

Az idegrendszer ultrastrukturális jellemzése a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis*, em  
briogenezise során

PhD tézisek

Nagy Tamás

Készült: A Magyar Tudományos Akadémia Balatoni Limnológiai Kutatóintézetében.

Tihany 2003

## Bevezetés

A nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata), mind az általános embriológiai kutatásoknak (Raven 1966), mind az idegrendszer embriogenezisével foglalkozó kutatásoknak (Mescheryakov, 1990) fontos modellje. A tojáson belül megvalósuló embriogenezis három fő fejlődési szakaszra különíthető el (trochophora, veligera, felnőtt-szerű), melyek során az embrió teljes átalakuláson esik át. A metamorfózis a veligera és a korai felnőtt-szerű szakaszok között valósul meg, és a folyamat végére már kialakul az állat végső testfelépítése. A garat körüli ganglion rendszer a metamorfózis alatt alakul ki végleges formájában (Mescheryakov 1990). A tojásból kikelve az állat készen áll aktív, táplálékszerző külső juvenilis életre.

A központi idegrendszer embrionális fejlődésének finomszerkezeti vizsgálata tudós csigákban napjainkig a gerinctelen neurobiológia feltáratlan területe. Jelen munkámmal ezt a hiányt részben pótlandó, egyrészt a korábban *Lymnaea* embriókban publikált kémiai, neuroanatómiai eredményekhez, másrészt további magatartás-fiziológiai kutatásokhoz finomszerkezeti alapot kívántam szolgáltatni. Vizsgálatainkcélja a központi idegrendszer kialakulásának ultrastukturális jellemzése volt a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* embriogenezise során. Figyelmünk három kitüntetett embrionális stádium felé irányult: E21 (35%), veliger, premetamorfotikus stádium, az E2411-E24/2 (5055%) szakasz, a metamorfózis stádiuma, és az E26 (75%), posztmetamorfotikus (felnőtt-szerű) stádium. Az embriogenezis végső stádiuma, az E28/29 (95-100%) szakasz, mint összehasonlítási alap, szintén a vizsgálat tárgyát képezte, minthogy az állat ezt követően kezdi meg juvenilis, tojáson kívüli életét.

Az egyes stádiumokat három fő szempont szerint vizsgáltuk: i) a gangliogenezis általános folyamata, ii) a ganglion sejtek és a neuropil finomszerkezete, iii) az interneuronális kapcsolatok finomszerkezete.

A pulmonátákhoz tartozó *Lymnaea* embrionális fejlődése eltér a legtöbb Gasztropodáétól, beleértve az alsóbb osztályú Opisztobranchiákat is, mivel a teljes embriogenezis intrakapszulárisan megy végbe. Az *Aplysia californica* (Opisthobranchiata) tojáson kívüli, 37 napig tartó embriogenezise során veli gera és metamorfotikus szakaszokat különböztethetünk meg (Kriegstein 1977, a, b; Kandel és mtsai 1980)..

Az egyedfejlődés során a sejtek, beleértve a neuronokat is, differenciálódáson mennek át, melynek során rögzül a funkciójuk. A neuronok egyik differenciált sajátossága az, hogy milyen transzmitttereket vagy modulátorokat használnak működésükhöz. Az egyedfejlődés nyomonkövetésének egyik lehetséges megközelítése a különböző kémiai hírvivő-rendszerek megjelenése az egyes neuronokban és ezek szerepének feltárása. Ennek során a neuronok morfogenetikus, illetve magatartás-szabályozó funkciója meghatározható. Az utóbbi időkben különböző szignál molekulák celluláris-idegrendszeri lokalizációjának feltárását és eloszlásának neuroanatómiai jellemzését immuncitokémiai módszerekkel végezték el a *Lymnaea* embrionális és posztembrionális fejlődése során (serotonin /5-HT/, Croll és Chiasson, 1989; Marois és Croll, 1992; Voronezhskaya és Elekes, 1993; oktopamin, Elekes és mtsai, 1996; dopamin/katekolaminok, Voronezhskaya és mtsai, 1999, Croll és mtsai, 1999; FMRF-amid: Croll és Voronezhskaya, 1996; Voronezhskaya és Elekes, 1996; FMRF-amid gén neuropeptidei: Voronezhskaya és Elekes, 1997, 2003; nitrogén monoxid (NO): Serfózó és Elekes, 1998, Serfózó és mtsai, 2002.). Ezekből a vizsgálatokból arra következtethetünk, hogy az immunreaktív idegsejtek megjelenése és neuro-anatómiai fejlődése jellegzetes időbeli változásokat mutat mind az embrionális, mind a posztembrionális élet során. Az 5-HT, dopamin és FMRF-amid immunreaktív neuronok egy csoportjának embrionális megjelenése tranziensnek bizonyult (Voronezhskaya és Elekes 1993, 1996; Voronezhskaya és mtsai 1999). Az immunreaktivitás ezen átmeneti jellegének oka még nem tisztázott az embrió- és neurogenézis során. Nem ismert, hogy ez a tranziens elemek végleges eltűnését (sejthalál) vagy csak fenotípiájuk megváltozását jelenti, esetleg mindkét jelenség egyidejűleg fennáll. Az immunpozitív neuronok egy másik csoportja (5-HT, FMRF-amid) a korai embriogenezistől folyamatos fejlődést mutat, míg egy harmadik csoportjuk (dopamin, oktopamin, NO) megjelenése az embriogenezis utolsó szakaszára jellemző. A tranziens és korai megjelenésű hírvivő rendszerek feltehetőleg morfogenezis és a gangliogenezis folyamataiban, míg a késői megjelenésű hírvivő rendszerek a juvenilis, aktív táplálékszerző életmóddal összefüggő magatartásformák végső kialakulásában vesznek részt.

Az idegrendszer embriogenezisének ultrastrukturális aspektusai gerinctelenekben beleértve a Gasztropodákat is kevésbé ismertek. Gasztropodák esetében csak néhány, a központi idegrendszer általános fejlődését, valamint a gangliogenezist ultrastrukturális szempontból bemutató tanulmány született (Page 1992a, b; Caro II és Kempf 1994).

Kandel és munkatársai (1980) részletesen tanulmányozták az *Aplysia californica* pleuroabdominális ganglionjának fejlődését és az alábbi következtetésre jutottak: i) egyes identifikált neuronok axogenezisét valószínűleg a perikaroinjaikon kialakuló szinaptikus kapcsolat indítja be; ii) a nagyméretű granulumokat tartalmazó tápláló gliasejtek korai megjelenésének alapvető szerepe lehet az axon-arborizáció fejlődésében.

A puhatestűeknél (csigák) vizsgált reflex körök működésénél (pl. Alkon, 1974; Kandel, 1976; Carew és mtsai, 1981). a legtöbb esetben az efferens neuronok célsejtjei izomrostok, melyekkel (illetve az általuk alkotott izomkötegekkel) az állat a környezeti ingerekre adott adekvát választ kivitelez. Ha az ebben közreműködő struktúrákat morfológiai szempontból, nemcsak a törzs-, hanem az egyedfejlődés szempontjából közelítjük meg, akkor az ideg-izom kapcsolatok, illetve izom elemek finom szerkezeti kialakulásának, fejlődésének a tanulmányozása gerinctelen állatokban lezajló szabályozó és magatartás folyamatokkal kapcsolatos alapvető információkat hordozhat számunkra. Ideg-izom kapcsolatok kialakulásával kapcsolatban számos adat áll a rendelkezésünkre, melyek a legkülönbözőbb kísérleti körülmények között születtek, beleértve az egyedfejlődés alatti tanulmányozásukat is. Ezek a tanulmányok többnyire izeltlábúakra, azon belül rovarokra vonatkoznak.

A neuromuszkuláris kapcsolatok finom szerkezetét gerinctelenekben széles körben tanulmányozták. Puhatestűek között (vagy Gastropodákban) igazolták, hogy ideg-izom kapcsolatok egy része specializációt mutatott, míg más kapcsolatoknál a pre- és posztzinaptikus membránok 16-20 nm közelségben voltak egymástól.

A felnőtt gasztropodákkal foglalkozó tanulmányok viszonylag nagy száma ellenére kevés információval rendelkezünk a perifériás kapcsolatok fejlődésével kapcsolatban. Sorozatban születtek fénymikroszkópos immuncitokémiai jelölésen alapuló tanulmányok *Lymnaea* és rokon fajainak embriogenezisével kapcsolatban, melyek különböző perifériás szövetek (láb, köpeny, bukkális izomzat) aminerg és peptiderg innervációját tárták fel. Marois és Carew (1997c) feltérképezte a lárvális *Aplysia* 5-HT immunreaktív központi neuronjainak célsejtjeit, melyek közt számos izomelem szerepelt. Ugyanakkor nincs konkrét adatunk az izomrostok fejlődésének pontos menetéről, beleértve a neuromuszkuláris kapcsolatok kialakulásának finom szerkezeti vonatkozásait. Ezt a hiányt pótolandó elemeztük az izomrostok és ideg-izom kapcsolatok finom szerkezetét a *Lymnaea* embriogenezisének két, több szempontból alapvető szakaszában (metamorfózis és posztmetamorfózis /felnőttszerű szakasz/), minthogy a metamorfózis az állat végleges testformájának elnyerése, míg a posztmetamorfotikus szakasz az aktív, táplálékszerző étellel összefüggő magatartásformák kialakulásának meghatározó fejlődési szakasza.

A periférián végzett vizsgálatainkkal alapot kívántunk szolgáltatni későbbi kutatásokhoz, amelyek nyomon követnék a különböző cél szervek (szív, bukkális massa, bél, nyálmirigy, testizomzat bizonyos részei) innervációjának kialakulását és fejlődését, valamint meghatároznák az innerváció fiziológiafunkcionális jellemzőit. Ha sikerül centrális efferenciájukat és intrinsic elemeit is azonosítani, és ezeket az eredményeket a megfelelő magatartáselemző vizsgálatokkal kombinálni, akkor közelebb kerülhetünk a különböző viselkedési mintázatok kialakulásának sejt szintű megértéséhez is.

### Célkitűzés

A tézisekben összefoglalt munkámmal a célom a nagy mocsári csiga,

*Lymnaea stagnalis* központi idegrendszere embriogenezisének ultrastrukturális jellemzése, továbbá a periférián megjelenő izom-elemek és ideg-izom kapcsolatok elektronmikroszkópos megismerése volt.

A központi idegrendszer fejlődését az embriogenezis négy meghatározó szakaszában vizsgáltuk:

- i) E21 (35%), veligera stádium, premetamorfotikus szakasz;
- ii) az E24/I-E24/2 (50-55%) stádium, a metamorfózis szakasza;
- iii) és az E26 (75%) stádium, posztmetamorfózis szakasza;
- iv) végül az embriogenezis utolsó, kikelés előtti stádiuma, az E2S/29 (95-100%) szakasza.

A központi idegrendszer embriogenezisét az alábbi szempontok szerint vizsgáltuk:

- a gangliogenezis általános folyamata;
- a ganglion sejtek (fejlődő neuronok) és a neuropil

finomszerkezete;

- iii) az interneuronális kapcsolatok finomszerkezete.

A perifériális területeken kialakuló, illetve fejlődő izomelemeket és

neuromuszkuláris kapcsolatok finom szerkezetét a metamorfózis (50-55%) és a posztmetamorfózis (75%) szakaszaiban vizsgáltuk, amelyek a felnőttkorra is jellemző aktív, csúszó mozgásforma és aktív táplálkozási magatartásforma megjelenésének időpontjai. Az izom elemeket az általános ultrastruktúra mellett, anatómiai lokalizációjuk szempontjából is elemeztük. Az ideg-izom kapcsolatok finomszerkezetének vizsgálatánál a fő szempont a kapcsolatok időbeli megjelenésének és specializált, vagy nem-specializált jellegének elemzése volt, különös tekintettel az axolemma és szarkolemma elektrondenzitására, interszinaptikus részre, membránopozíciók jelenlétére, továbbá a preszinaptikus végződés vezikula/granulum tartalmára).

### Anyag és módszer

A vizsgálatokhoz felhasznált *Lymnaea* embriókat az intézetünk akváriumában létrehozott tenyészetek szolgáltatták. A stádiumok meghatározása Mescheryakov (1990), illetve Marois és Croll (1992) szerint történt. A fejlődési stádiumokat morfológiai ismérvek alapján különböztettük meg egymástól. Az alábbi fejlődési stádiumban levő embriókat vizsgáltuk: E21 metamorfózis előtti (35%), E24/I-2 metamorfózis alatti (50-55%), a metamorfózis utáni E26 (75) és a tojásból kikelő E29 (100%) egyedek. Az E21 (35%) stádium alatt jelenik meg a lebenyezett láb, az E24/I (50%) stádium alatt a pigmentált szem, az E24/2 (55%) alatt a viscerális masszát lefedő ház, az E26 (75%) stádium ismérve a pigmentált fej és láb, valamint a csavarodott csigaház. Az E29 (100%, kikelés) végstádiumú embriók már lényegében elkezdik juvenilis, tojáson kívüli életüket.

Miután az embriókat a tojásukból eltávolítottuk, azokat 1 % paraformaldehidet és 2% glutáraldehidet tartalmazó 0.01 M foszfát pufferben (PB) fixáltuk 40C-on 2 órán át. A mintákat kétszer 5 percig mostuk 0.01 M PB-ben, majd 1% OS04 tartalmú 0.01 M nátrium kagodilát pufferben utófixáltuk. A megfelelően alacsony 10.01MI puffer koncentráció alkalmazása volt az alapfeltétele annak, hogy a finomszerkezetet hűen megőrizzük. Fixálást követően az embriókat növekvő koncentrációjú etilalkohol sorozatban, majd propilénoxidban dehidráltuk. Beágyazáshoz Araldit használtunk IDurcupan ACM, Fluka/, melyet megelőzően a mintákat propilénoxid és Araldit 3:1, 1:1, 1:3 térfogatarányú keverékével infiltráltuk. A 30 perces blokkfestést

70%-os etil-alkohollal készült telített uranilacetát oldattal végeztük el.

A fénymikroszkópos megfigyelésekhez 1  $\mu$ m vastagságú félvékony sorozat metszeteket készítettünk LKB ultramikrotommal, majd azokat 1 %-os toluidinkék oldattal megfestettük. Az ultravékony sorozat metszeteket gyémánt késsel készítettük, ólom-cirát oldattal kontrasztoltuk (Reynolds, 1963), és egy Tesla BS500 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Az egyes embrionális fejlődési stádiumok ultrastrukturális vizsgálata során összesen 8-10 egyed preparátumát dolgoztunk fel.

## **Eredmények**

### *A központi idegrendszer*

#### *E21 (35%-os fejlődési szakasz), veli gera stádium*

A garat körüli gangliongyűrű elsőként megjelenő tagjai az embriogenezis során a cerebrális és pedál is ganglionok (Mescheryakov 1990; Marois és Croll 1992). Ebben a fejlődési stádiumban ugyanakkor fénymikroszkópos szinten a fejlődő idegrendszer egyik ganglionját sem sikerült megfigyelni.

Ultrastrukturális szinten igen kisméretű ganglionok találhatók az embrió anterior (száj felőli) elülső részében pluripotens, még nem azonosítható sejtek és neuroblaszt elemek közé ágyazva. A ganglionok mindössze két-három ganglion sejtet tartalmaznak, melyek átmérője kb. 5  $\mu$ m. A kis méretű, átlagosan 9  $\mu$ m átmérőjű neuropilben, az axon profilok szoros elrendezésben helyezkednek el egymás mellett, köztük sem megnövekedett intracelluláris tér, sem filopódiumok nem voltak megfigyelhetők. A ganglionsejtek környezetében, illetve a ganglionsejtek és a neuropil között glia elemeket nem észleltünk. A legtöbb axon profil csak neurotubulusokat és mitokondriumokat tartalmazott. Néhány profilban agranuláris vezikulák és granulumok (átlagos átmérőjük 55-110 nm) egyaránt előfordultak. A granulumok között tipikus granuláris (dense-core) vezikula is előfordult. Az axonok és varikozitások egymással, illetve a ganglionsejtek perikarionjával döntő részben specializációmentes kapcsolatot alakítottak ki. Az axo-axonikus és axo-szomatikus kapcsolatokban csak elvétve találtunk preszinaptikusan elhelyezkedő vezikula felhalmozódást. Szinaptikus specializációra utaló ultrastukturális jegyek, membrán megvastagodás, membrándenitáz növekedés, interszinaptikus rés anyag jelenléte nem volt megfigyelhető.

#### *E24/1-2 (50-55%-osfejlődési szakasz), metamorfózis*

Fénymikroszkópos szinten 1  $\mu$ m-es félvékony metszetekben a metamorfózis stádiumában levő embrió képe lényegesen eltér a 35%-os embrionális fejlettségű (veligera stádium) állattól. A szikanyag mennyisége jelentősen lecsökken, főleg a test hátulsó részében található. A test elülső része további differenciálódáson megy keresztül. A talpi régió területe jelentősen megnövekedett. A test elülső részének fő jellemzője továbbra is a differenciálatlan sejtpopulációjelenléte volt, ennek ellenére félvékony metszetekben a cerebrális és pedális ganglionok már egyértelműen azonosíthatók voltak.

Ultrastrukturálisan a neuropil szintjén két ganglion típust tudtunk megkülönböztetni. Ezek egymástól a neuropil- és axonprofilok átmérőiben, továbbá a neuropil finom szerkezeti szerveződésében és az egyes axonprofilok morfológiájában is különböztek. A két ganglion típus egyidőben, egymás mellett volt megfigyelhető egy adott embrióban. A ganglionok körüli kötőszövetes burok nem voltak jelen, és jellemző volt továbbá a glia-elemek hiánya is.

Az egyik ganglion típus rendezett finom szerkezetű neuropillel rendelkezett, mely szabályos elrendezésben tartalmazta az axon profilokat. Az ilyen típusú neuropilek átlagos átmérője 15  $\mu$ m, míg az axon profiloké 2.5  $\mu$ m volt, azaz viszonylag kisméretű neuropil viszonylag nagy átmérőjű axon profilokat tartalmazott. Az axonok többségében csak neurotubulusokat találtunk, némelyikükben mitokondrium volt fellelhető, és kis hányadukra a vezikula/granulum tartalom is jellemző volt. Az agranuláris vezikulák átlagos átmérője 50, míg a granulumoké 60-100 nm-nek bizonyult. Ezt a ganglion típust elneveztük rendezett vagy "reguláris" ganglionnak.

A metamorfózis során az 50-55%-os fejlettségű embriókban talált másik ganglion típus neuropilje teljesen eltérő finom szerkezetet mutatott. Ez a neuropil (átlagos átmérő: 33  $\mu$ m) tulajdonképpen nem más, mint igen kis (átlagosan 0.5  $\mu$ m) átmérőjű axonprofilokból álló tömör massa. Az axonprofilok elrendeződése szabálytalan volt, egymással hosszú szakaszokon szoros, nem specializált kapcsolatot létesítettek mély membrán befűződés ekkor. Az axonprofilok egy részében számos 60-80 nm-es granuláris (dense-core) vezikula volt fellelhető, az axonprofilokban gyakran találtunk exocitózisra utaló membrán konfigurációt (coated pit, omega-formájú membrán profil), de specializált szinapszisok, illetve szinapszis-szerű struktúrák egyáltalán nem fordultak elő.

#### *E26, (75%-os embrionális fejlődési szakasz) posztmetamorfózis*

Félvékony sorozatmetszetek alapján megállapítható volt, hogy ebben a fejlődési szakaszban már egy magasfokú differenciált testszerkezet jellemezte az embriót. A garat körüli gangliongyűrű jól felismerhető volt, és a ganglionokban jól elkülöníthető volt egy fejlett perikarionális külső réteg és a neuropil megnövekedett állománya. Ultrastrukturális szinten különböző neuron típusokat lehetett megkülönböztetni. A neuronok finomszerkezete között különbség vezikula, illetve granulum tartalmuk alapján volt megállapítható. Többségük elektrodenz granulumokat vagy granuláris vezikulákat tartalmazott. Az idegsejtek közül néhány egyáltalán nem tartalmazott granulumot, de a citoplazmájukban jelen levő nagy számú sejtorganellum következtében ezek is viszonylag elektrodenz megjelenésűnek bizonyultak. A ganglion körüli kötőszöveti burok, vagy teljesen hiányzott, vagy kezdetleges formában voltak jelen. A ganglionok felszínének egyes szakaszainál a neuropil közvetlenül érintkezett a testüreggel.

A neuropil felszíne általában közvetlenül kapcsolódott perikarionális rétegéhez, néhány esetben a perikarion beágyazódott a neuropil állományába. Az idegsejteket körülvevő glia-rendszer hiánya, illetve fejletlen volta miatt a perikarionok felületén axo-szomatikus kapcsolatok gyakran előfordultak. Ezek minden esetben szoros, nem specializált membránkapcsolatok voltak. Néhányszor a varikozitás mélyen behatolt az idegsejt testbe. Érett, specializált, axo-axonikus szinaptikus kapcsolatoknak a jelenléte, melyeket korábban már leírtak felnőtt gasztropódák központi idegrendszerében (Bailey és mtsai., 1979; Roubos és Moorer-van Delft 1979; Elekes és Ude 1993) nem volt jellemző ebben a fejlődési stádiumban sem. Ugyanakkor fejlődő szinapszisok, illetve szinapszis-szerű kapcsolatok gyakrabban fordultak elő a posztmetamorfózisban, különösen a fiatalabb embrionális stádiumokhoz képest. Ezeknek a szinapszis-szerű struktúráknak a közös jellemzői voltak az elektronrendez, rövid, párhuzamosan illeszkedő (pre- és posztzinaptikus) membrán szakaszok és az asszimmetrikusan elhelyezkedő granulás/agranulás szinaptikus vezikula felhalmozódás.

#### E29 (J 00%-os fejlettségi szakasz), a kifejlett embrió stádiuma

A tojását elhagyó (100%-os embrionális fejlettségű) *Lymnaea* központi idegrendszerét alkotó ganglionok jelentős (50-100%-os) méretbeli növekedésen mentek keresztül, melyekben már széles, többsejtes perikarionális réteg volt található. A neuropil mérete és a benne levő, különböző méretű axonprofilok (0.251.5  $\mu$ m) száma jelentősen megnőtt, ha összehasonlítjuk az előző három, általunk vizsgált embrionális stádiumban megfigyelttel. A ganglionsejtek átmérője viszont változatlan maradt (5-12  $\mu$ m). A ganglionsejtek között megjelentek az első egyértelműen azonosítható gliasejtek. A többretegű, ganglion körüli kötőszövetes burok és az azt alkotó glia nyúlványok is egyértelműen felismerhetőek voltak. A neuropil állományában az axonprofilok jelentős hányada tartalmazott különböző denzitású és méretű granulumokat és granulás vezikulákat, de agranulás vezikulákat tartalmazó axonprofilok is előfordultak. Az első tipikus, valódi érett szinapszisa utaló membrán kapcsolatok ennél a stádiumnál jelentek meg először, melynek jellemzői voltak az elektronrendez, parallel pre- és posztzinaptikus membrán szakaszok, az elektronrendez anyaggal töltött szinaptikus rés és a preszinaptikusan elhelyezkedő szinaptikus vezikula felhalmozódás.

#### A perifériás idegrendszer, ideg-izom kapcsolatok

##### A metamorfózis stádiuma (50-55%)

Az első éretlen, innerváció nélküli izomrostok a metamorfózis stádiumában jelennek meg. Előfordulásuk igen ritka. A magányos izomrostok az embrió testének elülső, ventrális régiójában helyezkedtek el szabálytalan eloszlásban, a csillós hámsejt réteg közelében, pluripotens sejtek és hámsejtek között. Az izomrostok finomszerkezetére jellemző a kezdetleges felépítés, és többnyire eltérő érettségre utaló struktúrákkal találkoztunk. Az izomrostok egy jelentős hányada viszonylag nagy számú, párhuzamosan futó miofibrillumot tartalmazott, míg néhány esetben mindössze egy-két kontraktilis elem alkotta az izomrostot, többnyire rendezetlen eloszlásban. Az izom sejtek citoplazmájában igen nagy számban voltak találhatóak mitokondriumok és a Golgi-apparátus elemei, valamint kiterjedt szarkoplazmatikus retikuláris rendszer. Legfeltűnőbb volt az igen nagyszámú szabad riboszóma jelenléte a szarkoplazmában. Időnként a sejtmaghártya külső felszínén is megfigyelhetők riboszómák, gyöngysorszerűen összefűződve hoztak létre riboszóma telepeket.

##### A posztmetamorfózis stádiuma (75%)

Ebben a fejlődési stádiumban a még fejlődő izomsejtek szétszórtan helyezkedtek el az osztódó hámsejtek, illetve a még be nem azonosítható pluripotens állapotban levő sejtek között és elsősorban a pofa és a talp régióban voltak megfigyelhetők. Egyes esetekben kisebb kötegek be való rendeződésük is megfigyelhető volt. A kontraktilis elemek ugyanakkor már fejlett miofibrilláris szerkezetet mutattak: az izomrostokat nagyszámú tömött, párhuzamos lefutású miofibrillum töltötte ki. A szarkoplazma gazdagon tartalmaz szabad riboszómákat, mitokondriumokat és szemcsés endoplazmás retikulum elemeket.

A 75 %-os fejlettségű *Lymnaea* embriók perifériás területein jelentek meg először axonkötegek, melyeket minden esetben gliasejtek és nyúlványok kísérték és hosszan burkoltak. Többnyire izomrostok közelében voltak észlelhetők. Szorosan elhelyezkedő, főleg neurotubulusokat tartalmazó különböző méretű axonprofilokból álltak, vezikuláris elemek ritkán voltak bennük megfigyelhetők.

A posztmetamorfotikus *Lymnaea* embriókban találtunk először ideg-izom kapcsolatot, de a kifejlett specializált neuromuszkuláris kapcsolatok hiányoztak. Az axon profilok és varikozítások vagy magányos izomrostok mentén, vagy izomrostok között voltak fellelhetők. Ezek a profilok szoros (16-20 nm távolságú) membrán kapcsolatokat alakítottak ki az izomsejtekkel, azonban membránspecializációra utaló ultrastrukturális jelek nélkül. Asszimmetrikus elhelyezkedésű vezikula felhalmozódások a "preszinaptikus" membrán mentén előfordultak, továbbá elektronrendez interszinaptikus anyag jelenlétét, és szubszinaptikus ciszternákat időnként megfigyeltünk a posztzinaptikus membrán mentén. Az izom sejtekkel kapcsolatot létesítő axon nyúlványok 50-60 nm-es agranulás vezikulákat és 80-120 nm-es granulás vezikulákat tartalmaztak.

## Diszkusszió

Ultravékony sorozatmetszeteken alapuló hagyományos transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokkal tártuk fel a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* L., embriogenezise során a fejlődő központi idegrendszer és az ideg-izom kapcsolatok ultrastruktúráját, három kitüntetett embrionális fejlődési stádium vizsgálata alapján. A *Lymnaea* központi idegrendszer érése és a periféria izom elemeinek mind szám és méretbeli növekedése, valamint fokozatos innerválódása mind az állat embrionális fejlődésének szerves része, összhangban áll azoknak a viselkedési mintázatoknak a megjelenésével, melyek az állat tojáson kívüli ún. szabadon mozgó, táplálékszerző juvenilis életének megkezdéséhez szükségesek. A ganglionok embriogenezise a típusos idegsejt testek megjelenésével, majd fokozatos rétegbe szerveződésükkel, méretük növekedésével, valamint a központi neuropil állományának a differenciálódásával, az axon profilok számának a növekedésével jellemezhető. Az embriogenezis végső szakaszában szinapszis-szerű kapcsolatok megjelenése is jellemzi a neuropil finomszerkezetét, azt megelőzően kizárólag szoros, de specializációmentes axo-axonikus és axo-szomatikus kapcsolatok figyelhetők meg. A tojását elhagyó, 100 %-os fejlettségű embrióban a központi idegrendszert a már multiperikarionális réteggel rendelkező jelentősen megnövekedett méretű ganglionok jellemzik, míg a neuropilben számos vezikula és/vagy granulum tartalmú varikozitás/axonprofil és specializált axo-axonikus szinapszisok figyelhetők meg. Ezek az ultrastruktúrális jegyek egyértelműen arra utalnak, hogy a központi idegrendszer mind morfológiai, mind funkcionális értelemben érett állapotba került és alkalmas az állat juvenilis, tojáson kívüli életéhez kapcsolódó különböző magatartásformák irányítására.

A ganglionok metamorfózisa - a neuropil ultrastruktúrális újjá szerveződése

A metamorfózis stádiuma alatt a *Lymnaea* központi idegrendszer ultrastruktúrájában jellegzetes változások zajlanak le. 24 órán belül a metamorfózis stádiumának legelején megkezdődik a ganglionok neuropiljeinek alapvető finomszerkezeti újrászerveződése, amely feltehetően jelentős részben meghatározza a későbbi neuroanatómiai és viselkedési mintázatbeli változásokat. Puhatestűek központi ganglionjaiban eddig még nem írtak le a metamorfózisra jellemző ultrastruktúrális változásokat. A változások legfőbb jele a nagy számú, kisméretű, rendezetlenül elhelyezkedő axon profilok jelenléte. Azonban megfigyeléseink egyértelműen arra mutatnak, hogy a neuropil metamorfózisa nem egy időben zajlik az egyes ganglionokban. Rendezett és metamorfotikus neuropillel rendelkező ganglionok egymással párhuzamosan, egy időben vannak jelen a központi idegrendszerben. A metamorfózis stádiumában levő *Lymnaea* esetében a kétféle finom szerkezettel bíró neuropil típusok együttes jelenléte a ganglionokban, folyamatos, de nem egy időben lezajló átalakulásra utal, melynek alapján úgy tűnik, hogy a metamorfózis az embriogenezis azon szakasza, melynek ideje alatt az axonarborizációk és interneuronális kapcsolatok átrendeződnek, átalakítva a neuropilek finom szerkezetét, létrehozva az információátadás ultrastruktúrális alapjainak végleges alapjait a központi idegrendszerben. A metamorfotikus ganglionok neuropil állománya a regulárisokéhoz képest jelentősen megnövekszik, és ez az axonnyúlványok intenzív migrációjára, illetve lényeges gazdagodására utal. A központi idegrendszer metamorfotikus átalakulásának eltérő szerepe lehet az intrakapszulárisan fejlődő Lymnaeidaeák (tűdős csigák) esetében, mint a más filogenetikai szinten levő egyéb Gastropodákban (Opisthobranchia, Anasphadia, Nudibranchia), melyek embriogenezise illetve metamorfózisa szabadon (a tojáson kívül) zajlik és lárvális fejlődésük hosszabb. A metamorfózison átesett *Lymnaea* embriók a rotál ó mozgás mellett, de azt lassan kiszorítva, a tojás belső falához tapadva kezdik el a csúszó mozgás kezdetleges gyakorlását. A metamorfózist követően megfigyelték a légzőfunkciók (pneumosztóma) és a táplálkozási magatartás aktiválódását is (Voronezhskaya és mtsai, 1999). Ezek a progresszív viselkedési mintázatbeli változások összefüggésben lehetnek a neuropilek fentebb leírt specifikus átalakulásával, a plasztikus folyamatok feltételeként kialakuló szinaptikus elrendeződésekkel.

### Az interneuronális kapcsolatok ultrastruktúrája és fejlődése

A 35, 50-55 és 75%-os fejlettségű embriók ganglionjaiban kétféle interneuronális kapcsolat típust különböztethetünk meg: az axo-szomatikus és az axo-axonikus kapcsolatokat. Különösen figyelemreméltó az axo-szomatikus kapcsolatok sűrű előfordulása. *Lymnaea* esetében a nem specializált axo-szomatikus kapcsolatok gyakori előfordulása a neuro- és gangliogenezis folyamán arra utal, hogy azok különösen a késői posztmetamorfotikus (75%) embrionális stádiumban a központi idegsejtek fokozatos fejlődésére és funkcionális éérésére lehetnek hatással. Feltételezésünkkel összhangban áll, hogy aposztmetamorfózist (75%) megelőző stádiumokban az idegsejtek mérete nem növekedett, átmérőjük 5 és 10-11 µm közötti volt.

A specializált szinapszisok hiánya, illetve a szinapszis-szerű kapcsolatok ritka előfordulása a fiatal *Lymnaea* embriókban egészen a 75%-os fejlettség eléréséig gyors szinaptikus transzmisszió teljes hiányára utal. Szinapszis-szerű kapcsolatok csak korlátozott számban a posztmetamorfotikus embriók központi idegrendszerében voltak megfigyelhetők. Ezeket a kapcsolatokat a rövid szakaszú párhuzamos, fokozott elektronrendezésű pre- és posztzinaptikus membránok és az aszimmetrikusan elhelyezkedő vezikula/granulum aggregátumok jellemzik. Hasonló finomszerkezetű axo-szomatikus szinapszisok voltak megfigyelhetők az *Aplysia* lárvák 5-HT immunreaktív axon profiljaiban (Marois és Carew 1997).

*Lymnaeaban* kapott eredményeink összhangban állnak a különböző viselkedési mintázatok (csúszó mozgás, táplálkozás, légzés) alacsony fejlettségével az embrionális fejlődés jelentős részében. Az első valódi axo-axonikus szinapszisok a juvenilis élete előtt álló 100%-os fejlettségű embriókban jelentek meg. Ekkorra az egész központi idegrendszer finom szerkezeti megjelenése, mérete, az axon profilok elrendeződése már emlékeztet a felnőtt puhatestű CNS-nél

leírtakéhoz. Úgy tűnik, hogy a moduláció, mint a legfőbb intercelluláris szabályozó mechanizmus, a dominánsan jelenlevő nem specializált idegi kapcsolatok révén valósul meg a *Lymnaea* eNS-ben az embriogenezis folyamán. Az excitózisra utaló membrán konfigurációk jelenléte a nem szinaptikus úton megvalósuló neurotranszmisszióra utalnak. Az excitózist mint a megvalósuló transzmitter felszabadulás folyamatának általános formáját a felnőtt *Lymnaea* központi idegrendszerében már korábban bizonyították (Roubos és van der Wal-Divendal, 1980).

Mivel a juvenilis kort megelőzően a nem szinaptikus kapcsolatok a jellemzők, ezért feltételezhetjük, hogy a sejtek differenciálódása során a felszabadított neuroaktívanyagok hatásai trófikusak, melyek valószínűleg nem egyszerre, hanem adott időrendben történnek. Így az időben egymásután felszabadulható anyagok (kémiai hírvivők) meghatározhatják differenciálódását, illetve megjelenéslik időbeli sorrendjét

#### A glia rendszer késői fejlődése -lehetséges trófikus hatások

A gangliogenezis egyik jellemző sajátossága a glia rendszer, illetve a kötőszöveti burok hiánya a fejlődő ganglionokon belül, illetve kívül. Kialakulásukat csak az embriogenezis végső (100%) szakaszában figyelhetjük meg. A kötőszöveti burok késői megjelenésének (100%) funkcionális jelentőségét az adja, hogy gyakorlatilag az egész embriogenezis alatt a fejlődő ganglionok felszíne, a fejlődő idegsejtek perikarionális rétege közvetlenül érintkezik a környezettel. Így a neuronok az extraganglionáris tér felől érkező trófikus hatásoknak szabadon vannak kitéve. A *Lymnaea* és az *Aplysia* glia-rendszerének eltérő fejlődése magyarázható eltérő embriogenezissel. Az *Aplysia* embrió tojásán kívüli (extrakapszuláris) élete igen hosszú (34 nap veligera és 3 nap metamorfózis), míg eléri a juvenilis életszakaszt. A *Lymnaea* viszont mindössze 8 napos, tojásán belüli (intrakapszuláris) embrionális életet követően megkezdí extrakapszuláris, juvenilis életét. Valószínű, hogy a glia/tápláló sejtek nyújtotta metabolikus, nutritív háttér szükséges a szabadon fejlődő *Aplysia* esetében, míg a *Lymnaea* intrakapszuláris élete során kisebbek a metabolikus követelmények. Figyelembe kell venni, hogy a szabadon fejlődő *Aplysia* embrióban valószínűleg már működik a keringési rendszer is. A központi idegrendszer vaszkuláris elemei csigákban ganglion körüli burokban vannak, ezért a buroknak sokkal hamarabb kell kifejlődni az extrakapszulárisan fejlődő állatokban.

A tojását elhagyó *Lymnaea* (100%) ganglionjai jelentős méretbeli növekedésen mennek keresztül, melynek oka részben ugyancsak a gliasejtek megjelenése lehet. Megfigyeléseink szerint csak kisszámú idegsejt (ganglionsejt) volt jelen a *Lymnaea* ganglionokban a metamorfózist megelőzően. Ez az oka annak, hogy a ganglion sejteket és a gliasejteket nem lehetett egymástól megkülönböztetni. A posztmetamorfotikus (75 %) stádiumban sem a perikarionokban, sem a neuropil egyes axon profiljaiban glia granulumok nem voltak észlelhetők. Az idegsejt testek illetve az axonprofilok nem voltak glia nyúlványokkal elválasztva. Ezek a megfigyelések a glia rendszer hiányára illetve fejletlenségére utalnak. Az első egyértelmű glia elemre a többrétegű kötőszöveti tok (burok) megjelenésére utalt közvetlenül a tojásból való kiszabadulás előtt (100% fejlettségi stádium). A glia rendszer fejlődésének a tisztázásához, amely a *Lymnaea stagnalis* gangliogenezisének egy nagyon fontos aspektusának tűnik, további immunokémiai vizsgálatok szükségesek. A gliaelemek meghatározó szerepét a gangliogenezis és szinaptogenezis folyamatában más gerinctelenekben, például a rovarokban igazolták (Rössler és mtsai, 1999).

#### Az izomelemek és neuromuszkuláris kapcsolatok fejlődése

Az izomelemek és az ideg-izom kapcsolatok fejlődésére vonatkozó eredményeink szoros összhangban állnak a *Lymnaea* embriók testfelépítésének és viselkedésének fejlődésével. Korábbi megfigyelések szerint (Voronezhskaya és mtsai, 1999) az embriók felnőtt-szerű helyváltoztató mozgásának repertoárjához tartozó csúszás (gliding), illetve a már szintén felnőtt-szerű táplálkozási viselkedésre utaló ritmikus radula mozgatás a metamorfózis (55%) végén jelenik meg. Metamorfotikus *Lymnaea* embriókban izomrostokat csak elvétve lehetett találni, melyek kontraktilis filamentumokat csak igen kis mennyiségben, "nyomokban" tartalmaztak. Szembetűnő volt viszont az izomsejtek szarkoplazmájában a szabad riboszómák kifejezetten nagy mennyisége, valamint a fehérje szintetizáló apparátus egyéb organellumainak (rER, Golgi-készülék) a jelenléte. Ez utóbbi két alkotó elem egyébként nem jellemzi a felnőtt egyedek izomsejtjeinek ultrastruktúráját. A posztmetamorfózis stádiumában fejlett kontraktilis apparátussal rendelkező izomrostok, valamint nem specializált neuromuszkuláris kapcsolatok jelenléte megfigyelhető volt, melynek alapján már különböző izomcsoportok működését feltételezhetjük. Ezek az izomcsoportok a kialakulóban levő szomatikus (testtartás) és vegetatív (táplálkozás) funkciók betöltésében egyaránt részt vehetnek.

A posztmetamorfotikus *Lymnaea* embriókban megfigyelt neuromuszkuláris kapcsolatok finomszerkezete az esetek többségében emlékeztet a felnőtt csigákban (*Lymnaea*, *Helix*) leírt szoros, de specializációmentes membrán kapcsolatokhoz, melyek feltehetőleg modulációs folyamatokban vesznek részt. A *Lymnaea* posztmetamorfózisa során neuromuszkuláris kapcsolatok csak egy kisebb része volt jellemezhető különböző membránspecializációkkal; ezeknél megnövekedett pre- és poszt-szinaptikus elektronorganizás az aktív membrán szegumentumok mentén, interszinaptikus elektronorganizás anyag jelenléte, valamint preszinaptikus lokalizációjú vezikula/granulum felhalmozódás volt megfigyelhető. A kapcsolatok többségére azonban nem ezek a finomszerkezeti ismérvek voltak a jellemzők, hanem mindössze az egymással szemben elhelyezkedő "szinaptikus" membránok szoros 16-20 nm-es "szinaptikus" rés mentén való illeszkedése. Az utóbbi kapcsolatforma dominanciája azt sugallja, hogy a felnőtt-szerű mozgások és izom aktivitások megjelenésekor, amely a juvenilis, tojásán kívüli életre való felkészülésnek is tekinthető, még kevésbé van szükség ultrastruktúrálisan specializálódott, tehát funkcionálisan érett ideg-izom kapcsolatok jelenlétére.

A központi idegrendszer ganglionjainak neuropiljében a *Lymnaea* embriogenezise során az első szinapszis-szerű kapcsolatok a 75%-os (felnőtt-szerű) fejlettségi állapotban jelentek meg, miközben valódi specializált axo-axonikus

szinapszisok 100%-os fejlettségénél (kikelés) jelentek meg. A teljes embriogenezis folyamata alatt a nem specializált axo-axonikus és axo-szomatikus kapcsolatok domináltak. A szinaptogenezis folyamatának lassú menete összhangban van a neuromuszkuláris kapcsolatok periférián megfigyelhető késői megjelenésével. Bár a 100%-os (kikelés) embrionális fejlettségénél a neuromuszkuláris kapcsolatok finom szerkezetének teljesebb tisztázása még további kutatásokat kíván, ne zárhatjuk ki egy közös "rajt-jelnek" a jelenlétét, amely mind a központi idegrendszerben, mind a periférián összehangolja az intercelluláris kapcsolatok fejlődését illetve szerveződését a *Lymnaea stagnalis* embriogenezise során.

Ellentétben a központi idegrendszer embriogenezisével a periférián posztmetamorfotikus embriókban fellelhetőek voltak feltételezhetően glia nyúlvánnyal körülhatárolt axonkötegek. Glia elemek ugyancsak előfordultak a neuromuszkuláris kapcsolatok közvetlen közelében is, mindazonáltal jelenlétük még egyáltalán nem mondható általánosnak a periférián. Megállapítható ugyanakkor, hogy *Lymnaea stagnalis*-ban a glia elemek első megjelenése, illetve a glia rendszer fejlődése hamarabb bekövetkezik a periférián, mint a központi idegrendszerben. Ez a jelenség a neuromuszkuláris kapcsolatok érésévei, és a hozzájuk kapcsolódó, a felnőtt egyedekre jellemző viselkedési mintázatok megjelenésével hozható összefüggésbe. Az embriogenezis során először a periférián megjelenő glia elemek felvetik a glia rendszer - gerinctelenekben eddig nem ismert - "centripetális" fejlődését, azaz a glia elemek perifériáról a központba történő migrációjának lehetőségét. Nem zárhatjuk ki annak lehetőségét sem, hogy a gliasejtek különböznek a periférián és a központi idegrendszerben, ami eltérő típusú gliasejtek előfordulását feltételezi.

A kérdés részletes tisztázása további kutatásokat igényel.

## Összefoglalás

1/ A fejlődő központi idegrendszer, valamint az izomrostok és neuromuszkuláris kapcsolatok ultrastruktúráját vizsgáltuk a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* L. embriogenezise során. A vizsgálatok tárgyát az embriogenezis három kitüntetett stádiuma képezte: veligera (35%-os embrionális fejlettség), metamorfotikus (50-55%), posztmetamorfotikus (75%). Rövid összehasonlítás erejéig a 100%-os embrionális fejlettségű stádium szintén a vizsgálatok tárgyát képezte. Vizsgálataink a puhatestűek/csigák vonatkozásában kiterjedtségüket és részletességüket illetően elsődlegesnek tekinthetők az irodalomban.

2/ A központi idegrendszer embriogenezise során specializált axo-axonikus kapcsolatok, valamint a glia rendszer elemei (beleértve a ganglionok körüli kötőszöveti burkot) csak ritkán voltak megfigyelhetőek. Ugyanakkor a nem specializált axo-szomatikus kapcsolatok jelenléte számos esetben fordult elő.

3/ Szinapszis-szerű axo-axonikus kapcsolatok először a 75%-os fejlettségénél jelennek meg, jellemzőjük volt az aszimmetrikus vezikula felhalmozódás a preszinaptikus membrán mentén, valamint a szinaptikus membránok megnövekedett elektronenzitása. Fentiek alapján a modulációs folyamatok dominanciája feltételezhető a központi idegrendszerben az embriogenezis során.

4/ A kötőszöveti burkok és a glia rendszer egyéb elemeinek a hiánya alapján az embriogenezis teljes időszakában feltételezhető a fejlődő ganglionok trofikus és hormonális befolyásolásának a lehetősége.

5/ A neuropil ultrastruktúrája és feltételezhetően az egész központi idegrendszer fejlődése szempontjából a legmeghatározóbb fejlődési stádium a metamorfózis (50-55%). Két neuropil típust lehetett megkülönböztetni: i) metamorfotikus neuropil, mely rendezetlen formában tartalmaz nagyszámú, kisméretű hullámos lefutású axolemmával határolt axonprofilt, illetve ii) a "szabályos" felépítésű neuropil, mely rendezetten tartalmaz kisszámú, szabályos ultrastruktúrájú axonprofilokat. Ganglionok szabályos és szabálytalan feleépítésű neuropillel egyidejűleg megtalálhatóak voltak a fejlődő központi idegrendszerben. Ez a ganglionok irányító (funkcionális) és átalakuló (érési) jellegének a megosztottságára utal az embriogenezis során.

6/ Az első izomsejtek a metamorfózis (50-55%) során voltak észlelhetőek. A megelőző stádiumokban (trochofora, veligera; 25%, 35%) izom elemek nem voltak megfigyelhetőek. Az első izomrostokat az intenzív fehérjeszintézisre utaló nagyszámú szabad riboszóma és durva felszínű endoplazmás retikulum mellett, csak kisszámú, szabálytalan elrendezésű kontraktilis elemek jelenléte jellemezte.

7/ A posztmetamorfotikus (75%) stádiumtól jelennek meg a fejlett ultrastruktúrájú izomelemek és hozzájuk kapcsolódó, innervációban részt vevő idegelemek. A megvalósuló ideg-izom kapcsolatok döntő része membrán specializációval nem rendelkezett. Az izomzat és a neuromuszkuláris kapcsolatok késői fejlődése a *Lymnaea* embriogenezise során egyrészt jól korrelál a szabad, tojásán kívüli életmóddal szükséges viselkedési mintázatok érésévei, valamint a neurokémiai azonosítható, a korábban leírt centrális eredetű embrionális idegi struktúrák periférián való megjelenésével, másrészt ugyancsak jó korrelációt mutat a központi idegrendszerben megfigyelt szinaptogenetikus események időrendjével.

8/ A gliarendszer megjelenése perifériás idegek mentén a posztmetamorfózisban (75%) egybeesik az első neuromuszkuláris kapcsolatok megjelenésével, amely jól korrelál az embrió szabad élethez szükséges mozgásformáinak tojásán belüli megjelenésével. A központi idegrendszerben a gliarendszer csak a 100%-os fejlettségénél jelenik meg. Ez a tény felveti egyrészt a gliaelemek a perifériáról a központba való migrációjának lehetőségét, másrészt nem zárhatjuk ki, hogy különböző típusú "helyhez kötött" gliaelemek léteznek, melyek az egyedfejlődés során nem egyidőben jelennek meg.



A disszertáció alapjául szolgáló közlemények, előadás kivonatok jegyzéke  
A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

- Nagy T., K. Elekes (2000) Embryogenesis of the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* L. An ultrastructural study *J. Neurocytol.* 29(1):43-60  
Nagy T., K. Elekes (2002) Ultrastructure of neuromuscular contacts in the embryonic pond snail *Lymnaea stagnalis* L. *Acta Biol. Hung.* 53(1-2): 125-139

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások:

- Nagy T., Elekes K. (1997) *Lymnaea stagnalis* idegrendszerének embriogenezise - kvalitatív ultrastrukturális vizsgálatok. MITT IV. Konferencia, Gödöllő (*Neurobiology* 5: 187-188)  
Nagy T., Elekes K. (1997) Embryonic development of the nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* L.: qualitative ultrastructural investigations. 25th Göttingen Neurobiology Conference (*Göttingen Neurobiology Report. Proceedings of the 25th Göttingen Neurobiology Conference. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, p. 918.*)  
Nagy T., Elekes K. (1997) Embryonic development of the nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* L.: qualitative ultrastructural investigations. Simplier Nervous Systems. 5th East European Conference of the ISIN, Moscow  
Nagy T., J. Ude, E. E. Voronezhskaya, K. Elekes (1998) Ultrastructural and immunogold (FMRFamide) characterization of *Lymnaea* CNS in two specific developmental stages. MITT V. Konferencia, Debrecen (*Neurobiology* 6: 232-233)  
Nagy T and K. Elekes (1998) Ultrastructure of *Lymnaea* CNS during embryonic metamorphosis. ENA/FENS Forum 1998, Berlin (*Eur. J. Neurosci.* Vol. 10, Suppl. 10, 202.45)  
Nagy T., K. Elekes (1999) Ultrastructure of neuromuscular contacts during the embryogenesis of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. 9th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), Tihany, Hungary  
Nagy T., Elekes K. (1999) Ideg-izom kapcsolatok a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* L. embriogenezise során. MITT VI. Konferencia, Harkány (*Neurobiology* 7:359-360)  
Nagy T., K. Elekes (2000) Synaptogenesis in the central and peripheral nervous system of the snail, *Lymnaea stagnalis*, embryo. 30th Ann. Meeting SiN, New Orleans, USA, #5 J O, J 3

Egyéb publikációk:

- Elekes K., Nagy T., Fekete N. Zs. (1999) MIP-immunoreactive innervation of the snail, *Helix pomatia*, heart. An ultrastructural study. *Act. Biol. Hung.* 50: 55-64

"