

A házi nyúl plexus myentericusának neuroanatómiája:
Egyes neuronpopulációk neurokémiai kódrendszerének azonosítása és a
szerotoninerg rendszer farmakológiája

PhD értekezés tézisei

Dénes Viktória

Pécs, 2004

1. Bevezetés

A szervezet fenntartásához nélkülözhetetlen táplálék felvétele, megemésztése és felszívása az emésztőrendszer feladata. Az emlősök csösalakú emésztőkészüléke elő-, közép- és utóbéli szakaszra tagolható, amelyek közül a középbéli szakaszra hárul az előbél által megőrlt és előemésztett táplálék végleges feldolgozása és alkotóelemeinek felszívása. Az emlősök középbéle három további szakaszra osztható: duodenum (patkóbél), jejunum (éhbé!), ileum (csípöbél).

A vegetatív működések szabályozását a szomatikus idegrendszerrel független autonóm idegrendszer végzi, amely hatása és felépítése alapján három alrendszerre osztható: szimpatikus-, paraszimpatikus- és enterális idegrendszerre (ENS). Az ENS elkülönítését az enterális neuronok száma, morfológiája és az önálló, teljes reflexpályák tesZÍk indokoltá.

A nyelöcsötöl az anális záróizomig végigvonuló ENS szervezi az emésztőkészülék működését, amely feladat magába foglalja a motilitás, a víz- és elektrolit transzport, az emésztőnedv szekréció és vérkeringés irányítását. A bélidegrendszer ezen feladatok ellátására differenciálódott plexusok összefoglaló elnevezése. A bélcső legkülső rétegében írták le a *plexus subserosus* vékony rostkötegeit, amelyek a külső Ízomréteg és a mesenterium között futnak, megteremtve a kapcsolatot az extrinsic idegek és a bélful belső rétegei között. A nagy ganglionáris plexusok egyike a hosszanti és körkörös izomzat között elhelyezkedő *plexus myentericus*, amelyet leírójáról Auerhach-féle plexusnak is neveznek. A bélful teljes szélességében és hosszában folyamatos lefutású, de ganglionjainak mérete, száma, elhelyezkedése fajnként, sőt bélszakaszonként váltoZÍk. A plexus myentericus morfológiájának korai leírói három komponenset külölÚtettek el: a primer, szekunder és terciar komponens. Az elsődleges komponensek közé tartoznak a ganglionok és az őket összekötő interkonnectívumok. A ganglionokból és interkonnectívumokból kilépő vékonyabb kötegek alkotják a plexus myentericus másodlagos, végül a hosszanti izomrétegen futó egészen finom rosthálózat a harmadlagos komponens. Mind a szekunder, mind a terciar plexus részben innerválja az izomrétegeket, részben megteremti a kapcsolatot a bélful belső rétegeivel.

A körkörös izomzat *plexusát* az izomréteg teljes vastagságában futó rostkötegek alkotják. Ennél az izomrétegnél elkülölÚthető még egy *mély izom plexus (plexus muscularis profundus)*, amely körkörös izomzat belső felszínén fut. Mindkét plexus esetében a rostok a vékonybél területén bizonyítottan a plexus myentericusból származnak. A tunica submucosa rétegében találjuk az ENS második ganglionáris idegfonatát a *plexus submucosust*. A bélful nyálkahártyájában már csak finom, denz rostkötegek futnak, amelyeknek két csoportját külölÚtjük el: a *plexus muscularis mucosae-t*, és a lamina propriában kimutatható *plexus mucosus-to*

A múlt század végén Dogiel metilénkék festést alkalmazva morfológiájuk alapján három osztályba sorolta az ENS idegsejtjeit. A Dogiel I típusú neuronok szögletes vagy csillag alakú, kis sejttel rendelkezők, melyekből egy, legfeljebb két hosszú nyúlványt bocsátanak ki. A Dogiel II típusú sejtek sima felületű, ovális vagy kerek neuronok, melyek soma mérete jelentősen meghaladja a Dogiel I-es típusba tartozó sejtét. Számos (3-10) hosszú, axonszerű nyúlványt bocsátanak ki, melyek általában sima, elvékonyodó struktúrák. A Dogiel III típusba tartozó neuronok kis méretűek, hasonlóan a II típusúhoz sima sejtfelszínrel rendelkeznek, de kis számú rövid dendrit, és egyetlen axonszerű nyúlvány jellemzi őket. Végül egy negyedik csoportba soroljuk azokat a neuronokat, amelyek egyik fent említett osztályba sem illeszthetők be.

Az ENS neuronjai által szintetizált és kibocsátott transzmitterek kémiai természete és hatása éppen olyan diverzitást mutat, mint a központi idegrendszerben. A neuroaktívanyagok különböző társításokban és variációkban fordulhatnak elő az egyes sejtekben, ezáltal ezek sajátos neurokémiai elegye alapján neuronpopulációk külölÚthetők e_ melyekhez morfológiai és funkcionális tulajdonságok is rendelhetők. A neurokémiai kódrendszer kibővíthető a kvantitatív vizsgálatok elvégzésére vagy egyes neuron populációk külölÚtésére széles körben alkalmazott általános neurális sejtmarkerekkel (NADH diaforáz, mikro tubulus asszociált proteinek, kalcium-kötő fehérjék, struktúrális fehérjék stb).

A bélműködést befolyásoló transzmitterek egyike a noradrenalin. Már a XX. század első felében felismerték, hogy a szimpatikus idegek ingerlése az adrenalinéhoz hasonló hatásokat produkál a bélrendszerben. Az immuncitokémiai kísérletek kimutatták, hogy a noradrenalint szintetizáló enzimapparátus jelen van az ENS-ben, valamint a denervációs kísérletek bizonyították, hogy a noradrenerg rostok extrinsic eredetűek. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a középbél területén a vizsgált emlős fajok (tengerimalac, patkány, egér, sertés) egyikében sem sikerült noradrenerg neurotransmitert kimutatni.

Az enterális neuronok másik fontos ingerületátvivő anyaga a szerotonin (5-HT). Az 5-HT-t legnagyobb mennyiségben az enteroendokrin sejtek szintetizálják és raktározzák, ezért az emésztő rendszert tekintik a szervezet 5-HT raktárának. Az 5-HT-t kibocsátani képes sejtek nemcsak a szintetizáló apparátussal, hanem egy specifikus, nagy affinitású felvevő rendszerrel is rendelkeznek, amely az amin gyors eliminációját szolgálja. A szerotoninerg neuronok jelenlétét az ENS-ben biokémiai, hisztokémiai és immuncitokémiai módszerekkel egyértelműen igazolták. A kutatásokban leggyakrabban használt emlős fajok (patkány, egér, tengerimalac) mindegyikében kimutatták az intrinsic szerotoninerg neuronokat, és az őket kísérő extenzív rosthálózatot. Feltételezik, hogy mind a három fajban az 5-HT-IR neuronok a plexus myentericusba és submucosusba vetülő interneuronok. Receptorai nagy fokú diverzitásának köszönhetően az 5-HT hatása az emésztőcsatorna működésére rendkívül összetett. Ezek közül a perisztaltikára kifejtett hatása a legismertebb, melynek kiváltására az 5-HT-nak több út is rendelkezésére áll. Egyrészt kolinerg és nem-kolinerg neurális reflexkörökön keresztül tudja aktiválni a bélmozgásokat, másrésztől direkt módon a simaizom serkentése révén, illetve szenzoros neuronok és vagus afferensek ingerlésével. Ezen kívül az 5-HT részt vesz a vékonybél felszívó folyamatainak és elektrolit transzportjának irányításában is.

A bélcsatorna megfelelő működését nemcsak idegi kontroll hanem egy komplex hormonális szabályozás is biztosítja. Az összefoglaló néven gasztrointesztinális hormonokként emlegetett molekulák csoportját túlnyomó részt peptidok alkotják, melyek a bél nyálkahártya enteroendokrin sejtjeiből szabadulnak fel. Immuncitokémiai vizsgálatok segítségével bebizonyosodott, hogy a gasztrointesztinális hormonok számos képviselője az ENS neuronjaiban is termelődik. Ma már több, mint 15 különböző peptidet ismerünk, melyek neurális transzmitterként sokféle feladatot látnak el az ENS-ben. Jelen munka szempontjából kiemelkedő jelentőséggel bírnak azok a peptidok, melyek motoros funkciót töltenek be az ENS-ben. Ilyen peptidok a tachikinek, melyek elnevezése ezek gyors, simaizom-kontraháló hatásának köszönhető. A család legtöbbet kutatott tagja a P-anyag (SP). A legtöbb vizsgált fajban a kiterjedt SP-IR rosthálózat mellett egy intrinsic neuronpopuláció, melyre egységesen jellemző, hogy a sejtek kolin-acetil-transzferáz (ChAT) pozitívítást is mutatnak. A morfológiai vizsgálatok mellett, a farmakológiai mérések sok emlős faj esetében azt mutatják, hogy a SP és recep-

tor agonistái erős serkentő hatást gyakorolnak a vékonybél izomzatára. Feltételezhető, hogy a plexus myentericus neuronjai SP és neurokinin A kibocsátása révén a perisztaltikus reflex felszálló kontrakciós fázisáért felelősek. G-proteinhez kapcsolt receptoraikat három altípusba soroljuk (NK1, NK2, NK3 receptor).

2. Célkitűzés

Tengerimalac bélidegrendszerének nukleáris anatómiája, sejtjeinek neurokémiaja viszonylag jól feltérképezett, de más kis (egér, patkány)- és nagyemlős (sertés, kutya) fajok esetében is bőveges irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A modell-fajokból származó eredmények alapján leszűrhető, hogy a neuronok morfológiája, neurokémiai kódrendszere, az enterális reflexkörök működése bár sok tekintetben átfedést mutat, az emlős fajok esetében sem egyforma. Az általunk vizsgált állatfaj, a házi nyúl tekintetében azonban - bár a neurobiológia más területén (pl. retina) modellállatnak számít - több szempontból hiányosságok tapasztalhatók.

Munkám célja az volt, hogy az ileum területén - elsősorban a plexus myentericusra fókuszáltn -

feltárjuk az esetleges hasonlóságokat vagy eltéréseket a nyúl és más emlős fajok bélidegrendszere között.

A plexus myentericus általános jellemzése során neurális markerek segítségével kívántuk:

1. leírni a plexus myentericus általános felépítését, _ "
2. meghatározni a sejtsűrűséget,
3. morfológiailag tipizálni az enterális neuronokat,
4. elvégezni meghatározott sejtpopuláció neurokémiai azonosítását.

A neurokémiai kódrendszerek felderítése kapcsán vizsgálataink középpontjába a monoaminokat állítva, megpróbáltuk feltérképezni:

1. a noradrenerg struktúrákat és azok kapcsolatát más neurális markerekkel,
2. a szerotoninerg és szerotonin-akkumuláló rendszert,
3. a szerotonin-akkumuláló struktúrák kapcsolatát más neurális markerekkel.

Az 5-HT hatását vizsgálva az ileum hosszanti izomrétegének kontrakcióira a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen hatása van a külsőleg adott 5-HT-nak a bélizomzat összehúzóására?
2. Milyen kolinerg és nem-kolinerg összetevőkre bontható az 5-HT hatása?

3. Anyagok és módszerek

Vizsgálatainkat kisállattenyészetekből származó fehér házi nyulakon végeztük, melyek testtömege 2-3 kg között változott. A kísérletekhez az állatokat intraperitoneálisan injektált 5% ketamin oldattal (10 mg/kg) elaltattuk majd a nyaki artériák elvágásával kivéztettük. A

hasüreget feltárva megkerestük az ileo-coecalis szájadékot és innen visszszámolva 10 cm-t, a vékonybél ileális régióját eltávolítottuk. A béltartalmat Krebs-Henseleit oldattal alaposan kimostuk és a továbbiakban ezt a bélszegmenst használtuk vizsgálatainkban.

Egyes immuncitokémiai jelölések előtt 5-HT-akkumulációt hajtottunk végre. Esetenként az inkubációs elegy 5-HT mellett reserpint vagy fluoxetint is tartalmazott. A szerotonin hatékonyabb immuncitokémiai kimutatásához specifikus furmakonokat pargilint és kolhicint alkalmaztunk.

A morfológiai vizsgálatok előtt minden esetben immerziós fixálást végeztünk. A detektálható molekulák többségénél megfelelő volt, ha abelet szobahőmérsékleten 4%-os paraformaldehidben fixáltuk 6-8 órán keresztül. ChAT és bizonyos esetekben 5-HT immunjelölésnél a szövetet Zamboni fixálóba helyeztük és 40C-on, egy éjszakán keresztül fixáltuk.

Az immuncitokémiai festéseket bélnyúzatokon hajtottuk végre, melyek készítéséhez a bélszegmenseket a mesenterialis szegély mentén felvágtuk és binokuláris sztereonúmkroszkóp alatt a bélhosszanti izomréteget óvatosan eltávolítottuk, amelynek belső oldalán optimális esetben a teljes plexus megtalálható volt. A bélkeresztmetszetek vizsgálathoz kriosztátos metszést alkalmaztunk.

A NADHd hisztokémiai jelölést frissen preparált, Krebs oldattal feltöltött béldarabokon hajtottunk végre, míg a fixált anyagokon peroxidáz immuncitokémia (avidin-biotin módszer, DAB kromogén) alkalmazásával MAP2, CALB, kalretinin, parvalbumin és 5-BT kimutatást végeztünk. Az immunfluoreszcens eljárást elsősorban kettős jelölések kivitelezésére alkalmaztuk. A szakirodalomban ajánlott kontroll vizsgálatokat mind (az egyszeres, mind a kettős jelölések esetében) elvégeztük.

A totálpreparátumokról és a kriosztátos metszetekről Olympus BH2, és egy Olympus DP50 típusú digitális kamerával összekötött Olympus BX 51 fény-, és epifluoreszcens mikroszkóp segítségével mikrofotókat készítettünk. A digitális képeket AnalySIS nevű programmal rögzítettük és a háttérkontraszt módosításokat Adobe Photoshop 7.0 programmal végeztük el. A sejtszámolásokat és sejtméret megállapítást számítógépes program (NHI Image 1.55 szoftver) segítségével oldottuk meg. A mikroszkóphoz (Nikon Microphot FX1) csatlakozó MTI CCD 72 típusú kamera segítségével képernyőn

jelenítettük meg a vizsgált preparátumokat. A preparátumot szisztematikusan végigpásztázva, 200x nagyítás mellett végeztük a sejtszámolást és a morfometriai méréseket.

A farmakológiai kísérletekhez hosszanti Ízomzatból készült preparátumokat használtunk. A hosszanti izom/plexus myentericus preparátumokat speciális, TSZ-04/2 típusú szervedényekbe helyeztük, melyeket Krebs oldattal töltöttünk fel, $e=1$ biztosítva a megfelelő ozmotikus koncentrációt. Az inkubációs folyadékot a vizsgálatok ideje alatt folyamatosan oxigenizáltattuk és 37°C-on tartottuk. A vizsgálatok során az izomkontrakciókat elmozdulásmérő, ill. a későbbiekben erőmérő transzducerekkel regisztráltuk. A transzducerek által generált elektromos jel erősítőn, AID konverteren keresztül a számítógépbe került, ahol az izomkontrakciókat ISOSYS 1.0 programjelenítette meg.

A tesztelt anyagokat mikropipetták segítségével közvetlenül az inkubációs elegybe juttattuk. A hatás hosszát az inkubációs folyadék leengedésével és újratöltésével szabályoztuk. Optimális koncentráció kiválasztásához először a tesztelt anyag dózis-hatás görbéje szükséges. A későbbi mérésekhez azt a koncentrációt választottuk ki, mely a minimum és maximum hatás között helyezkedett el, biztosítva az értékelhető kontrakció kiváltását, de megelőzve a receptorok esetleges deszenzitizációját. Ennek elkerülése végett a drogokat maximum hatás elérése után azonnal kimostuk a szövetből. Az egyéb vizsgált receptor antagonisták/csatorna blokkolók és receptor agonisták dózisának és inkubációs idejének megválasztásánál az irodalmi adatokra támaszkodtunk.

A kiváltott hatásokat mindig egy előzetesen mért kontrollkontrakcióhoz, ill. a maximum kontrakcióhoz viszonyítottuk. A vizsgálat befejezéseként 80mM KCl oldattal maximum kontrakciót váltottunk ki a preparátumon. A kiértékelésnél figyelembe vettük a bélizom alapaktivitását és a kiváltott összehúzódást. A kettő különbsége adta az effektív hatást, amit a maximum kontrakció százalékában fejeztünk ki. Az adatok átlagolásához és a szignifikancia számolásához minden mérést minimum hatszor megismételtünk, ügyelve arra, hogy egy állatból maximum két mérés származzon. A szignifikancia analízishez két mintát összehasonlító Wilcoxon előjeltesztet, míg a hármas, kapcsolt minták analíziséhez a Quade-tesztet használtuk. Szignifikánsnak minősítettük azokat a hatásokat, melyeknél $p:O::: 0,05$ eredményt kaptunk.

4. Eredmények

Általános sejtmarkerek

A nyúl ileumában a NADHd jelölés segítségével kirajzolódtak a plexus myentericus egymástól távol elhelyezkedő, lazán elrendezett rostkötegei és kis méretű ganglionjai. A bélcsatorna hosszanti tengelye mentén a szomszédos ganglionok átlagosan 484:1:83 μ m, körkörös irányba haladva 227:1:67 μ m távolságra helyezkednek el egymástól. A plexus területén 2437:1:292 NADHd pozitív sejtet számoltunk meg cm^2 -ként, melyek főként a ganglionokban lokalizálódtak, de számos sejt volt látható az interkonnektívumokban is. Az egyes ganglionok 12-134 neuront tartalmaznak. Az anti-MAP2 primer antitest segítségével 2472:1:322 neuront sikerült megjelölni a plexus myentericusban, amely megegyezik a NADHd jelölt sejtek számával. A MAP2 immunpozitív neuronoknak mind a sejttestje, mind nyúlványrendszere jól detektálható. A sejtek teljes nyúlványrendszere nem minden esetben jelölődött ki tökéletesen, ezért a plexus interkonnektívumai kevésbé rajzolódtak ki. Néhány jelölt neuron esetében azonban a nyúlványok hossza a 100 μ m-t is meghaladta és lefutásuk a szomszédos ganglionig követhető volt. A jelölt sejtek között felismerhető volt mind a három (Dogiell, II, III) típus.

IKalcium-kötő fehérjék eloszlása a plexus myentericusban

Kalretinin és parvalbumin-immunpozitív struktúrákat nem sikerült kimutatnunk a nyúl plexus myentericusában. A CALB immunjelölés eredményeképpen kirajzolódott plexus myentericus kis nagyítású képe. Az immuncitokémiai jelölés 109:1:27 immunpozitív neuront mutatott ki cm^2 -ként, mely érték a NADHd jelölt sejtek 5%-át teszi ki. A CALB-IR sejtek lokalizálhatók a plexus ganglion

jaiban és az interkonnektívumokban is. Morfológiájuk alapján a CALB-IR neuronokat két csoportba osztottuk. Az első osztályba tartozik az immunreaktivitást mutató neuronok nagyobb hányada (73%). Ezek a sejtek szögletes szómával és erősen festődött, tipikus lapos dendritfával jellemezhetőek, melyek nem messze az eredésüktől finom lamellákra oszlanak. Ezek alapján ezt a CALB-IR neuroncsoportot a Dogiel I típusba sorolhatjuk. A kisebb sejtpopulációt (27%) magába foglaló másik típusnál, a CALB-IR sejtek nyúlványrendszere nem mutat immunpozitivitást, sejttestük lekerekített, sima felületű. A morфомetriai mérések azt mutatják, hogy mind a két típusba azonos nagyságú, 440:1:27 μm^2 területű neuronok tartoznak. A plexusban CALB-IR rostokat is sikerült detektálni, melyek gyakran pericelluláris kosarakat alkotnak jelöletlen sejttestek körül. A gazdag rosthálózat csak a plexus primer komponenseire korlátozódott, ritka esetben figyelhetünk meg CALB pozitív nyúlványokat a szekunder komponensekben és teljesen hiányoztak a terciar plexusból, valamint a körkörös izomrétegből. Ezt a megfigyelésünket a keresztmetszeteken elvégzett immunjelölések is alátámasztják, melyeken jól láthatók a plexus myentericus CALB tartalmú struktúrái, de a bélfal többi rétegében nem detektálható immunpozitivitás.

Az NO tartalmú sejtek identifikálásának adekvát módszere a NOS immuncitokémiai kimutatása. A plexus NOS tartalmú neuronjai az összes morfológiai csoportot (Dogiell, II, III) képviselték, de CALB/NOS kettős jelölt struktúrát nem találtunk. A NOS és CALB-IR neuronok két teljesen különálló sejtpopulációt alkotnak. A VIP antitest segítségével csak rostokat sikerült a plexusban detektálni, melyek gyöngyszerű varikozitásokat viseltek. A VIP pozitív rostok nem tartalmaztak CALB-t, és egyetlen CALB-IR rost sem mutatott VIP immunreaktivitást. A CALB-t termelő sejtek nem tartalmaznak SP-t, azonban néhány, elsősorban a második osztályba tartozó, gyengénjelölődő CALB-IR sejt körül megfigyelhető volt SPIR rostgyűrű. Az összes CALB-IR sejt ChA T -immunpozitivitást mutatott.

Tirozin-hidroxiláz (TH)-immunpozitív struktúrák a plexus myentericusban

Anti-TH antitestek segítségével sikerült egy közepesen kiterjedt, immunpozitív rosthálózatot és kevés neuronból álló intrinsic neuronpopulációt detektálnunk. A TH-IR rostok, melyek behálózják a ganglionokat és az interkonnektívumokat, csak a plexus primer komponenseire korlátozódtak, és csak kivételes esetben léptek ki a terciar plexusba. A ganglionokban számos immunreaktív axonterminális, valamint TH-IR nyúlványok által alkotott gyűrű volt megfigyelhető, melyek jelöletlen sejttesteket vettek körül. Alakjukat és méretüket vizsgálva két fajta pericelluláris kosarat különítettünk el. Az egyik kis méretű, kerek kontúrral rendelkező sejtek körül formálódik, míg a rostgyűrű alakjából következően a másik fajta kosár nagyobb, inkább hosszúkos sejteket vesz körül. A gyöngyízülszerűen elhelyezkedő varikozitások jellegzetes megjelenést kölcsönöznek a TH-IR rostoknak. Az ileum plexus myentericusában cm^2 ként II immunpozitív sejtet találtunk, amelyek általában egyesével, vagy ritkán kettes-hármas csoportban helyezkedtek el a ganglionokban. Érdekes volt megfigyelni, hogy merőlegesen haladva a hosszanti izom futási irányára, egyes szomszédos ganglionok következetesen tartalmaztak sejttestet, míg a mellettük lévő ganglionok nem. A kis méretű ($212:18 \mu\text{m}^2$) TH-IR neuronok nyúlványrendszere nem jelölődött kielégítően, ezért a tipizálást nem tudtuk elvégezni, de méretük alapján ezek a sejtek valószínűleg a Dogiel III sejt típusba tartoznak.

A nagy méretű, NOS-immunpozitív Dogiel II típusú neuronok körül gyakran detektáltunk TH-IR pericelluláris kosarakat. A kisebb átmérőjű pericelluláris kosár célsejtjét nem találtuk meg a NOS-IR neuronok között, és a két neuronpopuláció sem mutatott átfedést. Egyik fajta TH-IR kosarat sem tudtuk SP-IR sejttest körül detektálni és a két immun jelölt rostpopuláció sem mutatott átfedést egymással.

Szerotoninerg és szerotonin-akkumuláló struktúrák a plexus myentericusban

Az első immunjelöléseknél az irodalomban általánosan használt protokollt követtük (fixálás egy éjszakán keresztül 4% paraformaldehidben), de a fent említett monoaminok nem

sikerült kimutatnunk: más fixálási és farmakológiai (pargilin, kolhicin) manipulációk után sem a

plexus myentericus hálózatában. Pozitív kontrollként elvégeztük az 5-HT immun jelölést bélke-resztmetszeteken is, allOI erősen immunreaktív enteroendokrin sejteket és hízósejteket tudtunk detektálni a lamina epiliialis, illetve a lamina propria rétegeiben.

Az TrpOH antitesttel elvégzett immun jelölés eredménye egy erős, varikozitásokban gazdag rosthálózat volt. A TrpOH-IR rostok behálózták a plexus egész területét. Rostokat ki tudtunk mutatni az elsődleges, másodlagos és harmadlagos komponensekben is, de immunpozitív sejttestet nem.

AZ 5-HT kimutatására irányuló kísérleteinkben fixálatlan béllal 5-HT felvételi tesztet végeztünk. 5-HT oldatban való inkubálás után az immuncitokémiai jelölések eredményesnek bizonyultak. Mind a plexus myentericusban, mind az izomrétegen egy extenzív, varikozitásokkal gazdagon ellátott 5-HT-IR rostrendszer jelölődött. Immunpozitív sejttesteket azonban ebben az esetben sem sikerült detektálni. A TrpOH-IR és 5-HT-akkumuláló elemek között megközelítően teljes az átfedés, ugyanis minden 5-HT-pozitív rost tartalmaz TrpOH-t, bár néhány TrpOH-IR rost nem mutat 5-HT immunpozitivitást.

Az 5-RT akumuláló és SP-IR rostrendszerek között kolokalizációt nem tudtunk kimutatni, bár a két rosthálózat egymáshoz nagyon közel, szorosan összefonódva fut az interkonnektívumokban. A SP-IR-t mutató neuronok körül gyakran detektáltunk 5-RT pozitív gyűrűket, vagy azok felületén 5-RT-IR tenninálisokat. Az 5-RT/ChAT innuntluoreszcens jelölések segítségével megállapíthattuk, hogy az 5-RT-t felvenni képes rostok és a plexus myentericus kolinerg struktúrai nem kolokalizálnak egymással. Ugyanakkor sikerült megfigyelnünk olyan 5-RT pozitív rostokat, melyek ChAT tartalmú sejtek körül helyezkednek el, mintegy körbe fonva azokat, illetve áthaladnak azok felszínén.

SP immunpozitív struktúrák a plexus myentericusban

Anti-SP antitesttel egy, a plexus myentericus minden részletére kiterjedő, rendkívül erős innuureaktivitást mutató rosthálózat jelölődött. A varikozitásokkal gazdagon ellátott rostok behálózták a ganglionokat, interkonnektívumokat és az izomzatot egyaránt. A plexus primer komponenseiben számos neuront detektáltunk, melyek szögletes vagy csillag alakú sejttesttel rendelkeztek. Nyúlványaik lapos, lamelláris szerkezetet mutattak, melyek finom rostokban végződtek. Ezen morfológiai jegyek alapján a SP-IR sejtek valószínűleg a Dogiel I típusba sorolhatók.

ChAT/SP kettős innuntluoreszcens vizsgálatok eredményei szerint a két markerrel jelölt neuronpopuláció között részleges átfedés mutatható ki. A SP-IR sejtek nagy többsége kettősjelölt volt, de sikerült csak SP tartalmú neuronokat is leírnunk.

A szerotonin összehúzóást vált ki az izolált bél hosszanti izomrétegen

Az 5-RT 10.7 M koncentrációban vált ki először hatást, majd a koncentráció emelésével növekszik az összehúzóások mértéke. A feszültség-ruggó Na⁺ csatornák tetrodotoxinnal (TTX) történő gátlása után az 5-RT kis mértékű, de szignifikáns kontrakciót képes kiváltani. A preparátumok atropinnal (ATR) való előkezelése mérsékelten csökkentette az 5-RT hatását, mely csökkenés tovább fokozódott ATR és 1TX együttes jelenlétében. A preparátumok hexametoliummal (REX) történő előkezelése után az 5-RT hatása kis mértékben redukálódott.

Az 5-RT kiváltotta kontrakciók nem-kolinerg komponenseinek azonosítása során világossá vált, hogy SP receptorok blokkolásával az 5-RT hatása csökkenthető. Abban az esetben, ha a NK1 antagonistához ATR-t is adtunk, a hatás tovább csökkent, a NK1 antagonistára, ATR és 1TX kombinált blokkádja pedig még tovább redukálta az 5-RT által kiváltott kontrakciókat. Az NK2 receptorblokkoló szintén eredményesen gátolta az 5-RT serkentő hatását, míg az NK3 receptorok kiiktatása a specifikus antagonistára vegyülettel hatástalannak bizonyult. A NK1 antagonisták kezelés, és ehhez viszonyítva az NK1 antagonisták és ATR kezelés hatására bekövetkező kontrakció csökkenés változatlan maradt.

A kontrakció kiváltásában résztvevő 5-RT receptorok azonosítása céljából methysergide-t (M-SER), tropisetront (5-RT3 antagonisták), 5-carboxarnidotriptamint (5-RT1 agonista), ametil-5-hidroxitriptamint

(5-RT2 agonista, a-m-5-RT), 5-metoxi-triptamint (5-RT4 agonista, MOT) használtunk. M-SER jelenlétében a kontrakciók jelentősen csökkentek, míg M-SER és TTX együttes adásával meg lehetett szüntetni azokat. Ra megfordítottuk a drogok beadási sorrendjét, azt tapasztaltuk, hogy a TTX kezelés után megmaradt kontrakciókat a M-SER eltünteti. Az 5-RT3 antagonistásként a tropisetron hatástalanak bizonyult, de hasonló eredményre jutottunk 5-carboxarnidotriptamin esetében is. Az 5-RT2 receptorokra specifikus a-m-5-RT jelentős kontrakciókat váltott ki a hosszanti izom-plexus myentericus preparátumon. Az a-m-5HT hatását a M-SER teljes mértékben blokkolta, míg TTX jelenlétében az a-m-5-HT általi serkentés csak részben csökkent. A MOT beadása összehúzóásokat váltott ki a preparátumokon, amiket a M-SER kezelés teljes mértékben kivédett. A feszültség-függő Na⁺ csatornák blokkolása teljesen hatástalanak bizonyult MOT által kiváltott kontrakciók esetében. Az a-m-5-HT ATR, HEX, NK1 és NK2 receptor antagonistásként jelenlétében csak csökkent mértékű kontrakciót képes kiváltani. Végezetül megvizsgáltuk, hogy a M-SER más receptor antagonistákkal kombinálva hogyan befolyásolja az 5-HT által kiváltott kontrakciókat. A M-SER és ATR kombinált gátlása erősebb, mint amekkorát a M-SER egyedül képes kiváltani. A M-SER+NK1 receptor antagonistásként, M-SER+NK2 receptor antagonistásként, illetve a M-SER+HEX együttes adása azonban nem okozott további csökkenést a kontrakciókban.

5. Eredmények megbeszélése és következtetések

A plexus myentericus általános morfológiai jellemzése

A nyúl iJeumán elvégzett vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy a plexus myentericus mintázata a mások által vizsgált emlős fajoktól eltérő; egymástól távol elhelyezkedő, kis méretű ganglionokból épül fel. NADHd technika felhasználásával 2500 sejtet számoltunk meg négyzetcentiméterenként, amelyhez közel hasonló értéket kaptunk MAP2-immunjelölést követően. Összevetve ezt az értéket a többi rágsáló plexus myentericusában kiszámolt sejtsűrűséggel, megállapítottuk, hogy a neuron denzitás a nyúl plexus myentericusában alacsony.

Kalcium-kötő fehérjék a plexus myentericusban

Az emlős ENS-ben kimutatott két kalcium-kötő fehérje közül a nyúl iJeumának plexus myentericusában csak a CALB jelenlétét tudtuk igazolni. A kalretinin kimutatására irányuló vizsgálataink negatív eredménnyel zárultak, annak ellenére, hogy azt sok emlős faj ENS-ében neurális markerként használják.

Anti-CALB antitest felhasználásával a plexus myentericus neuronjainak megközelítőleg 5%-a festődött, amelynek 73%-a erős immunreaktivitást mutató, Dogiel I típusú neuron volt. A CALB-IR sejtek kisebb csoportjában (27%) a sejtest gyengén, a nyúlványrendszer egyáltalán nem jelölődött. A két csoport között szignifikáns méretbeli különbséget nem találtunk. Csak a plexus primer komponenseiben sikerült CALB-IR rostokat megfigyelnünk, melyek gyakran alakítottak ki pericelluláris kosarakat immunnegatív sejtestek köré. A kettős immunfluorescens jelölések alapján megállapítottuk, hogy a plexus myentericus NOS-, VIP-, SP-IR struktúrái nem tartalmazzak CALB-t. Ezzel ellentétben a teljes CALB-IR populáció ChAT immunreaktivitást mutatott. Mindent összevetve megállapítottuk, hogy a plexus myentericus CALB tartalmú sejtei valószínűleg kolinerg intemeuronok.

Noradrenerg struktúrák a plexus myentericusban

Anti-TH antitest segítségével varikozitásokban gazdag rosthálózatot és egy alacsony sejtszámú noradrenerg populációt sikerült kimutatnunk. Ez utóbbi felfedezés különlegesnek tekinthető, mert más emlős ENS-ben a vékonybél területén csak noradrenerg rostok kerültek

leírásra. Az intrinsic noradrenerg neuronok jelenléte arra utal, hogy nyúl esetében a noradrenerg rendszer a helyi retlexkörök segítségével is befolyásolni tudja a bél működését, ami működésbeli és fiziológiai eltérésekhez vezethet a többi emlős faj bélcsatornájához képest. Szerotoninerg struktúrák jelenléte a plexus myentericusban és az 5-HT hatása a vékonybél motilitására

Annak ellenére, hogy az 5-HT az emlős ENS-ben széles körben elterjedt transzmitter, vizsgálataink az intrinsic eredetű szerotoninerg rendszer jelenlétét a nyúl plexus myentericusában nem igazolták. Az áhalunk vizsgált fuj és bélszakasz esetében 5-HTimmunpozitív struktúrdkat csak 5-HT-vel történt inkubációt követően tudtunk detektálni. Anti- TrpOH antitest segítségével is csak immunreaktív rostokat sikerült kimutatni. A kettős Immunjelölések igazolták, hogy az 5-HT-t szintetizálni képes rostok felvenni is tudják: az 5-HT-t. A szerotoninerg rostok rendkívül erős hálózata a hosszanti izomzaton, arra engedett következtetni, hogy az 5-HT-nak szerepe lehet a motoros funkciók szabályozásában. Ugyanakkor az immunreaktív pericelluláris kosarak jelenléte felvetette azt a lehetőséget is, hogy ez a monoamin integratív feladatokat is betölt a plexus myentericusban.

Az 5-HT koncentrációfüggő összehúzódásokat váltott ki a hosszanti bélizomzaton. Hatása egyrészt közvetlenül a simaizomsejteket aktiválásán, másrészt pedig neuronokon keresztül közvetítődik. A különböző furmakonok segítségével megállapítható, hogy az 5-HT direkt hatását 5-HT₂ és 5-HT₄ receptorok közvetítik, míg a neurális körök ingerlését 5-HT₂ és M-SER inszenzitív receptorokon keresztül éri eL Az 5-HT indirekt hatása (1) ACh, (2) SP, (3) neurokinin A felszabadítása révén érvényesül. Kettős immunfluoreszcens jelölések során ChAT-IR és SP-IR sejtek körül 5-HT-IR rostokat és pericelluláris kosarakat figyeltünk meg, melyek jelenléte igazolja a nevezett struktúrák: kapcsolatát, és alátámasztja a hatástani vizsgálatok eredményeit.

Saját publikációk jegyzéke

Disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

1. Gábrriel R, Pásztor I, Dénes V, Wilhelm M (1998): Some neurohistochemical properties of nerve elements in myenteric plexus of rabbit ileum: similarities and dissimilarities to the rodent pattern. *Cell Tissue Res* 292: 283-292.
2. Dénes V, Lázár Zs, Barthó L, Gábrriel R (2003): Serotonin in the rabbit ileum: localization, uptake and effect on motility. *Anat Rec* 271: 368-376.
3. Dénes V, Gábrriel R (2004): Calbindin-immunopositive cells are cholinergic interneurons in the myenteric plexus of rabbit ileum. *Cell Tissue Res* (közlésre elfogadva).
4. Dénes V, Gábrriel R: Involvement and role of tachykinin and acetylcholine receptors in serotonin-evoked contractions in rabbit small intestine (közlésre benyújtva).

Disszertáció alapjául szolgáló konferencia poszterek:

1. Gábrriel R, Pásztor I, Dénes V, Wilhelm M (1997): Neurohistochemistry of rabbit ileal myenteric plexus: unusual neurochemical coding of intrinsic neurons. 25th Göttingen Neurobiology Conference, proceedings P 708. (poszter bemutatás)
2. Dénes V, Lázár Zs, Barthó L, Gábrriel R (2001): Effect of serotonin in rabbit ileum: morphological and pharmacological evidence. 28th Göttingen Neurobiology Conference, proceedings P 721. (poszter bemutatás)
3. Dénes V, Lázár Zs, Barthó L, Gábrriel R (2001): Szerotoninerg struktúrák lokalizációja és hatása a nyúl ileumában. MITT Konferencia, Szeged (poszter bemutatás)
4. Dénes V, Gábrriel R (2003): Szerotonin-kiváltott kontrakciók farmakológiai analízise nyúlileumban. MITT Konferencia, Balatonfüred (poszter bemutatás)
5. Dénes V, Gábrriel R (2003): Pharmacological analysis of serotonin-evoked contractions in rabbit ileum. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prága P3210

Egyéb konferencia poszterek:

1. Gábrriel R, Dénes V, Szöke É, Czéh G (2001): Ca-kötő fehérjék és Ca-áramok hátsó gyöki és trigeminális ganglion tenyészetekben. MITT Konferencia, Szeged (poszter bemutatás)
2. Bánvölgyi Á., Pozsgai G, Dénes V, Szolcsányi J, Brain S, Pintér E (2002): A mustárolaj okozta gyulladás jellemzése BALB/C NK1 és VRL receptor hiányos transzgenikus egereken. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológusok Konferenciája, Debrecen (poszter bemutatás)
3. Pintér E, Bánvölgyi Á, Dénes V, Szolcsányi J, Brain S D (2003): Az oxazolonnal kiváltott késői

hiperszenzitív reakciók jellemzése neurokinin-1 és vanilloid receptor hiányos egerekben. MITT Konferencia, Balatonfüred (poszter bemutatás)

4. Schaffer D, Dénes V, Gábrriel R, Purger J (2003): Kémiai IDIIfkerek eloszlása a barna ásóbéka (*pelobates fuscilis*) retinájában. MITT Konferencia, Balatonfüred (poszter bemutatás)