

DEBRECENI EGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR



*Neuronális nitrogén-monoxid szintézis követése és
neurokémiai szabályozása puhatestűek
(MOLLUSCA) ideghálózataiban*

Megjegyzés [RT1]:

*Detection and neurochemical regulation of the
neuronal nitric oxide synthesis in molluscan
neuronal networks*

Doktori (PhD) értekezés tézisei

RŐSZER TAMÁS

témavezető:

DR. BÁNFALVI GÁSPÁR

tanszékvezető egyetemi tanár

Debreceni Egyetem • Természettudományi Kar
Állatanatómiai és Élettani Tanszék

Debrecen, 2004

I. BEVZETÉS

Az utóbbi évtizedben vált ismertté, hogy az egyszerű szerkezetű nitrogén-monoxid (NO), jelátvivő molekula szerepét tölti be egyes sejtek közötti kémiai információátvitelben. A szignálmolekula NO mind a gerincesek, mind a magasabbrendű gerinctelen állatok idegrendszeri működéseiben szerepet kap (Elofsson et al. 1993, Dawson és Dawson 1995, Martinez 1995, Jacklet 1997). A NO bioszintézisét a több izoformában megjelenő nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) enzim végzi. Az egyes izoformák adott szövettípusra jellemzők, így szöveti eloszlásuk szerint, az emlősök szervezetében ismerünk neuronális (nNOS), endotheliális (eNOS) és az immunrendszer sejtjeiben megjelenő, indukálható (iNOS) izoformákat. Ezekon kívül több gerinctelen állatfaj idegrendszeréből izolált NOS szerkezetét, illetve biokémiai tulajdonságait is ismerjük (Hunag et al. 1997, Mayer és Andrew 1998).

A NO-t, mint hírvivő molekulát, a fejlődéstörténet szinte valamennyi állomását képviselő állatfaj idegrendszerében megtaláljuk. Részvétele a központi idegrendszer néhány működésében általános az egész gerinces és fejlett gerinctelen állatvilágban. Ezzel szemben a NO bioszintézisét vezérlő kémiai jeleket, néhány kivételtől eltekintve [mint például az acetil-kolin és a glutamát szerepe a nNOS működésének serkentésében, morfinszármazékok és glutamát NO szintézist provokáló hatása egyes gerinctelenekben (Mayer és Andrew 1998, Nieto-Fernandez et al. 1999)] nem ismerjük.

Munkacsoportunk célja, hogy a NO bioszintézisét szabályozó lehetséges neurotranszmittereket azonosítsa, azáltal, hogy anatómiai kapcsolatot keres nitrerg (NO-t termelő) és más neurotranszmittereket felszabadító idegsejtek között, illetve vizsgálja az ideghálózatban zajló NO-szintézis mértékét és annak befolyásolhatóságát.

Jelen PhD értekezésben a NOS neurokémiai szabályozását alternatív kísérleti rendszerben, szárazföldi tudóscsigák (Pulmonata, Gastropoda) központi idegdúcáiban illetve enterális ideghálózataiban vizsgáltuk.

A tudóscsiga *Helix* fajok központi idegrendszerében számos neurotransmitter, így különböző monoaminok (Hernádi et al. 1998), gerinctelenekre jellemző neuropeptidok (Hernádi et al. 1995), valamint a NOS (Cooke et al. 1994, Sanchez-Alvarez et al. 1994, Hunag et al. 1997, Pisu et al. 1999) eloszlása ismert.

A ganglionokat alkotó neuronpopulációk többségében megjelenik a molluscan cardioexcitatory tetrapeptide (Phe-Met-Arg-Phe-amid, röviden FMRFamid) neuropeptid, illetve a hozzá hasonló FMRF szekvenciát tartalmazó heptapeptid. A monoaminerg és a nitrerg neuronok projekciói kilépnek a ganglionokból, vagy érző idegeken keresztül érkeznek azokba. Ezzel szemben az FMRFamidot tartalmazó axonok gazdagon elágaznak a ganglionokon belül és számos sejtkapcsolatot alakítanak ki olyan neuronokkal, melyek nem tartalmaznak FMRFamidot.

Az intraganglionáris FMRFamiderg végződéses elterjedt volta valószínűsíti az FMRFamiderg axonok és a nitrerg sejtek közötti anatómiai kapcsolat létrejöttét.

Célkitűzés (1)

Célunk az FMRFamidot tartalmazó és a NO-t termelő neuronok közötti lehetséges anatómiai, illetve funkcionális kapcsolat keresése a szárazföldi tüdőscsiga *Helix lucorum* központi idegrendszerében.

A NOS-tartalmú idegsejteket NADPH-diaforáz hisztokémiai technikával (Nakos és Gossrau 1994), míg az FMRFamidot immunhisztokémiával jelenítettük meg. Az izolált idegdúcok NOS-aktivitását a termelő NO származékának tekinthető nitrit-ionok végpont kolorimetrias mérésén alapuló módszerrel mértük.

Vizsgáltuk a NOS szubsztrát L-arginin, konvencionális NOS-gátlók, szintetikus FMRFamid és az FMRFamid receptor-gátló amilorid-hidroklorid (Cottrell 1997) hatását az intraganglionáris NO szintézis mértékére.

Célkitűzés (2)

A tüdőscsigák enterális idegrendszere, mely vizsgálataink másik objektuma, igen hasonlóan épül fel a gerincesek gastrointestinalis idegrendszeréhez. Számos neurotranszmitter molekula, mint monoaminok és neuropeptidok eloszlása ismert a csigák enterális plexusaiban (Hernádi et al. 1995, Hernádi et al. 1998), azonban nitrerg sejtek jelenlétét korábban nem vizsgálták bennük.

Munkánk másik alapvető kérdése, hogy a fejlődéstörténet korai szakaszában megjelenik-e a NO az enterális rendszer szignálmolekulái között.

A Pulmonata alosztály különböző rokonsági köreit reprezentáló csigafajokban térképeztük fel az enterális idegrendszer NADPH-diaforáz reaktív, tehát NOS-t tartalmazó idegi elemeit. A NO funkciójának elemzésére farmakológiai tesztekben elemeztük a NOS-szubsztrát L-arginin és ismert NOS-gátlók hatását a tápcsatorna motoros működésére. A NO származék nitrit-ionok koncentrációjának mérésével a NO szintézis lehetőségét vizsgáltuk.

Célkitűzés (3)

A szárazföldi tüdőscsigák életciklusára jellemző, hogy kedvezőtlen környezeti feltételek mellett hipometabolikus nyugalmi állapotba kerülnek, miközben az idegrendszer működése jelentősen átalakul. Az axonális transzport lelassul, számos neurotranszmitter (monoaminok, neuropeptidok, NO) szintézise szünetel egyes neuronokban (Vignola et al., 1995, Kaufmann et al., 1995, Bernocchi et al., 1998, Pisu et al., 1999, Michaelidis et al. 2002). Célunk volt, hogy a nitrerg hálózat adaptációját vizsgáljuk a hosszú hipometabolikus, dormáns állapothoz.

A disszertációban bemutatom a nitrerg hálózat szerkezetét, illetve NO-termelését az idegrendszer hosszútávú nyugalmi időszakában.

II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Vizsgált állatok

A kísérleteket az 1998. évi XXVIII. tv. etikai előírásainak megfelelően végeztük. A csigákat természetből gyűjtöttük, kivéve a mesterséges tenyészetből származó *Achatina fulica* egyedeket. A csigákat nedves viváriumokban, nitrít-mentes növényi táplálékon tartottuk a kísérletek megkezdéséig. A viváriumok hőmérséklete 22-25 °C volt.

A hipometabolikus dormáns állapot vizsgálatához a hibernált csigákat november és március között, természetből gyűjtöttük, majd 8 °C hőmérsékleten, sötétben tartottuk a vizsgálatok kezdetéig. Az estiviatiót mesterségesen váltottuk ki azáltal, hogy a csigákat 25 °C-on, száraz levegőn tartottuk legalább 15 napig.

1. táblázat: A vizsgált csigafajok listája

<i>Familia</i>	<i>Species</i>
ACHATINACEA	<i>Achatina fulica</i> BOWDICH 1828
HELICACEA	<i>Cepaea hortensis</i> MÜLLER 1774
	<i>Cepaea nemoralis</i> LINNAEUS 1758
	<i>Discus rotundatus</i> MÜLLER 1774
	<i>Helicella obvia</i> MENKE 1828
	<i>Helix lucorum</i> LINNAEUS 1758
	<i>Helix lutescens</i> ROSSMÄSSLER 1837
	<i>Monachoides umbrosa</i> PFEIFFER 1828
	<i>Trichia hispida</i> LINNAEUS 1758
	<i>Zebrina detrita</i> MÜLLER 1774
SUCCINEACEA	<i>Succinea putris</i> LINNAEUS 1758
VERILIGINACEA	<i>Clausilia dubia</i> DRAPARNAUD 1805
ZONITACEA	<i>Arion ater</i> LINNAEUS 1758
	<i>Arion subfuscus</i> MÜLLER 1774
	<i>Limax maximus</i> LINNAEUS 1758

2. NADPH-diaforáz (NADPH-d) hisztokémia

• A központi idegdúcok preparálása

Kloroform narkózist követően izoláltuk a ganglionokat. Elkülönítettük a cerebrális és a postcerebrális ganglionokat. A preparálást sztereomikroszkóp alatt, 4 °C hőmérsékletű, 0,1 M-os Sørensen-féle foszfátpufferben (PBS, pH 7,4) végeztük. A ganglionokat ezután 3 órán keresztül rögzítettük 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben (PFA), 4 °C-on. A fixálást követően a mintákat PBS-ben mostuk, majd krioprotekció céljából 10 és 25% szacharózt tartalmazó PBS-be merítettük 6-6 órán keresztül. A ganglionokat Cryomatrixba™ (Shandon) ágyasztuk és folyékony nitrogénbe való merítéssel fagyasztottuk. Kriosztáttal 10 µm vékony metszeteket készítettünk, majd azokat zselatin-réteggel fedett tárgylemezekre vettük fel.

- **A tápcsatorna preparálása**

A teljes tápcsatornát PBS-ben izoláltuk, majd azt tűkkel rögzítve kifeszítettük és 4% PFA-ban fixáltuk 3 órán keresztül, 4 °C-on.

- **Hisztokémiai reakció**

A metszeteket és a tápcsatorna-preparátumokat 0,3% Triton-X 100-at tartalmazó 0,1 M-os Tris-HCl pufferrel (Tris TX, pH 8,1) mostuk. Ezután 1 mM β -NADPH-t (Sigma) és 0,2 mM tetrazóliumkéket (Sigma) adtunk a mintákhoz (mindkettőt Tris TX-ben oldottuk). A metszeteket 2 órán keresztül, a tápcsatorna-preparátumokat 40 percig szobahőmérsékleten, sötétben tartottuk, majd a reakciót többszöri PBS-sel történő mosással állítottuk le. Néhány mintát 2 mg/ml tripszint tartalmazó Tris-TX-ben 12 órán keresztül emésztettünk, majd a lizátum abszorbanciáját mértük 620 nm-en. Az abszorbanciaértéket 1 g szövetre vonatkoztattuk.

- **Módszer kontroll**

A fixált mintákat 5 percig 100 °C hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztük, majd ezután végeztük a NADPH-d hisztokémiai reakciót. A szövetekben ezután nem volt detektálható NADPH-d aktivitás.

Hogy kizárjuk a NADPH-dependens enzimeket, melyek felelősek lehetnek a pozitív reakcióért, különböző enzim-inhibitorok hatását is teszteltük. Dikumarol (10 μ M), a NADPH dehidrogenázok kompetitív inhibitora (Van Noorden és Butcher 1986), nátrium-azid (NaN_3 , 0,1 mM) a mitokondriális respiratórikus lánc enzimeinek kompetitív inhibitora (Mohr és Fewtrell 1990) csökkentette a nyálkahártyában jelentkező háttérfestődést, de nem érintette a neuronok NADPH-d aktivitását. A rögzítési idő 12 órára való meghosszabbítása azonban megszüntette a neuronális NADPH-d reaktivitást.

A szulfhidril-csoportok elektronodonorként szolgálhatnak a tetrazóliumsók redukciójához, így teszteltük 1 mM L-cisztein hatását. A NADPH-d reaktivitás intenzitását L-cisztein nem befolyásolta az idegsejtekben, de felerősítette a nyálkahártya festődését.

3. FMRFamid immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai eljárást a NADPH-d reakciót követően a központi ganglionok metszetein végeztük.

A nem specifikus jelölés csökkentésére a metszeteket 3 órán keresztül inkubáltuk 3% normál lószérummal, melyet 0,3% Triton-X 100-at tartalmazó PBS-ben (PBS-TX) hígítottunk. A mintákat többször PBS-TX-ben mostuk, majd 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk szintetikus FMRFamid ellen termelt poliklonális nyúl immunglobulinnal (DiaSorin, 1:500). Az inkubálást PBS-TX pufferes mosás követte, majd inkubálás biotin-jelölt pán-specifikus ló immunglobulinnal (Vector, 1:40). Az inkubálást 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten végeztük. Végül FITC-konjugált avidint (Vector, 1:100) adtunk a metszetekhez, melyet 1 óra inkubálás után pufferes öblítés követett. A mintákat glicerín-PBS keverékkel fedtük le.

Pozitív kontrollként *Helix lucorum* középbéli myentericus hálózatát használtuk, melynek immunjelölése megegyezett a referenciával (Hernádi et al. 1998).

4. A nitritkoncentráció mérése végpont kolorimetriás módszerrel

A NO vizes közegben oxigénnel és vízzel reagál, miközben nitrát és nitrit ionok is keletkeznek. Utóbbi ionok fotometriás eljárással jól mérhetőek (Marzinzig et al., 1997; Guevera et al., 1998; Borchering et al., 2000). Az általunk használt eljárásban az izolált ganglionok inkubációs közegének nitrit-tartalmát mértük, miután nitrát redukáz segítségével a keletkező nitrát-ionokat nitrit-ionokká alakítottuk.

A szövetminták nyérése

A kloroform narkózist követően PBS-ben izoláltuk a cerebrális és a postcerebrális dűcokat, illetve a tápcsatorna-szegmenseket (caecum, rectum). A ganglionok felszínéről agát dörzsmozsárban történő mechanikai fosztatással eltávolítottuk a perineuriumot. Ezután a szöveteket 100 µl kontroll- vagy tesztoldatba merítettük.

Tesztoldatok

Vizsgáltuk L-arginin (Sigma), N-ω-nitro-L-arginin (NOARG, Sigma), aminoguanidin (AG, Sigma), FMRFamid (Sigma) és amilorid-hidroklorid (Sigma) hatásait a szövetek nitrit-produkciójára.

Az L-arginin, NOARG, AG és FMRFamid-oldatokat PBS-ben, míg az amilorid hidroklorid-oldatokat 10% dimetilszulfoxidot (DMSO) tartalmazó PBS-ben készítettük. A tesztelt koncentrációk a következők voltak: L-arginin 1-20 mM, NOARG 1-2 mM, AG 10 mM, amilorid hidroklorid 7,89 mM, FMRFamid 0,2-3,34 mM.

Kontroll oldatok

Kontroll vizsgálatainkban a ganglionokat PBS-ben, vagy 10% DMSO-val kiegészített PBS-ben inkubáltuk.

A szövetek inkubálása és a nitrit-koncentráció mérése

Az izolált szöveteket a kontroll- vagy tesztoldatokba merítettük, majd rázógépre helyezve 20 vagy 40 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Az inkubációs közegből 50 µl mintát vettünk, majd azt mikrotiter lemezbe pipettáztuk. A mintákhoz 10 µl 2unit/ml *Aspergillus* nitrát-reduktázt (Sigma) és 10 µl 10 mM β-NADPH-t (Sigma) adtunk, amiket 7,2 pH-jú MOPS-glicin pufferben hígítottunk. A nitrát redukciót 20 percig, szobahőmérsékleten végeztük. Végül 100 µl Griess reagenst (Sigma) adtunk a mintákhoz. A minták abszorbanciáját 10 perc múlva 540 nm-en mértük mikrotiter-lemez leolvasó (iEMS Reader Labsystems) segítségével. Az abszorbancia-értékeket korrigáltuk a minták 50 µl-éhez adott 100 µl desztillált víz abszorbanciájával.

Referenciaként 0-150 µM NaNO₂ hígítási sort használtunk. A referencia abszorbancia-értékei alapján kalibrációs egyenest szerkesztettünk, a minták nitrit-tartalmát a kalibrációs egyenes felhasználásával,

extrapolációval állapítottuk meg. A minták legkisebb nitritkoncentrációja 3,5 μM , a legmagasabb 92 μM , a detektálási határ 0,2 μM volt. A mérést követően a ganglionok tömegét megmértük, és a nitritkoncentrációt 1 g szövettömegre vonatkoztatva, $\mu\text{mol/g}$ formában adtuk meg.

Validálás

A módszer validálásakor nátrium-nitroprusszid PBS-ben készített hígítási sorát használtuk. A nátrium-nitroprusszid molekuláiból vizes közegben NO válik szabaddá.

A hígítási sort (335,57; 167,78; 83,89 mM) mikrotiter lemezhez adtuk, majd 20 perc elteltével nitrát redukciót végeztünk (a fent leírt módon) végül mértük az oldatok nitrit-tartalmát, mely 0,11; 0,04; 0,03 μM értékeknek adódott.

Módszer kontroll

A nitrát-reduktáz aktivitását azáltal ellenőriztük, hogy PBS-ben oldott 25 μM koncentrációjú $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -oldatot 10 μl 1 unit/ml nitrát-reduktázzal és 10 μl 10 mM β -NADPH-val inkubáltuk 10 percig 25 °C hőmérsékleten. A Griess-reagens nem adott színreakciót $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -oldattal, azonban nitrát-redukciót követően az oldatban 12 ± 2 μM nitrit jelenlétét mutatta ($n=3$).

Az inkubációs közegek fehérjetartalma és a nitrát-reduktáz közötti interferencia lehetőségét is vizsgáltuk. A 25 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -oldat előbbiekben leírt redukcióját elvégeztük a mintákról levett inkubációs oldatokban is. Ekkor 10 ± 3 μM nitrit jelenléte volt kimutatható a redukció végén ($n=3$). Az inkubációs oldatok fehérjetartalmát Bradford reagenssel mértük. 100 μl Bradford reagenst 50 μl mintához, illetve 50 μl borjú szérumalbumin-standard oldatokhoz adtunk, majd az abszorbanciát 620 nm-en mértük mikrotiter lemez-leolvasóval. Az inkubációs közegek fehérjetartalma 5% alatt volt ($n=3$).

Mintasám

Minden kontroll és teszt vizsgálatot legalább három egyedből származó szöveten végeztünk el.

5. A tápcsatorna mozgási aktivitásának mérése

A tápcsatorna izomzata spontán mozgási aktivitást mutat, melyet az intrinsic ideghálózatok generálnak (Hernádi et al. 1998).

A kloroform narkózis után, Krebs-oldatban izolált tápcsatorna-szegmenseket (caecum és rectum) 10 ml-es szervkádakba merítettük (TSZ-04, Experimetria), melyeket Krebs-oldattal töltöttünk fel. A Krebs-oldat összetétele (mM): NaCl, 118; KCl, 4,7; CaCl_2 , 2,5; NaH_2PO_4 , 1,0; MgCl_2 , 1,2; NaHCO_3 , 24,9; EDTA, 0,004; aszkorbinsav, 0,11, glükóz 11,5 pH, 7,4. Az izomszegmensek végeit erőmérő karjaihoz rögzítettük (SG-10 Experimetria).

Az izometrikus tenzióváltozásokat 10 percig regisztráltuk Krebs-oldatban, illetve 1 mM L-arginint, vagy 1 mM NOARG-t tartalmazó Krebs-oldatban. Az összehúzódnások frekvenciáját és erejét (amplitudóját) értékeltük.

6. Statisztikai értékelés

A kvantitatív adatokat $\text{középérték} \pm \text{S.D.}$ formában adtuk meg. A kontroll és kezelt csoportok adatait a kísérleti elrendezéstől függően párosított vagy párosítatlan t -próbával hasonlítottuk össze, a változást szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

III. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE

Jelen disszertáció eredményeit a következő pontokban összegzem:

- (1) A NADPH-d hisztokémiai technika felhasználásával leírtuk a NOS-tartalmú idegsejteket és azok nyúlványrendszerének anatómiai viszonyait *Helix lucorum* központi idegrendszerében és számos Pulmonata csiga enterális ideghálózatában.
- (2) Mind a központi idegrendszerben, mind az enterális hálózatban L-arginin-függő, és NOS-inhibitorokra érzékeny nitrit-produkciót mértünk. Az L-arginin dependens és a NOS inhibitoraival redukálható nitrit-termelés csak a NADPH-d pozitív szövetekre volt jellemző, így a NOS aktivitás indikátorának bizonyult.
- (3) Anatómiai kapcsolódást találtunk NOS-tartalmú és FMRFamidot termelő centrális idegsejtek között. *Helix lucorum* nitrerg dűcsejtjeinek felszínét FMRFamidot felszabadító varikozítások érik el, melyek lehetővé teszik, hogy az FMRFamid transzmitterként befolyásolja ezen sejtek működését (NO szintézisét).
- (4) A központi dűcök intraganglionáris NOS-aktivitása FMRFamiddal fokozható volt, míg az ismert FMRFamid-receptor antagonistá amilorid-hidroklorid jelenlétében nem tapasztaltuk az FMRFamid NO-produkciót provokáló hatását. Ezáltal bizonyítottuk, hogy a gerinces idegrendszer NOS-tartalmú területein is jelen lévő neuropeptid, a NO-szintézist erőteljesen fokozó extracelluláris szignál.
- (5) Az enterális rendszer működését L-arginin és ismert NOS-inhibitorok egyaránt befolyásolták. A NO simaizomrelaxáns molekulaként vezérli a középbeli mozgási aktivitását.
- (6) *Helix lucorum* hipometabolikus dormáns állapotaiban az enterális NO-szintézis alig volt detektálható és L-arginin sem fokozta azt, noha a nitrerg enterális plexus topográfiája nem változott a hipometabolikus dormáns időszak alatt. A NO a dormancia alatt nem befolyásolta a tápcsatorna kontrakcióinak mintázatát. Mindez azt jelzi, hogy a NOS katalitikus aktivitásában egy eddig nem ismert, hosszútávú, de időszakos gátlás jelenik meg.

Munkánk elsőként igazolta egy neuropeptid lehetséges hatását az idegrendszer NO termelésére, és kibővítette az FMRFamid funkciójáról alkotott képet. Mivel mind a NO, mind az FMRFamid egyaránt konzervatív szignálmolekula ez evolválódó idegrendszerben, továbbá eloszlásuk nagyjából hasonló, kölcsönhatásuk nem zárható ki a gerincesek idegrendszerében sem.

Az enterális idegrendszerben megjelenő NOS-tartalmú hálózatok felépítése és a NO simaizomrelaxáló funkciója igen konzervatív a gerincesek körében. Jelen munkánkban egy hasonló topográfiájú és rendeltetésű enterális hálózatot írtunk le az evolúció korai fejlettségi állapotát reprezentáló állatfajokban, a szárazföldi tüdőscsigákban.

A tüdőscsigák számos biotóphoz adaptálódtak, így igen diverz csoportot alkotnak a gerinctelen állatvilágban. A nagyfokú diverzitás alkalmat teremtett arra, hogy az egyes csoportok képviselőiben összehasonlítsuk a nitrerg hálózat szerkezetét és működését, így következtetéseket vonhattunk le a nitrerg jelátvitel evolúciós jelentőségéről. Munkánk azt bizonyítja, hogy a nitrerg enterális transzmisszió az eurázsiai kontinensen elterjedt *Helix*-alkatúakban fejlődött ki, ám hiányzik az afrikai kontinensen élő testvércsoportjukból (*Achatinacea* család). Az evolúciósan legfiatalabb, erősen adaptálódó Zonitacea családból szintén hiányzik a nitrerg enterális hálózat. A nitrerg jelátvitel tehát nem mondható konzervatívnak a tüdőscsigák filogenezisében.

Az enterális nitrerg hálózat azonban igen jól alkalmazható modellnek bizonyult a NOS katalitikus aktivitásának tanulmányozásához. Különösen jelentős a nitrerg hálózat hosszú távú adaptációs képessége a dormáns állapothoz. Ellentétben korábbi leírásokkal, melyek a hibernált csigák központi idegdücaiban a NOS mRNS-ének alulexpresszióját figyelték meg és ezzel magyarázták a csökkent NO termelést (Pisu et al. 1999), saját megfigyeléseink szerint a NOS molekula változatlanul expresszálódik az enterális sejtekben, azonban szubsztrátkötése elvész, illetve aktivitása megszűnik. Az enzimaktivitás időleges gátlásának módja jelenleg tartó vizsgálataink tárgya, melynek során azt kívánjuk eldönteni, hogy a (1) NOS konformációváltozása, (2) valamely molekulaszakasz alulexpresszáltasága, vagy (3) egy modulátor kapcsolódása okozza a gátolt NO szintézist.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatómunkám lehetővé tételéért és elősegítéséért témavezetőmnek, DR. BÁNFALVI GÁSPÁRNAK mondok köszönetet. Jelen disszertáció előzményének tekinthető diákköri munkám támogatásáért köszönet illeti egykori témavezetőimet, DR. VARGA VINCÉT (Tamperei Állami Egyetem, Finnország), DR. SERFÓZÓ ZOLTÁNT (Debreceni Egyetem) és DR. ELEKES KÁROLYT (MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Tihany). A kísérletek végzésében nyújtott segítségükért és munkatársi közreműködésükért DR. SZENTMIKLÓSI JÓZSEFNEK (Debreceni Egyetem), DIÁKKÖRI HALLGATÓIMNAK és a DE TTK KÍSÉRLETI ÁLLATHÁZ MUNKATÁRSAINAK mondok köszönetet. A disszertáció előzetes bírálatát DR. HOLLÓSI GÁBOR és DR. JENEI ZSOLT végezte, tanácsait köszönöm.

A kutatást támogatta: PRCH Diákok a Tudományért Szakalapítvány, OTKA T 42762

IV. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

1. Rőszer T, Jenei Zs, Gáll T, Nagy O, Czimmerer Zs, Serfőző Z, Elekes K, Bánfalvi G (2004): A possible stimulatory effect on neural nitric oxide production in the central nervous system of *Helix lucorum* L. Brain Behav Evol 63:23-33 [IF: 1,68]
2. Rőszer T, Jenei Zs, Serfőző Z, Czimmerer Zs, Bánfalvi G (2004): Structural diversity of NADPH diaphorase reactive enteral networks in STYLOMMATOPHORA. Invert Biol 123(2) in press [IF: 1,03]
3. Rőszer T, Czimmerer Zs, Szentmiklósi AJ, Bánfalvi G (2004): Nitric oxide synthesis is blocked during dormant periods of the snail *Helix lucorum* L. Cell Tissue Res 316:255-262 [IF: 2,58]

[Első szerzős IF: 5,29]

Konferencia-előadások

1. Rőszer T. Enterális nitrerg szabályozás az evolúció korai szakaszában. Magyar Anatómus Társaság XI. Konferenciája, 2001. Június 14-16, Debrecen
2. Rőszer T. Anatomical and functional studies of FMRFamideergic and NOergic networks in the nervous systems of pulmonate gastropods. 10th Symposium in Invertebrate Neurobiology of ISIN, July 5-9 2003. Tihany

További közlemények

1. Rőszer T, Serfőző Z, Elekes K (2001): Neurochemical organization of the enteric nervous system of pulmonate snails: nitrergic and peptidergic networks. *Neurobiology Report Göttingen 2001*: 746, Georg-Thieme Verlag
2. Rőszer T, Serfőző Z, Elekes K (2001): Neurochemical characterization of the enteric nervous system of some freshwater and terrestrial snails (Gastropoda, Pulmonata). Acta Biologica Debrecina 23:71-73
3. Rőszer T, Kiss-Tóth É, Szentmiklósi AJ, Bánfalvi G: Seasonal periodicism of the enteric nitric oxide (NO) synthesis and its regulation by monoamines and nitric oxide synthase (NOS) cofactors in the snail, *Helix lucorum* Linnaeus. Invert Biol 124(1) (in press) [IF:1,03]

Tudományos konferenciák

1999 – 9th Symposium of the International Society of the Invertebrate Neuroscience, Tihany
2000 – International Brain research Organization Millennial Conference, Budapest
2001 – Magyar Idegtudományi Társaság VIII. Konferenciája, Szeged
2001 – 4th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen
2001 – XI. Magyar Anatómus Kongresszus, Debrecen
2001 – DE BTCS Szakmai Napok, Debrecen
2002 – IBRO-Magyar Idegtudományi Társaság IX. Konferencia, Debrecen
2002 – DE BTCS Szakmai Napok, Debrecen
2003 – Magyar Idegtudományi Társaság X. Konferenciája, Balatonfüred
2003 – ISIN 10th Conference, Tihany

Kötetben megjelent poszter-összefoglalók száma: 8

Egyetemi jegyzet

1. Rószér T. (szerk), Serfőző Z: PRACTICUM ZOOANATOMICUM-GYAKORLATI ÁLLATANATÓMIA, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen 2003, második kiadás 2004.
2. Bánfalvi G.: MOLEKULÁRIS- ÉS SEJTBiológia, Kossuth Egyetemi Kiadó, 2004. Illusztrációk: Serfőző J, Rószér T
3. Rószér T.: DINAMIKUS SZÖVETTAN, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 2004.

Tudományos elismerések, kitüntetések

1999 – A XXIV. OTDK Neurobiológia Szekciójának I. díja
2001 – A XXV. OTDK Neuroanatómia Szekciójának II. díja
2000, 2001, 2002 – Pro Renovanda Cultura Hungariae Alapítvány „Diákok a Tudományért” Szakalapítvány Ösztöndíja
2000, 2001, 2002 – Debreceni Egyetem Nyári Szakmai Ösztöndíja
2000, 2001 – Universitas Alapítvány Ösztöndíja
2001 – Pro Scientia Aranyérem
2001 – Fáy András Kutatási Ösztöndíj
2002 – Debreceni Egyetem Természettudományi Kar Dékáni Dicséret

VI. HIVATKOZÁSOK

1. Bernocchi G, Vignola C, Scherini E, Necchi D, Pisu MB (1998) Bioactive peptides and serotonin immunocytochemistry in the cerebral ganglia of hibernating *Helix aspersa*. J Exp Zool 280:354-367
2. Borcharding H, Leikefeld S, Frey C, Diekmann S, Steinrucke P (2000) Enzymatic microtiter plate-based nitrite detection in environmental and medical analysis. Anal Biochem 282:1-9
3. Cooke IRC, Edwards SL, Anderson CR (1994) The distribution of NADPH diaphorase activity and immunoreactivity to nitric oxide synthase in the nervous system of the pulmonate mollusc *Helix aspersa*. Cell Tissue Res 277:565-57
4. Cottrell GA (1997) The first peptide gated ion channel. Exp Biol 18:2377-2386
5. Dawson VL, Dawson TM (1995) Nitric oxide: actions and pathological roles. Neurosci 1:7-18
6. Elofsson R, Carlberg M, Moroz L, Nezlin L, Sakharov D (1993) Is nitric oxide (NO) produced by invertebrate neurones? NeuroReport 4:279-282
7. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Golabek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Clin Chim Acta 274:177-188
8. Hernádi L, Terano Y, Muneoka Y, Kiss T (1995) Distribution of catch-relaxing peptide (CARP)-like immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of *Helix pomatia*. Cell Tissue Res 280:335-348
9. Hernádi L, Erdélyi L, Hiripi L, Elekes K (1998) The organization of serotonin-, dopamine-, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia*. J Neurocytol 27:761-775
10. Huang BS, Leenen FH (2002) Brain amiloride-sensitive Phe-Met-Arg-Phe NH₂-gated Na⁺channels and Na⁺-induced sympatoexcitation and hypertension. Hypertension 39:557-561
11. Jacklet JW (1997) Nitric oxide signalling in invertebrates. Invertebrate Neurosci 3:1-14
12. Kaufmann W, Kerschbaum HH, Hauser-Kronberger C, Hacker GW, Hermann A (1995) Distribution and seasonal variation of vasoactive intestinal (VIP)-like peptides in the nervous system of *Helix pomatia*. Brain Res 695:125-136
13. Martínez A (1995) Nitric oxide synthase in invertebrates. Histochem J 27:770-776
14. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Beger HG, Morris SMJr, Bruckner UB (1997) Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, S-nitrosothiols. Nitric Oxide 1:177-189

15. Mayer B, Andrew P (1998) Nitric oxide synthase: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Nauny-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 358:127-133
16. Michaelidis B, Loumbourdis NS, Kapaki E (2002) Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix lucorum* and lizard *Agama stellio stellio* during hibernation. *J Exp Biol* 205:1135-1143
17. Mohr FC, Fewtrell C (1990) The effect of mitochondrial inhibitors on calcium homeostasis in tumor mast cells. *Am J Physiol.* 258:217-226
18. Nakos G, Gossrau R (1994): When NADPH diaphorase (NADPH-d) works in the presence of formaldehyde, the enzyme appears to visualize selectively cells with constitutive nitric oxide synthase (NOS). *Acta Histochem* 96:335-43
19. Nieto-Fernandez FE, Mattocks D, Cavani F, Salzet M, Stefano GB (1999) Morphine coupling to invertebrate immunocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 123:295-299
20. Pisu MB, Conforti E, Fenoglio C, Necchi D, Scherini E, Bernocchi G (1999) Nitric oxide-containing neurons in the nervous ganglia of *Helix aspersa* during rest and activity: immunocytochemical and enzyme histochemical detection. *J Comp Neurol* 28:274-284
21. Sanchez-Alvarez M, Leon-Olea M, Talavera E, Pellicer F, Sanchez-Islas E, Martinez-Lorenzana G (1994) Distribution of NADPH-diaphorase in the periesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. *Neurosci Lett* 169:51-55
22. Van Noorden CJ, Butcher RG (1986) A quantitative histochemical study of NADPH-ferrihemoprotein reductase activity. *Histochem J* 18:364-370
23. Vignola C, Fenoglio C, Scherini E, Bernocchi G (1995) The cerebral neurons of *Helix aspersa* during hibernation. Changes in the cytochemical detection of calmodulin, cytoskeletal components and phosphatases. *Tissue Cell* 27:185-196

RÓSZER TAMÁS
egyetemi tanársegéd

Debreceni Egyetem • Természettudományi Kar
Állatanatómiai és Élettani Tanszék

4010 Debrecen, Pf. 15.
Tel.: 52 316 666 /2026
Fax: 52 512 900 /3008
E-mail: roszer@freemail.hu