichl, L. and Wässle, H. (1981): Morphological identification of on- and off-centre brisk transient (Y) cells in the cat retina. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 212, 139-156.
- Pelletier, G.; Steinbusch, H. M. W. and Verhofstad, A. A. J. (1981): Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense-core vesicles. *Nature* 293, 71-72.
- Peters, A.; Palay, S.L. and Webster, H.F. (1976): *The fine structure of the nervous system.* Saunders, Philadelphia.
- Pitman, R.M.; Tweedle, C.D. and Cohen, M.I. (1972): Branching of central neurons: intracellular cobalt injection for light and electron microscopy. *Science* 176, 412-414.
- Rashid, S. (1972): The nature of the parasympathetic nerve fibers of the stomach of *Rana temporaria*. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 195, 247-251.
- Read, J. B. and Burnstock, G. (1968): comparative histochemical studies of adrenergic nerves in the enteric plexuses of vertebrate large intestine. *comp. Biochem. Physiol.* 27, 505-517.
- Read, J. B. and Burnstock, G. (1969): Adrenergic innervation of the gut musculature in Vertebrates. *Histochemie*, 17, 263-272.
- Reynolds, E.S. (1963): The use of lead citrate as an electron dense stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17, 208-212.

- Richardson, K. C. (1958): Electronmicroscopic observation on Auerbach's plexus in the rabbit with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *Amer. J. Anat.* 103, 99-136.
- Richardson, K. C. (1966): Electron microscopic identification of autonomic nerve endings. *Nature* 210, 756.
- Rogers, D. C. and Burnstock, G. (1966): Multiaxonal autonomic junctions in intestinal smooth muscle of the toad (*Bufo marinus*). *J. Comp. Neurol.* 126, 255-284.
- Salimova, N. and Fehér, E. (1982): Innervation of the alimentary tract in chondrosteian fish (Acipenseridae). *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 30, 213-222.
- Sauer, M. E. and Rumble, C. T. (1946): The number of nerve cells in the myenteric and submucous plexuses of the small intestine of the cat. *Anat. Rec.* 96, 373-381.
- Scherer-Singler, U.; Vincent, S.R.; Kimura, H. and McGeer, E.G. (1983): Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Histochem. cytochem.* 9, 229-234.
- Sceurmann, D.W.; Stach, W.; De Goodt-Lassell, M.H.A. and Timmermans, J. P. (1987): Calcitonin gene-related peptide in morphologically well defined type II. neurons in the enteric nervous system in the porcine small intestine. *Acta Anat.* 129, 325-328.
- Sceurmann, D.W. and Stach, W. (1985): NADH-dehydrogenase reaction in combination with immunoperoxidase (PAP) staining for light microscopic observation on the interneural relations of the enteric nervous system in the pig. *Acta Anat.* 124, 31-34.
- Schutzberg, M.; Hökfelt, T.; Nilsson, G.; Terenius, L.; Rehfeld, J.F.; Brown, M.; Elde, R.; Goldstein, M. and Said, S. (1980): Distribution of peptide and catecholamine-containing neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalin, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine B-hydroxylase. *Neuroscience* 5, 689-744.
- Stach, W. (1980): Zur neuronalen organisation des plexus myentericus (Auerbach) in Schweinedünndarm I. neurone 94, 833-849.
- Stach, W. (1981): Zur neuronalen organisation des plexus myentericus (Auerbach) in Schweinedünndarm. II. Typ. II. neurone 95, 161-182 *Z. mikr.-Anat.*
- Stach, W. (1982a): Zur neuronalen organisation des plexus myentericus (Auerbach) in Schweinedünndarm III. Typ. III. neurone 96, *Forsch.* 497-516.
- Stach, W. (1982b): Zur neuronalen organisation des plexus myentericus (Auerbach) in Schweinedünndarm IV. Typ. IV. neurone 96, 972-994.
- Stach, W. (1985): Zur neuronalen organisation des plexus myentericus (Auerbach) in Schweinedünndarm V. Typ. V. neurone 99, 562-582.

- Sneddon, J.D.; Smythe, A.; Satchell, D. and Burnstock, G. (1973): An investigation of the identity of the transmitter substance released by non-adrenergic, non-cholinergic excitatory nerves supplying the small intestine of some lower Vertebrates. *Comp. Gen. Pharmacol.* 4, 53-60.
- Sundler, F.; Mogzahimdek, E.; Hakanson, R.; Ekelund, M., and Emson, P. (1983): Nerve fibers in the gut and pancreas of the rat displaying neuropeptide Y immunoreactivity. Intrinsic and extrinsic origin. *Cell Tiss. Res.* 230, 487-493.
- Taniyama, K.; Miki, Y. and Tanaka, C. (1982): Presence of γ -aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the Auerbach's plexus of cat colon. *Neurosci. Lett.* 29, 53-56.
- Taxi, J. (1982): Morphology of the autonomic nervous system. In: *Frog neurobiology*, Elsevier, New York.
- Thomas, E. Pearse, A.G.E. (1961): The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie*, 2, 266-282.
- Thureson-Klein, A. (1983): Exocytosis from large and small densecored vesicles in noradrenergic nerve terminals. *Neuroscience* 10, 245-252.
- Torre, J. C. de la and Surgeon, J. W. (1976): A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique, the SPG method. *Histochemistry* 49, 81-93.
- Yuh, L. (1931): On the innervation of the stomach of the Japanese frog. *Jap. J. med. Sci. biophys.* 2, 25-33.
- Vig, E.; Halasy, K.; Fekete, É.; Nemcsók, J. and Benedeczky I. (1985): Biochemical, fluorescence microscopic and ultrastructural studies on biogenic monoamines in the gut of *Helix pomatia*. *Acta Biol. Szeged*, 31, 13-25.
- Vincent, S.R.; Satoh, K.; Armstrong, M.D. and Fibiger, H.C. (1983): NADPH-diaphorase: A selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. *Neurosci. Lett.* 43, 31-36.
- Vincent, S.R.; Satoh, K.; Armstrong, D.M.; Panula, P.; Vale, W. and Fibiger, H.C. (1986): Neuropeptides and NADPH-diphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat. *Neuroscience* 17, 167-182.
- Vizi, E.S. (1984): Non-synaptic interactions between neurons: modulation of neurochemical transmission. *Pharmacological and clinical aspects*. John Wiley, New York.
- Vorobiev, V.S. (1966): On morphology of interneuronal connections in intramural ganglia of Amphibia. *Ark. Anat. Gistol. Embryol.* 51, 71-75.
- Walker, D.G. (1963): A survey of dehydrogenases in the various epithelial cells in the rat. *J. Cell. Biol.* 17, 255-277.
- Wallace, M. N. (1986): Spatial relationship of the NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase lattices in the rat and mouse superior colliculus. *Neuroscience* 19, 381-391.

- Watson, A.H.D. (1979): Fluorescent histochemistry of the teleost gut: evidence of presence of serotonergic neurons. *Cell Tiss. Res.* 197, 155-167.
- Watson, M.L. (1958): Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 457-479.
- Willard, A.L. and Nishi, R. (1987): Neuropeptides mark functional distinguishable cholinergic enteric neurones. *Brain res.* 422, 163-167.
- Wong, W.C. (1973): The myenteric plexus in the oesophagus of the toad (*Bufo melanostictus*). *Acta Anat. (Basel)* 80, 82-90.
- Wong, W.C.; Sit, K. H.; Ngu, K.K.F. and Chin, K.N. (1971): A cholinesterase study of the enteric plexuses in the toad (*Bufo melanostictus*). *Acta Anat. (Basel)* 80, 82-90.
- Zhu, P.C.; Thureson-Klein, A. and Klein, R.L. (1986): Exocytosis from large dense cored vesicles outside the active synaptic zones of terminals within the trigeminal subnucleus caudalis: a possible mechanism for neuropeptide release. *Neuroscience* 19, 43-54.