



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

Doktori (PhD) értekezés

RŐSZER TAMÁS

Debreceni Egyetem

Természettudományi Kar • Állatanatómiai és Élettani Tanszék

Debrecen, 2004

*Ezen értekezést, a Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola
keretében, 2002-2004 között készítettem a Debreceni
Egyetem Természettudományi Kar doktori (PhD)
fokozatának elnyerése céljából.*

RŐSZER TAMÁS

doktorjelölt

Debrecen, 2004. április 21.

*Tanúsítom, hogy Rőszér Tamás doktorjelölt 2002-2004
között a Biológia Doktori Iskola keretében
irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt
eredmények a jelölt önálló alkotó tevékenységével jöttek
létre. Az értekezés elfogadását javaslom.*

DR. BÁNFAI GÁSPÁR

témavezető

Debrecen, 2004. április 21.

*A mélység azt mondja: Nincsen az bennem;
a tenger azt mondja: én nálam sincsen.
Jób 28:14*

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések

5. oldal

I. Általános bevezetés

7. oldal

II. Kérdésfelvetés

20. oldal

III. A kísérleti rendszer bemutatása

26. oldal

IV. Anyagok és módszerek

33. oldal

V. Eredmények

44. oldal

VI. Összegzés

70. oldal

VII. Hivatkozások

88. oldal

VIII. A jelölt tudományos tevékenysége

111. oldal

IX. Summary

116. oldal

RÖVIDÍTÉSEK

AG	aminoguanidin-bikarbonát
ARG	L-arginin
DMSO	dimetil-szulfoxid
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FMN	flavin-mononukleotid
FMRFamid	molluscan cardioexcitatory tetrapeptide, Phe-Met-Arg-Phe-amid
NAD	nikotinamid-dinukleotid
NADPH	redukált nikotinamid-dinukleotid- foszfát
NADPH-d	NADPH-diaforáz
NO	nitrogén-monoxid
NOARG	N- ω -nitro-L-arginin
NOS	nitrogén-monoxid-szintetáz, eNOS: endotheliális, iNOS: indukálható, nNOS: neuronális NOS
PFA	paraformaldehid
PBS	0,9% NaCl-ot tartalmazó, 0,1 M foszfát puffer, pH 7,4
Tris-TX	0,3 % Triton X-100-zal kiegészített 0,1 M Tris puffer

Az anatómiai nevek írásmódjában az Orvosi helyesírási szótárat (Fábián P., Magasi P. szerk., Akadémiai Kiadó 1992), illetve az idézett szakirodalmat követtük. A helyzet-, illetve irányjelölő latin kifejezéseket magyar raggal és ékezetrel láttuk el, ha azok magyar kifejezések jelzőiként szerepelnek.

I. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

I. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

1. A nitrogén-monoxid mint szignálmolekula működik az élő szervezetben

Az 1990-es években vált ismertté, hogy az egyszerű szerkezetű, gáznemű nitrogén-monoxid (NO), jelátvivő molekula szerepét tölti be egyes sejtek közötti kémiai információátvitelben (Dawson és Dawson 1995, Olgart et al. 2000). A ma ismert, kevés számú gázjellegű szignálmolekula közé tartozik az etilén, a hidrogén-szulfid (H_2S), a szén-monoxid (CO) és a NO (Boehning és Snyder 2003). Az etilén jelátvivő szerepe az első soksejtű állati szervezetekre, a szivacsokra (Porifera) korlátozódik. Az etilén a szivacsok sejtjeinek intracelluláris kalcium-szintjét, illetve egy transzkripció faktor, valamint egy kalcium-kalmodulin függő protein kináz expresszióját növeli meg (Kresko et al. 1999), miáltal gátolja a szivacstelep sejtjeinek apoptózisát (Perovic et al. 2001). A CO és a H_2S a gerincesek idegrendszerének neuronjaiban képződnek és neurotranszmitterként működnek (Nathanson et al. 1995, Eto et al. 2002). A NO mind a gerincesek, mind a magasabbrendű gerinctelen állatok

idegrendszeri működéseiben szerepet kap (Elofsson et al. 1993, Dawson és Dawson 1995, Martínez 1995, Jacklet 1997).

A célsejtbe diffundált NO jelenleg ismert legfontosabb célmolekulája a citoplazmában található guanilát-cikláz. A szolubilis guanilát-cikláz hem-csoportjához kötődik, ezzel az enzim aktivitását fokozza, miáltal a sejten belüli ciklikus-guanozin-monofoszfát (cGMP) koncentrációját növeli. A cGMP mint második hírvívő, különböző szignalizációs utakat indíthat el, melyekben elsődleges szerepet kap a cGMP-függő ioncsatornák, illetve a cGMP-függő protein-kinázok aktiválása (Waldman és Murad 1987, de Vente et al. 1998).

2. A NO bioszintézisét nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) végzi. A NOS eloszlása enzimhisztokémiai módszerrel is vizsgálható

A NO bioszintézisét a több izoformában megjelenő nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) enzim végzi (Enzyme Commission száma: 1.14.13.39). A NOS enzimek molekulaszerkezetének közös tulajdonsága, hogy két globuláris alegységből (130-150 kDa), a dimer szerkezetű oxigenáz, és a monomer reduktáz doménből állnak. A két domént egy helikális, felxibilis szakasz köti össze. A reduktáz domén szerkezete rokon a citokróm P-

450 reduktázával, FAD-ot, FMN-t és NADPH-t köt. Az oxigenáz domén hem-csoportot tartalmaz, tetrahidrobiopterin kötésére képes. A katalitikus központ az oxigenáz doménben helyezkedik el. A reduktáz domén NADPH redukcióját katalizálja, ezáltal elektrondonorként szolgál az oxigenáz domén számára. A két domént egymáshoz kapcsoló flexibilis molekulaszakasz kalmodulin-kötésre képes (Rozhkova et al. 2002).

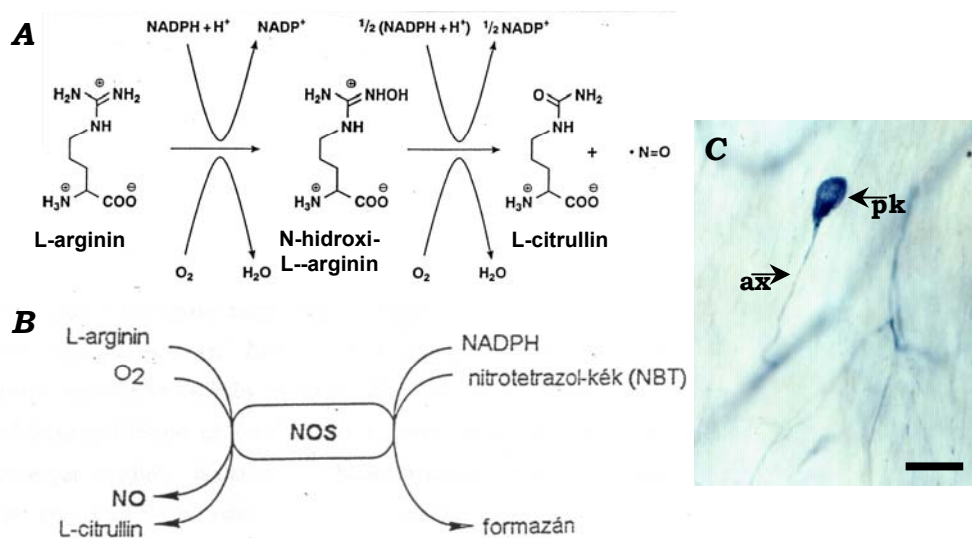
Az egyes izoformák adott szövettípusra jellemzők, így szöveti eloszlásuk szerint, az emlősök szervezetében ismerünk neuronális (nNOS), endotheliális (eNOS) és indukálható (iNOS) izoformákat. A nNOS és az eNOS aktivitásához kalcium-kalmodulin komplexek kötődése szükséges, így ezen NOS izoformák katalitikus aktivitását az intracelluláris kalcium-szint változása szabályozhatja.

A gerincesek központi NO-termelő (nitrerg) neuronjaiban a NOS nagyrészt neuronális (nNOS), ritkábban endotheliális (eNOS) izoformája van jelen (Dinerman et al. 1994, Dawson 1995), mégpedig konstitutív módon. A microglia és az astrocyta sejtek idegi sérülések hatására indukálható (iNOS) izoformát expresszálnak (Mainhofner et al. 2000), mely a szervezet mononukleáris fagocita rendszerének aktivált tagjaira is jellemző (Dawson és Dawson 1995, Kröncke et al. 1997).

A NOS enzimek L-arginin L-citrullinná való átalakulását katalizálják, miközben NO is képződik. A konverzió β -NADPH, FAD, tetrahidrobiopterin, FMN, Ca^{2+} -kalmodulin kofaktorokat és molekuláris oxigént igényel. A nNOS és eNOS működését Ca^{2+} -kalmodulin komplexek kapcsolódása indítja el, így ez a lépés az enzimműködés, következésképpen a NO-termelés fontos regulátora. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} -szint emelkedése Ca^{2+} -kalmodulin komplexek kialakulását eredményezi, melyek a NOS molekulájához kötődve annak arginin-citrullin konvertáló képességét fokozzák. A NOS-tartalmú sejtek szabad Ca^{2+} -szintjének szabályozása tehát a NO termelés mértékét is meghatározza (Mayer és Andrew 1998). Az emlősök központi idegrendszerében a nNOS aktiválásához szükséges intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedést glutamát váltja ki, NMDA-receptor ioncsatornák megnyílásán keresztül (Garthwaithe et al. 1988, Dawson és Dawson 1995). Astrocytákban az $\alpha 7$ (bungarotoxin-érzékeny) nikotinos acetilkolin receptorok ingerlése is hozzájárul a NO-szintézis fokozásához (Adams et al. 2000).

Az egyes izoformák oxigenáz doménjének N-terminálisában található szekvenciakülönbségek lehetővé teszik a nNOS, az eNOS, és az iNOS immuncitokémiai technikával történő elkülönítését és szöveti detektálását (Dawson et al.

1998). A nNOS idegrendszeri eloszlását immunhisztokémiai módszerek mellett a NADPH-diaforáz (NADPH-d) enzimhisztokémiai eljárás alkalmazásával is meghatározhatjuk. A NOS gyenge aldehides fixálást követően, megfelelően kontrollált körülmények között, színes termék képződéséhez vezető reakcióba vihető. A rögzítés során az enzim reduktáz része működőképes marad, így a szövetmintához adott tetrazóliumsót (tetrazóliumkék) vízben nem oldódó formazánná redukálja, mely végül kék színű diformazánt képez (1. ábra).



1. ábra: (A) A NOS által katalizált L-arginin/L-citrullin konverzió lépései, (B) a NADPH-d hisztokémiai reakció elve és (C) egy NADPH-d pozitív neuron felvétele *Helix lucorum* enterális hálózataiból. ax: axon, pk: perikaryon, mérték: 50 μm (Szerző felvétele).

3. A NOS eloszlása a gerinces idegrendszerben

A prefrontális cortex, a hippocampus, több vegetatív magcsoport, így a rostrális ventrolaterális medulla, a locus coeruleus, az area postrema, az organum vasculosum laminae terminalis, valamint a nucleus tractus solitarii, a nucleus supraopticus és a nucleus amygdalae mind tartalmaznak NO termelésére képes idegsejteket (Bredt et al. 1991, Dinerman et al. 1994, Chikada et al. 2000). A NO egyrészt közvetlenül csökkenti az agyi kapillárisokban uralkodó vérnyomást (Kirkeby et al. 2000), másrészt nyúltvelői neuroncsoportokból induló vegetatív pályák aktivitását befolyásolja. Ezáltal kardiovaszkuláris és vegetatív működések szabályozásában vesz részt (Chikada et al. 2000).

A perifériás vegetatív idegrendszer nem adrenerg-nem kolinerg hálózataiban immunhisztokémiai módszerekkel kimutatható nNOS jelenléte. A nNOS immunreaktív neuronok egyúttal NADPH-d reaktivitást is mutatnak (Belai et al. 1993, Balaskas et al. 1995, Olsson és Gibbins 1999, Lamanna et al. 1999).

A különböző gerinces osztályok képviselőinek gastrointestinalis idegrendszerében meglehetősen konzervatív topográfiájú nitrerg hálózat van jelen. Egyrészt a nervus

vaguson keresztül érkeznek nitrerg rostok a tápcsatorna felső harmadához (Shuttlewerth et al. 1991, Belai et al. 1993), így az oesophagus izomzatához; másrészt intrinsic nitrerg gátló motoneuronok alkotnak hálózatot az enteralis idegrendszerben. A plexus myentericusban és a plexus submucosusban megjelenő NADPH-d reaktív és nNOS-immunreaktív hálózat innerválja a tápcsatorna körkörös, kisebb részben hosszanti izomzatát, valamint a lamina muscularis mucosae-t (Ward et al. 1992, Li et al. 1994, Balaskas et al. 1995, Olsson és Gibbins 1999, Villani 1999, Mirabella et al. 2000).

Az enteralis ideg-izom kapcsolatokban a NO - cGMP útvonal aktiválódása a sarcoplazmás retikulum, valamint a sejtmembrán kalcium-csatornáinak inaktiválása révén a viscerális simaizomsejtek intracelluláris szabad kalcium-szintjének csökkenéséhez vezet (Shuttlewerth et al. 1991). A csökkent kalcium-szint a kontraktilis apparátust relaxált állapotban tartja. Ezáltal képes a NO fenntartani a cardia, az Oddi-sphincter dilatatív tónusát (Fehér és Montague 1994) és előidézni a musculus sphincter ani internus reflexes relaxációját (Jiang et al. 2000). A polarizált enterikus reflexben a NO caudális irányú simaizomrelaxációt hoz létre, így szerepe van a perisztaltikus mozgás szervezésében (Karila et al. 1995). Az emlős tápcsatorna spontán motoros tevékenységét is képes

befolyásolni azáltal, hogy a gyomor antrumából induló spontán kontrakciós hullámok közötti intervallumok hosszát megnöveli (Grossi et al. 1996).

A NO-mediált simaizomrelaxáció a gerinces tápcsatorna néhány szakaszán a Cajal-féle interstitiális sejtek közreműködését is igényli. A Cajal-sejtek NADPH-d aktivitást nem mutató eNOS-t tartalmaznak (Xue et al. 1994). Az intestinum simaizomsejtjeiben RT-PCR technikával és Northern-analízis segítségével eNOS azonosítható, ami alapján feltételezhető, hogy a Cajal-sejteken kívül a simaizomsejtek is lehetnek NO forrásai (Teng et al. 1998). A simaizomsejtek relaxációját valószínűleg a NO felszabadulás facilitálásán keresztül éri el (Young et al. 2000).

A NO a neuro-neuronális átvitelben is működik transzmitterként az enterális rendszerben. A gyomor mechanoreceptoraiából felszabaduló NO módosítja a plexus celiacus kolinerg transzmisszióját, ezzel a NO generalizált enterális reflexek kiváltásában is szerepet kap (Quinson et al. 2000). NOS jelenlétét azonosították a szimpatikus ganglionokhoz futó, ún. intestinofugális rostokban is. Az emlősök gyomrának fősejtjeiben, mucintermelő és endokrin sejtjeiben (Garcia-Vitoria et al. 2000) sajátos módon nNOS van jelen. A gyomor hámrétegében termelődő NO funkciója még

ismeretlen, de feltételezhetően parakrin módon befolyásolja a nyálkahártya szekretoros, illetve endokrin működését.

4. A neurotranszmitter NO a gerinctelen idegrendszerben

Összehasonlító vizsgálatok szerint a NO-cGMP szignalizációs út a gerinctelen állatvilágban is jelen van. NADPH-d reaktív, NO-t generáló idegsejteket ismerünk hengeresférgek (Walker et al. 1995), gyűrűsférgek (Leake et al. 1995), rákok (Jacklet 1997), rovarok (Gibson és Nighorn 2000, Ott et al. 2000, Zayas et al. 2000), pókok (Meyer et al. 1994), csigák (Moroz et al. 1993, Elofsson et al. 1993), lábasfejűek (Palumbo et al. 1999) idegrendszerében, melyek főként a központi ganglionokban csoportosulnak.

Csigák NADPH-d reaktív kemoreceptor szervei, a rhinophor, az osphradium és a bőr primer szenzoros neuronjai NO-t képeznek, a felszabaduló NO részese csigafajok (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnails*, *Limax maximus*) kémiai érzékelésének (Gelperin 1994, Moroz et al. 1995). A fejlábú *Sepia officinalis* retinájában ugyancsak ismertek NADPH-d reaktív sejtek (Palumbo et al. 1999).

A NO szerepet kap bizonyos viselkedési mintázatok kialakításában is, mivel kiváltja több csigafaj (*Lymnaea*

stagnalis, *Helix aspersa*) táplálékfelvevő mozgásait vezérlő központi jelmintázat generáló sejtek aktiválódását (Elphick et al. 1995, Kobayashi et al. 2000).

A NO-cGMP útvonalnak jelentőséget tulajdonítanak gerinctelen fajok, így *Helix aspersa* és *Sepia officinalis* tanulási folyamatában is, azonban szerepe ezen folyamatban részleteiben nem ismert (Cooke et al. 1994, Palumbo et al. 1999).

5. A NOS katalitikus aktivitását és expresszióját szabályozó szignálok

A neuronális NOS (nNOS), melyet főként neuronok és astrocyták expresszálnak, Ca^{2+} -dependens módon katalizálja az L-arginin-L-citrullin konverziót, miközben NO szabadul fel. Neuronokban a foszforilált, inaktív nNOS a posztszinaptikus denzitásokhoz kapcsolódik, ahonnan Ca^{2+} -kalmodulin kötődés hatására válik le és jut a citoplazmába (Dawson et al. 1998).

Az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedését NMDA-típusú glutamát receptorok nyitódása, másrészt $\alpha 7$ nikotinos receptorok aktiválódása idézi elő (Mayer és Andrew 1998).

A prefrontális cortex, valamint a hippocampus NOS-tartalmú gátló neuronjain $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin-receptorok

jelennek meg (Csillik et al. 1998, Adams és Freedman 1997). Az $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin-receptorok aktivációja hozzájárul az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedéséhez, ami NO termelődéshez vezet (Adams et al. 2000). Az emberi hippocampus és az entorhinális cortex astrocytáiban az $\alpha 7$ nikotinos receptorok túlzott expressziója miatt felerősödik a NOS katalitikus aktivitása, ami citotoxikus mértékű NO felszabaduláshoz vezet és a neuronok elhalását okozza Alzheimer kórban és Lewy-testes dementiában (Teaktong et al. 2003). Az $\alpha 7$ nikotinos receptorok megtalálhatóak a szimpatikus dúcokban is, ahol aktivációjuk szintén NO felszabadulást okoz (Briggs 1992, Haberberger et al. 2003).

Az enterális idegrendszerben a NOS mRNS-ének expressziója fokozható nikotinos acetyl-kolin receptorok izgatása révén. A receptor aktiváció egy protein kináz-C útvonalon keresztül vezet a megnövekedett génexpresszióhoz (Nakamura et al. 1998).

Az endotheliális NOS (eNOS), mely szintén Ca^{2+} -függő, főként az erek endotheliumában, vagy a perivascularis szimpatikus idegvégződésekben jelenik meg, de a hippocampus piramis-sejtjeiben, az intestinum simaizomzatában és Cajal-sejtjeiben is jellemző (Dinerman et al. 1994, Xue et al. 1994, Mayer és Andrew 1998, Teng et al. 1998). A NO-szintézist

acetil-kolin váltja ki: az endothel-sejteken muszkarinos, míg a perivascularis idegrostokon nikotinos acetil-kolin receptorok találhatóak (Ayajiki et al. 1994, Elhusseiny és Hamel 2000, Si és Lee 2002).

A gerinctelenek NOS tartalmú sejtjeiben a NOS aktivitását a legtöbb esetben szintén az intracelluláris kalcium-szint növekedése váltja ki. Rovarok neuronjaiban a NO szintézisét és a NOS intracelluláris eloszlását a kalcium-koncentráció befolyásolja (Müller és Bicker 1994). A NO-felszabadulást acetil-kolin fokozza (Zayas et al. 2002). *Sepia officinalis* retinájának NO-termelő sejtjein NMDA-típusú csatornák találhatóak, melyek vélhetően hozzájárulnak a NOS aktivitás fokozásához (Palumbo et al. 1999). *Mytilus edulis* szabad testüregi sejtjeinek NO szintézise kalcium-tranziensek hatására erősödik, melyek különböző opiátokkal válthatók ki (Nieto-Fernandez et al. 1999). A csigák központi idegrendszeréből izolált NOS molekula működése azonban nem egyértelműen kalciumfüggő (Moroz et al. 1996, Huang et al. 1997).

II. KÉRDÉSFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

II. KÉRDÉSFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A nitrogén-monoxidot, 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 [acetil-kolin és glutamát szerepe a nNOS működésének serkentésében, morfinszármazékok és glutamát NO szintézist provokáló hatása egyes gerinctelenekben] 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 értekezésben a NOS neurokémiai szabályozását alternatív kísérleti rendszerben, szárazföldi tudóscsigák

(Pulmonata, Gastropoda) központi idegdúcaiban illetve enterális ideghálózataiban vizsgáltuk.

A tüdőcsiga *Helix* fajok központi idegrendszerében számos neurotranszmitter, így különböző monoaminok (Hernádi et al. 1998, Hernádi és Elekes 1999), gerinctelenekre jellemző neuropeptidek (Elekes és Nässel 1990, 1994, Elekes et al. 1994, 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 (Elekes és Nässel 1990).

Az intraganglionáris FMRFamiderg végződés 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 kérdésfelvetésnek megfelelően, a disszertáció első részében *Helix lucorum* központi idegrendszerében mutatom be a NO-t termelő idegsejtek eloszlását, NOS aktivitását és anatómiai kapcsolódását az FMRFamidot termelő idegsejtekhez. Leírom az FMRFamid lehetséges hatását a neuronális NO szintézisre.

A NOS-tartalmú idegsejteket NADPH-d hisztokémiai technikával, míg az FMRFamidot immunhisztokémiával jelenítettük meg. Az izolált idegdúcok NOS-aktivitását a termelődő 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.

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

Célkitűzés (2)

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

A disszertáció második részében a Pulmonata alosztály különböző rokonsági köreit reprezentáló csigafajokban térképezem fel az enterális idegrendszer NADPH-d reaktív, tehát NOS-t tartalmazó idegi elemeit és a NO szintézis lehetőségét vizsgálom. A NO funkciójának elemzésére farmakológiai tesztekben mutatom be a NOS-szubsztrát L-arginin és ismert NOS-gátlók hatását a tápcsatorna motoros működésére.

Célkitűzés (3)

A szárazföldi tüdőscsigák annuális életciklusára jellemző, hogy kedvezőtlen környezeti feltételek mellett hipometabolikus nyugalmi állapotba (nyári estivatio és téli hibernatio) kerülnek, miközben az idegrendszer működése jelentősen átalakul. Az axonális transzport lelassul, számos neurotranszmitter (monoaminok, neuropeptidek, 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.

III. A KÍSÉRLETI RENDSZER BEMUTATÁSA

III. A KÍSÉRLETI RENDSZER BEMUTATÁSA

1. A központi idegrendszer szerkezete tüdőcsigákban

A központi idegrendszert az oesophagust gyűrűként körülfogó ganglioncsoport alkotja. A ganglionok közül a páros agydúc (ganglion cerebrale) a legnagyobb, mely az oesophagus dorsális felszínén helyezkedik el. A cerebrális dúcok három anatómiai és működési egységre, a procerebrumra, a mesocerebrumra és a metacerebrumra tagolódnak (2. ábra).

A dúc szenzoros bemeneteket fogad a tapogatók, a szemek és a bőr érzékszervei felől, motoros kimenetet ad az izomrendszerhez, illetve befolyásolja a többi dűcből induló motoros működéseket (Bullock és Horridge 1965, Kerkut és Walker 1975). A procerebrum elsősorban a kémiai érzékelés központja, míg a mesocerebrumhoz a reprodukív működések köthetőek (Chase 2000).

Az oesophagustól ventrálisan a postcerebrális dűckomplexum található, melyet páros connectivum kapcsol a cerebrális dűckokhoz. A dűckomplexum a páros pleurális, parietális, pedális és a páratlan viscerális dűckokból áll. A dűckokat vékony kollagénrostos kötőszövet borítja, az ún.

perineurium, mely diffúziós gátat képez a haemolympha felől (Luchtel et al. 1997).

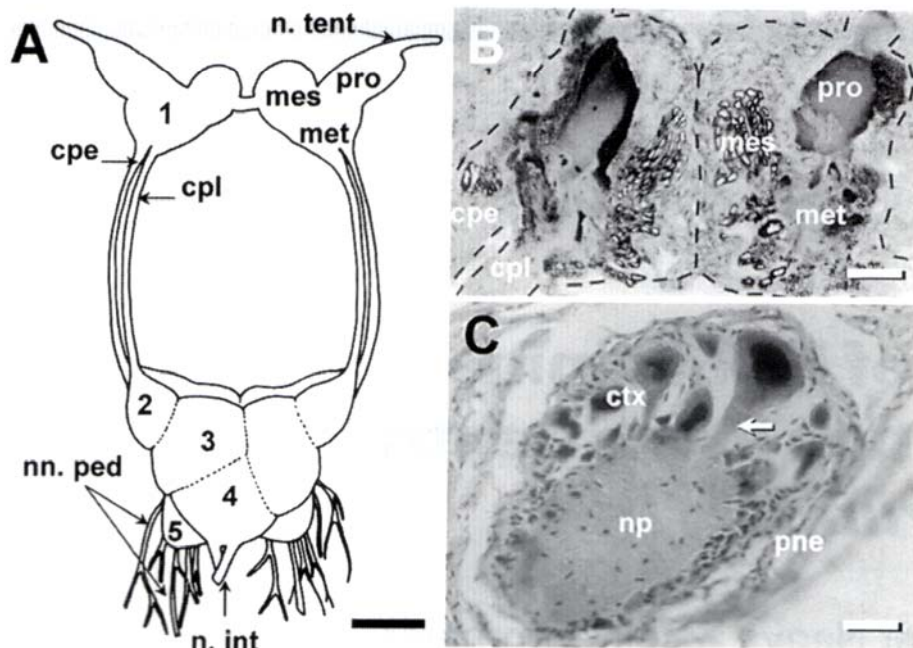
A neuronok sejttestei felszínes helyzetűek, a cerebrális dúcban többretegű kérget alkotva rendeződnek. Az axonok a dúcok középpontja felé irányulnak, majd ott neuropilt alkotnak. A neuropilben az axonok közötti kémiai jelátvitel zajlik.

2. A vegetatív idegrendszer felépítése tüdőcsigákban

A vegetatív idegrendszert két idegdúc, a szájüreg boltozatán elhelyezkedő perifériás dúc (ganglion buccale) és a ganglion viscerale idegei, valamint a tápcsatorna ideghálózatai alkotják.

A száj-garatüreg szenzoros rostjai főként a ganglion buccale neuropil régiójába vetülnek. A terület ugyaninnen nyeri motoros rostjait is a nervi pharyngeales ágain keresztül. A nervus gastricus anterior et posterior a nyelőcső és a gyomor izomzatához tartanak. A nervus glandulae salivaris rostjai a páros nyálmirigyek parenchymájában ágaznak el gazdagon. Az intestinum és a glandula media intestini idege a nervus intestinalis, mely a ganglion visceraléből ered. A rectum területét a nervus analis innerválja (Bullock és Horridge 1965).

A tápcsatorna teljes hosszában két párhuzamos ideghálózat jelenik meg: az izomrétegekben elhelyezkedő myentericus plexus, valamint a nyálkahártya alatt futó submucosális plexus (Ábrahám 1983). A két plexus gazdag hálózata főként motoneuronokból építkezik, bár sensoros és szekretoros végződések (Alba et al. 1988) is fellelhetők. A hálózattal anasztomizálnak és benne szétterjednek a nervus gastricus anterior et posterior, valamint a nervus intestinalis idegrostjai (Bullock és Horridge 1965).

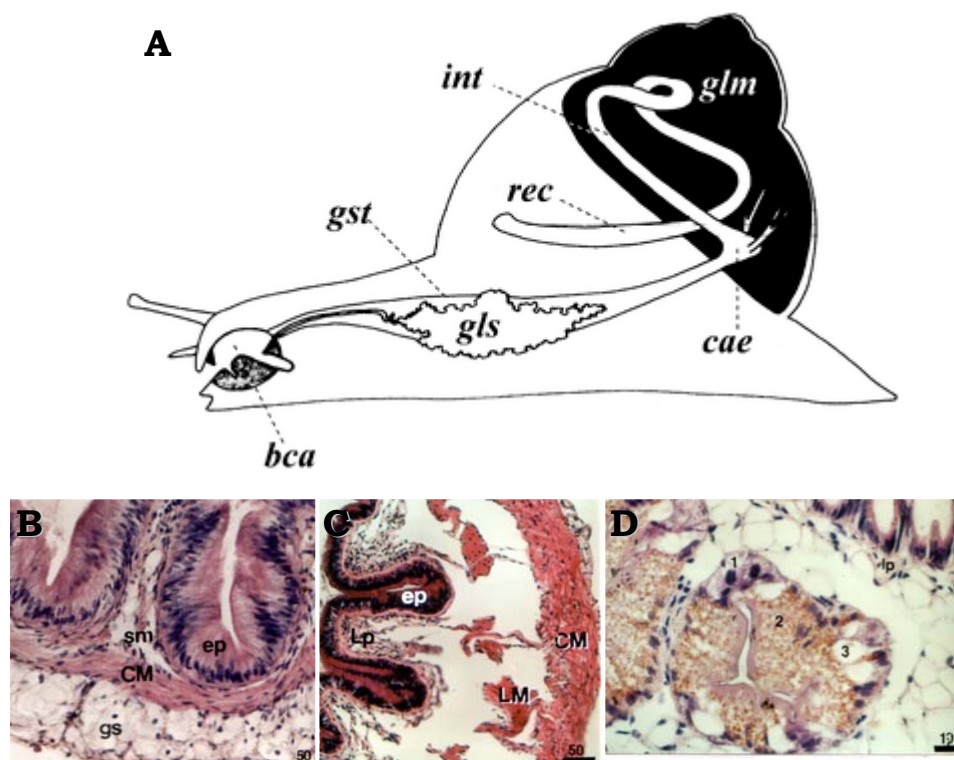


2. ábra: A központi idegrendszer felépítése

A: A központi ganglionok és a kilépő fő idegtörzsek sémája (**1:** bal ganglion cerebrale, **2:** bal ganglion pleurale, **3:** bal ganglion parietale, **4:** ganglion viscerale, **5:** bal ganglion pedale, **pro:** procerebrum, **mes:** mesocerebrum, **met:** metacerebrum, **cpe:** cerebropedális connectivum, **cpl:** cerebropleurális connectivum, **n.tent:** n. tentacularis, mérték: 0,5 mm).

B: A ganglion cerebrale horizontális metszete (*Helix lucorum*, NADPH-d festés, mérték: 200 μ m, **pro:** procerebrum a n. tentacularis eredésével, **mes:** mesocerebrum, **met:** metacerebrum, **cpe:** cerebropedális connectivum, **cpl:** cerebropleurális connectivum).

C: A jobb parietális ganglion horizontális metszete (*Helix lucorum*, hematoxin-eozin, R.T. készítménye, mérték: 65 μ m, **ctx:** cortex, **np:** neuropil, **pne:** perineurium, a nyíl egy unipoláris neuron axoneredését jelzi). Röszer et al. (2004) *Brain Behav Evol*:63, 24.



3. ábra: A tápcsatorna felépítése

A: Az emésztőrendszer szerveinek sémája (*Helix lucorum*)

bca: száj-garatüreg, **gst:** gaster, **gls:** glandula salivaris, **cae:** caecum a középbéli mirigy vezetékével, **glm:** középbéli mirigy (glandula media intestini), **int:** intestinum, **rec:** rectum

Röszer et al. (2004) *Cell Tissue Res* 316:255-262

B-C-D: Az egyes tápcsatorna szakaszok szövettana (hematoxilin-eozin, R.T. készítményei) **B:** gaster, **ep:** epithelium, **sm:** submucosa, **CM:** circuláris izomréteg, **gs:** a glandula salivaris parenchymája, egység: 50 µm, **C:** caecum, **ep:** epithelium, **Lp:** lamina propria, **LM:** longitudinális izomréteg, **CM:** circuláris izomréteg, egység: 50 µm, **D:** glandula media intestini, **1:** emésztőenzimeket termelő sejt, **2:** abszorptív sejt, **3:** kalcium-raktározó sejt, egység: 10 µm

3. A kísérleti rendszer tulajdonságai

A ganglionok idegsejtjeinek szuperficiális helyzete és nagy mérete (átlagosan 50-250 μm) megkönnyíti anatómiai azonosításukat és szignalizációs folyamataik vizsgálatát hisztokémiai vagy elektrofiziológiai módszerekkel egyaránt.

Az idegdúcok illetve a vegetatív hálózat a sejtkontaktusok sértése nélkül izolálhatóak. A szövetek alacsony oxigéntenziója lehetővé teszi, hogy a csigákból izolált ideghálózatok órákig is megőrizték működőképességüket, így fiziológiai kísérletek során hűen tükrözik az élő állapotra jellemző válaszreakciókat.

Mindezek a tudóscsigák képviselőit (*Helix lucorum*, *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Achatina fulica*, *Limax maximus*, *Lymnaea stagnalis*) az összehasonlító idegbiológia alternatív modell-szervezeteivé teszik (Kerkut és Walker 1975, Lucht et al. 1997).

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV. 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, nitrit-mentes növényi táplálékon tartottuk a kísérletek megkezdéséig. A viváriumok hőmérséklete 22-25 °C volt.

1. táblázat: A vizsgált csigafajok listája	
Familia	Species
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

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.

2. NADPH-diaforáz 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 tápcsatorna-preparátumot 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 inhibítora (Van Noorden és Butcher 1986), nátrium-azid (NaN_3 , 0,1 mM) a mitokondriális respiratórikus lánc enzimeinek kompetitív inhibítora (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 elektrondonorként 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 reduktáz segítségével a keletkező nitrát-ionokat nitrit-ionokká alakítottuk.

A szövetminták nyérése

A kloroform narkózist követően PBS-ben izoláltuk a cerebrális és a postcerebrális dúcokat, illetve a tápcsatorna-szegmenseket (caecum, rectum). A ganglionok felszínéről agát dörzsmozsárban történő mechanikai foszlatással 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 10 µM-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. Az *Aspergillus* nitrát-reduktáz unit-definíciója: 1 unit percenként 1 µmol nitrátot redukál nitritté, pH 7,5 és 25 °C mellett. 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, melynek molekuláiból vizes közegben NO válik szabaddá (Feelisch 1998).

A hígítási sort (335,57; 167,78; 83,89 mM) három párhuzamos mérésben mikrotiter lemezhez adtuk, majd 20 perc elteltével nitrát redukciót végeztünk (a fent leírt módon) végül mértük az oldatok nitrit-tartalmát, mely $0,116 \pm 0,020$; $0,049 \pm 0,010$ és $0,035 \pm 0,002$ 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 inkubáltunk 10 percig 25 °C hőmérsékleten. A Griess-reagens nem adott színreakciót $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -oldattal, azonban nitrát-

redukciót követően az oldatban $12 \pm 2 \text{ } \mu\text{M}$ nitrit jelenlétét mutatta ($n=3$).

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

Mintaszám

Minden kontroll és teszt kísérletet legalább három egyedből származó szöveten végeztünk el. A mintaszámot (n) a grafikonokon és a szövegben tüntettem fel.

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 szervkádaiba merítettük (TSZ-04, Experimetria), melyeket Krebs-oldattal töltöttünk fel. A Krebs-oldat összetétele (mM): NaCl, 118; KCl, 4,7; CaCl₂, 2,5; NaH₂PO₄, 1,0; MgCl₂, 1,2; NaHCO₃, 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 összehúzódások frekvenciáját és erejét (amplitudóját) értékeltük. Minden mérést legalább három mintán végeztünk el.

6. Statisztikai értékelés

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

V. EREDMÉNYEK

V. EREDMÉNYEK

1. NITRERG ÉS FMRFAMIDERG HÁLÓZATOK ANATÓMIAI KAPCSOLATAI A KÖZPONTI IDEGRENDSZERBEN ÉS AZ FMRFAMID HATÁSA AZ INTRAGANGLIONÁRIS NO SZINTÉZISRE

1.1. NADPH-diaforáz reaktív és FMRFamid immunreaktív neuronok eloszlása *Helix lucorum* központi idegrendszerében

Ganglion cerebrale

NADPH-diaforáz (NADPH-d) pozitív idegsejtek mind a cerebrális, mind a postcerebrális ganglionokban találhatóak.

A ganglion cerebrale három régiója (pro-, meso- és metacerebrum) különösen gazdag NADPH-d festődést mutató idegsejtekben. A procerebrumban több száz idegsejt (átmérőjük 7-10 µm), a procerebrum belső rostozata (medulla terminalis) valamint a procerebrumba lépő idegtörzs (nervus tentacularis) rostjai mutattak reaktivitást.

A mesocerebrum corticális és mély rétegében 70-90 µm átmérőjű unipoláris neuronok jelölődtek (150-160 mindkét

mesocerebrumban). A két mesocerebrumot összekötő pályarendszer rostozata szintén festődött (4. ábra).

A metacerebrumban főként a neuropil és néhány szórt eloszlású unipoláris sejt mutatott NADPH-d aktivitást.

FMRFamid immunjelölést a mesocerebrum corticális zónájában, valamint szórt eloszlású postcerebrális idegsejtekben azonosítottam. A dúcokat borító kötőszöveti réteget (perineuriumot) FMRFamid immunpozitív rostozat hálózta be.

A NADPH-d aktív neuronok sejttestei körül FMRFamid immunjelölt, varikozitásokat adó rostok jelentek meg a procerebrumban és a mesocerebrum cortexében. A rostok pericelluláris kosarakat alkottak a sejttest körül, valamint ráterjedtek az axon iniciális szegmentumára is (4. ábra). NADPH-d/FMRFamid kolokalizáció a mesocerebrum mély rétegében jelent meg.

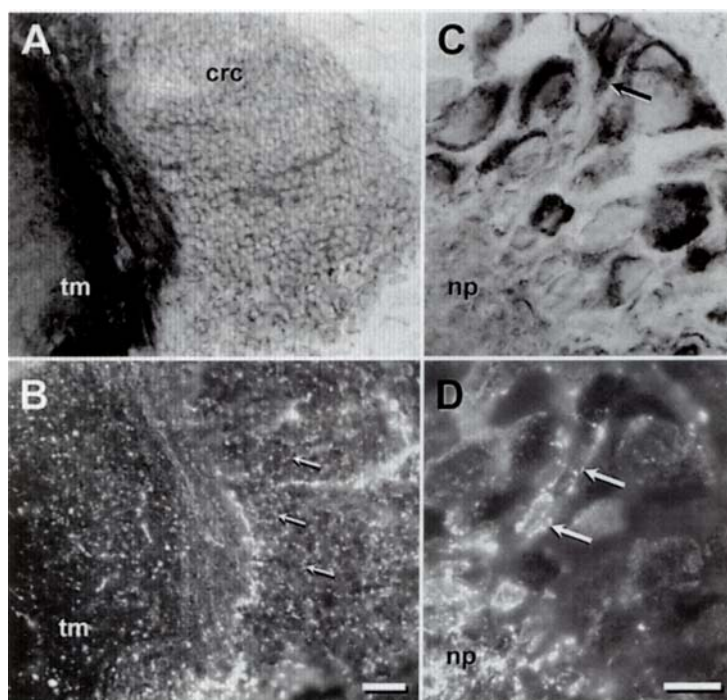
Postcerebrális ganglionok

A garat alatti dúckomplexum (postcerebrális dúcok) mindegyikében találhatóak NADPH-d aktív neuronok. A ganglion viscerale 160 sejtet, a ganglion pleurale 35-40 sejtet, a ganglion pedale 20-22 sejtet, a ganglion parietale 110 sejtet

tartalmazott. Reaktivitás a dúcokból kilépő valamennyi ideg (nn. pedales, n. intestinalis, n. analis) és commissura rostrozatában látható volt (5. ábra).

A cerebrális és a postcerebrális dúcokat egyesítő connectivumok szintén mutattak NADPH-d aktivitást.

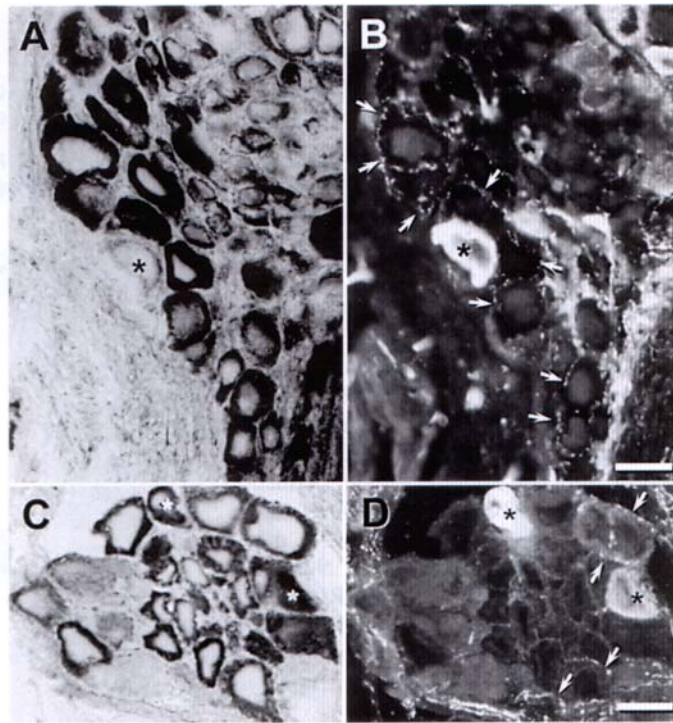
FMRFamid immunjelölt végződéseket találtunk a viscerális, a parietális és a pedális dúcok NADPH-d aktív sejtteste körül. FMRFamid/NADPH-d kolokalizáció a viscerális ganglion néhány sejtjére korlátozódott.



4. ábra: NADPH-diaforáz pozitív és FMRFamid immunreaktivitást mutató idegsejtek és axonvégződések a ganglion cerebralében

A, B: Számos procerebrális sejt (**crc**) és a terminális medulla (**tm**) rostozata NADPH-diaforáz festődést mutat. A nyilak (**B** képen) olyan rostokat jeleznek, melyekben FMRFamid immunjelölés látható. Horizontális metszetek, mérték: 10 μ m.

C, D: Felszínes mesocerebrális neuronok. A nyíl egy NADPH-diaforáz pozitív neuron axoneredési szegmentumát mutatja, mely a szintén reaktív neuropil (**np**) irányába tart. Az axont FMRFamid immunjelölést mutató axonvégzések követik (fehér nyilak jelzik). Horizontális metszetek, mérték: 35 μ m. *Rószler et al. (2004) Brain Behav Evol* 63:23-33



5. ábra: NADPH-diaforáz pozitív és FMRFamid immunjelölt sejtek és axonvégződséek a postcerebrális ganglionokból

A: A ganglion viscerae NADPH-diaforáz aktív sejtjei. A csillag egy aktivitást nem mutató sejttestet jelez, mely a **B** képen FMRFamid immunjelölést mutat. **B:** FMRFamid immunpozitív varikozitások a NADPH-diaforáz festett sejtek körül. Horizontális metszetek. Mérték: 40 μ m.

C, D: A ganglion pedale NADPH-diaforáz reaktív neuronjai. A csillag NADPH-diaforáz/FMRFamid kolokalizációt jelez két sejtben. A nyilak FMRFamid-immunpozitív végződéseket mutatnak NADPH-diaforáz aktív sejtek körül. Horizontális metszetek, mérték: 40 μ m.

Röszer et al. (2004) Brain Behav Evol 63:23-33

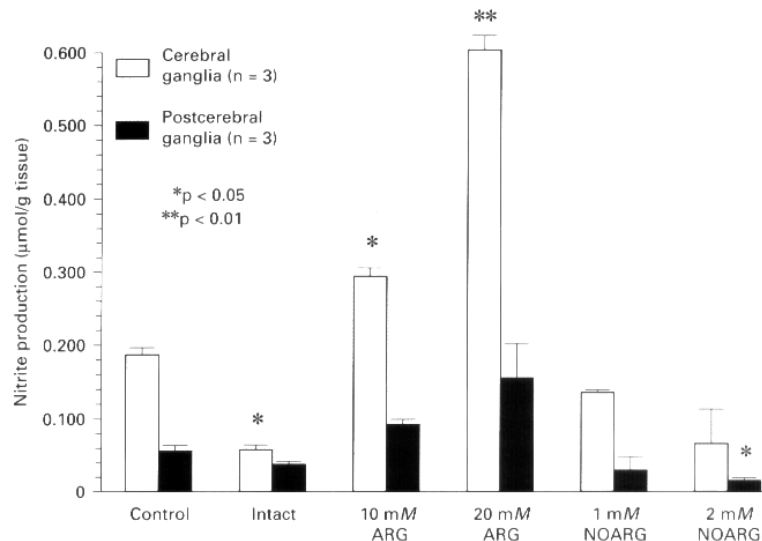
1.2. A ganglionok alap nitrit produkciója

A bazális nitrit termelés szintjét 20 percig tartó, PBS-ben való inkubálást követően mértük. Ha a perineuriumot az inkubálás előtt eltávolítottuk, a cerebrális dúcok nitrit-termelése $0,185 \pm 0,015 \mu\text{mol/g}$, míg a postcerebrális dúcoké $0,055 \pm 0,005 \mu\text{mol/g}$ volt (6. ábra).

Intakt perineurium mellett a nitrit-termelés szignifikánsan alacsonyabb volt (cerebrális dúcok: $0,055 \pm 0,005$, postcerebrális dúcok: $0,037 \pm 0,002 \mu\text{mol/g}$, $p < 0,05$, 6. ábra).

1.3. NOS prekursor (L-arginin) és NOS gátló (NOARG) hatása a nitrit-termelésre

Ha az inkubációs közeg 10-20 mM L-arginint tartalmazott, a nitrit-termelés dóziszfüggő növekedése volt tapasztalható (6. ábra). Ellentétes hatást váltott ki 1-2 mM NOARG (kompetitív NOS inhibitor) alkalmazása (szignifikancia: 10 mM L-arginin alkalmazásakor $p < 0,01$; 20 mM L-arginin alkalmazásakor $p < 0,01$; 2 mM NOARG alkalmazásakor $p < 0,05$).



**6. ábra: A ganglionok alap nitrit termelése intakt és eltávolított perineurium mellett
L-arginin és NOARG hatása a nitrit produkcióra**

Az inkubációs idő minden esetben 20 perc volt. *Control*: a ganglionok perineuriumát eltávolítottuk, majd PBS-ben inkubáltuk. *Intact*: A perineuriumot nem távolítottuk el (intakt), majd ezután inkubáltuk PBS-ben. *10mM ARG*, *20 mM ARG*: inkubálás 10-20 mM L-arginint tartalmazó PBS-ben (a perineuriumot eltávolítottuk), *1mM NOARG*, *2 mM NOARG*: inkubálás 1-2 mM NOARG tartalmú PBS-ben (a perineuriumot eltávolítottuk)

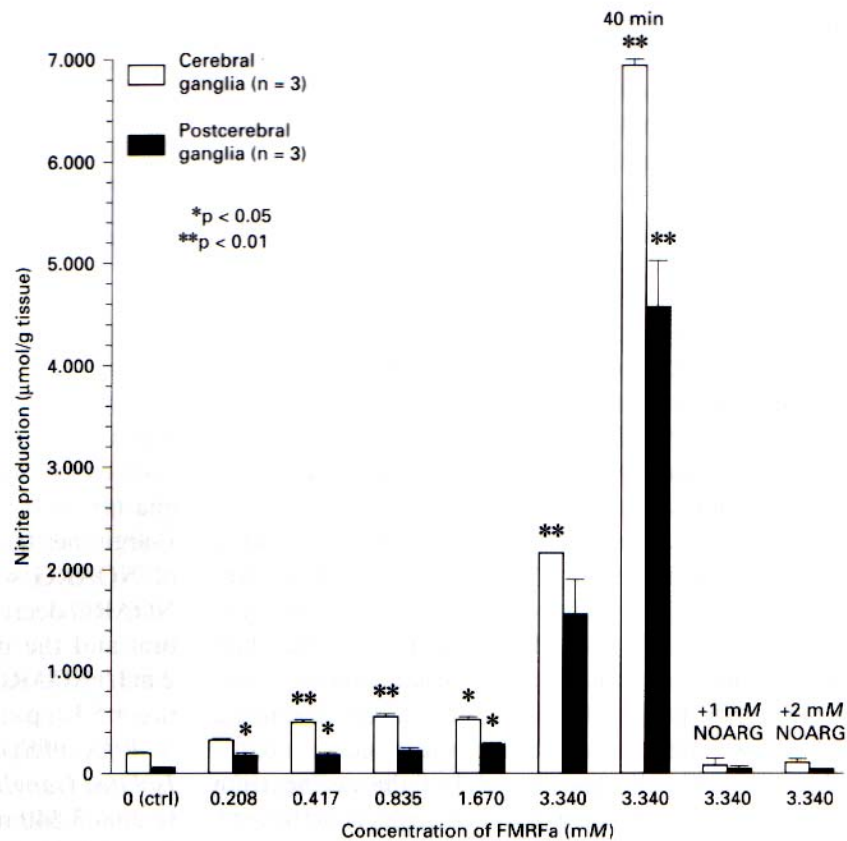
Röszer et al. (2004) Brain Behav Evol 63:23-33

1.4. Szintetikus FMRFamid hatása a nitrit-termelésre

Szintetikus FMRFamid tetrapeptid széles koncentrációtartományban (0,208-3,340 mM) dózisfüggő módon serkentette a ganglionok nitrit produkcióját. Az inkubációs idő megnyújtása 40 percre, további nitrit-szint emelkedést eredményezett. Szimultán FMRFamid és NOARG alkalmazás nem okozott változást az alap nitrit-termelésben (7. ábra).

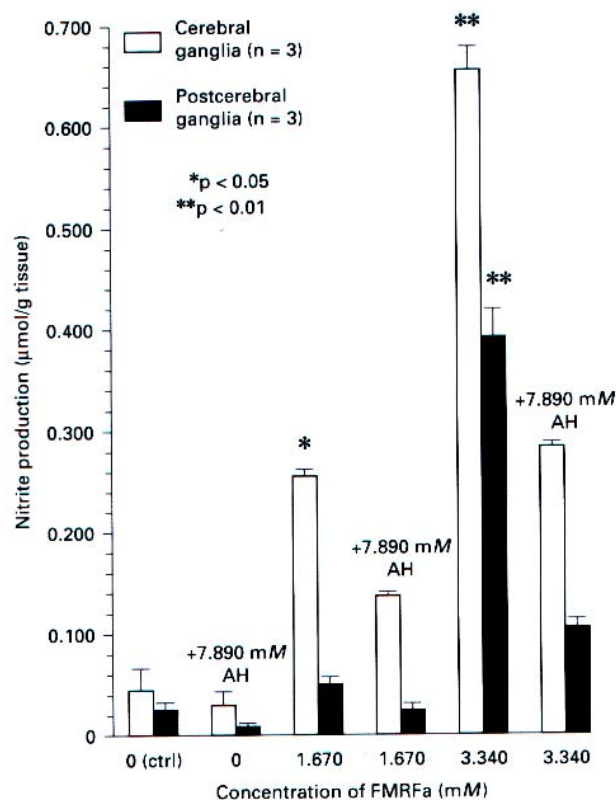
1.5. Az FMRFamid-receptor blokkoló amilorid-hidroklorid hatása a nitrit-termelésre

A Na⁺-csatorna blokkoló amilorid hidroklorid (7,890 mM) önmagában nem befolyásolta a nitrit-termelést, azonban szignifikánsan gátolta 1,670 és 3,340 mM FMRFamid nitrit-termelést fokozó hatását (8. ábra).



7. ábra: Szintetikus FMRFamid hatása a ganglionok nitrit produkciójára

Az inkubációs idő 20 perc, kivéve a 40 min felirattal jelzett oszlopokat. +1mM NOARG, +2mM NOARG: Az inkubációs közeg 1-2 mM NOARG-t tartalmaz. ctrl: kontroll (inkubálás PBS-ben)
A ganglionok perineuriumát eltávolítottuk.
Röszer et al. (2004) *Brain Behav Evol* 63:23-33



8. ábra: FMRFamid és amilorid-hidroklorid hatása a ganglionok nitrit termelésére

Az inkubációs idő 20 perc, a perineuriumot eltávolítottuk. *Ctrl*: inkubálás 10% DMSO-ot tartalmazó PBS-ben. Ha az inkubációs közeg 7,890 mM amilorid-hidrokloridot is tartalmazott, azt +7.890 mM AH felirat jelzi.

Röszer et al. (2004) Brain Behav Evol 63:23-33

2. A NITRERG NEURONÁLIS HÁLÓZAT FELÉPÍTÉSE ÉS SZERKEZETI DIVERZITÁSA A KÜLÖNBÖZŐ FAJOK ENTERALIS IDEGRENDSZERÉBEN

2.1. NADPH-d aktív elemek a gastrointestinalis idegrendszerben

NADPH-d reaktivitást csakis *Helix*-alkatú Stylommatophora csigák gastrointestinalis idegrendszerében, a caecum területén, a plexus myentericusban, a plexus submucosusban és idegvégződések formájában az izomrétegben detektáltunk. A NADPH-d pozitív hálózatot alkotó sejtek száma az egyes fajokra jellemző testmérettel (testtömeggel) összefüggésben változott (összefoglalva a 11. ábrán).

• A plexus myentericus

Helix lucorum

A caecum izomrétegeiben egyenletes eloszlásban 56 ± 11 , 50-55 μm átmérőjű NADPH-d reaktív neuron van jelen (9. ábra). A neuronok a myentericus plexus rosthálózatához küldik axonjaikat. A myentericus rostkötegek egyrészt a gaster és az intestinum irányába fordulnak, majd a nervus intestinalis idegtörzsében lévő ganglionsejtek körül fonadékot képezve

végződnek; másrészt a plexus egyes, nem NADPH-d reaktív idegsejtjei körül hoznak létre pericelluláris végfonatokat.

Helix lutescens

A gaster és a caecum fala 61 ± 2 NADPH-d festődést adó neuront tartalmaz, melyek pericelluláris kosarakat alkotnak a plexus egyes idegsejtjein.

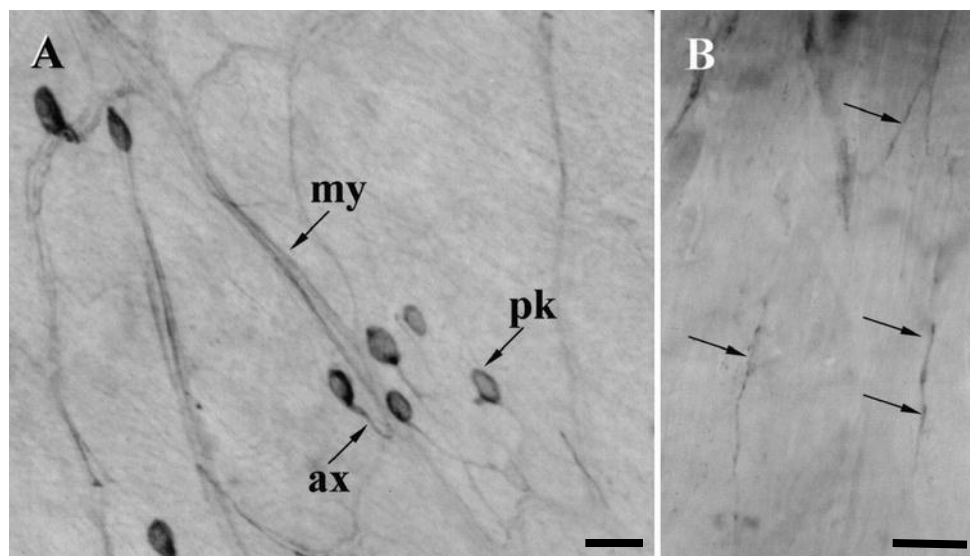
Cepaea nemoralis

A myentericus plexus a caecum területén tartalmaz egy NADPH-d reaktív unipoláris neuronokban gazdag régiót. Az idegsejtek három morfológiai csoportba sorolhatók a sejttest átmérője és axonhossza alapján (2. táblázat). Az 1. típusú sejtek többnyire magányosan fordulnak elő, illetve a myentericus rostrendszer fő elágazódási pontjaiban hármas csoportokat képeznek. A 2. típusú sejtek magányosan vagy párosával jelennek meg, igen hosszú axonjuk a myentericus rostozathoz kapcsolódik (10. ábra/A).

A NADPH-d reaktív myentericus rostrendszer pericelluláris kosarakat képez a plexus nem NADPH-d aktív idegsejtjein. A plexus rostrendszere a caecum középvonalának sejtgazdag területétől az intestinum felé terjed ki, és a submucosa idegplexusában folytatódik.

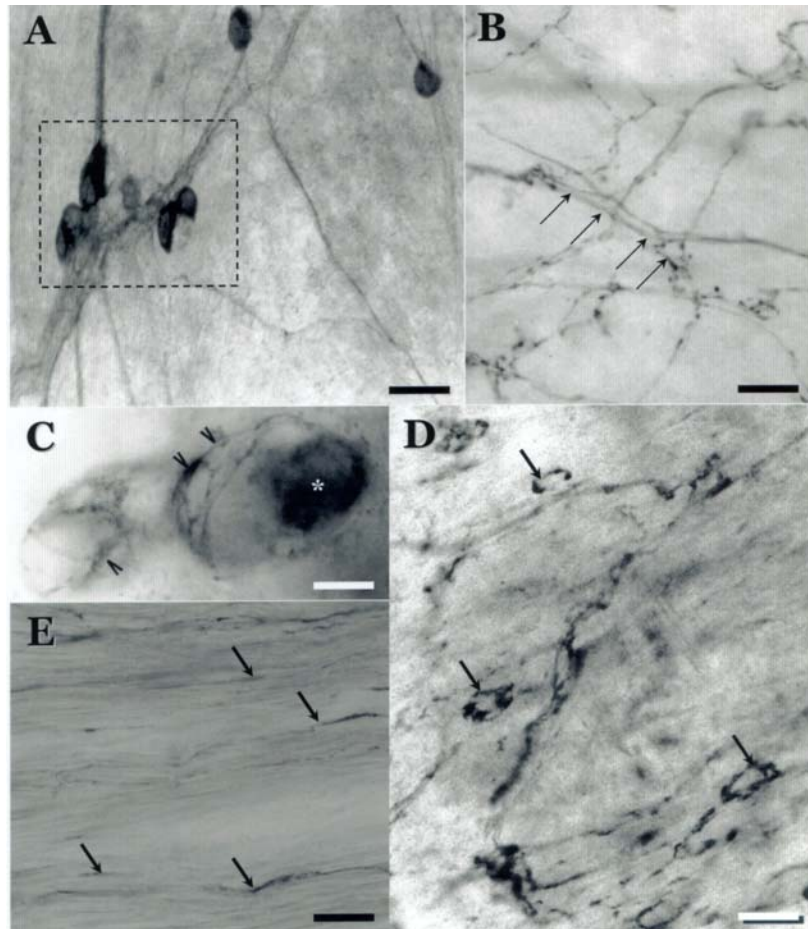
2. táblázat: NADPH-d reaktív sejtek morfológiai csoportjai *Cepaea nemoralis* caecumában

	1. típus	2. típus	3. típus
Perikaryon átmérője	35-40 μm	35 μm	8-15 μm
Axonhossz	25-30 μm	60-80 μm	10 μm
Sejtszám	20-22	8-9	4-5



9. ábra: NADPH-d aktív idegsejtek és végződéshek *Helix lucorum* myentericus plexusában

A: Unipoláris neuronok a caecum falában. **my:** myentericus rostok, **pk:** perikaryon, **ax:** axon. Egység: 90 μm . **B:** A nyilak NADPH-d reaktív idegrostokat jeleznek a caecum izomrétegében. Egység: 40 μm . Röszer et al. (2004) *Cell Tissue Res* 316:255-262



10. ábra: NADPH-d aktív neuronok és végződések különböző tüdőscsiga-fajok enterális rendszeréből

A: Unipoláris neuronok csoportja (keretben) és magányos neuronok *C. nemoralis* caecumából, egység: 65 μ m. **B:** Idegrostok (nyilak jelzik) *H. lucorum* submucosalis plexusából. Egység: 70 μ m. **C:** Egy NADPH-d pozitív sejttest (csillag) és pericelluláris végződések (nyilak) a szomszédos idegsejteken. *C. hortensis* caecum, egység 35 μ m. **D:** Pericelluláris kosár-szerű végződések (nyilak) *H. obvia* submucosalis plexusában. Egység 25 μ m. **E:** Idegrostok a caecum izomzatában. *H. lucorum*, egység: 30 μ m Rószter et al. (2004) *Invert Biol* 123 (2)

Cepaea hortensis

A NADPH-d reaktív plexus felépítése hasonló a *Cepaea nemoralis*ban leírtához (10. ábra/C). A sejtek száma 31 ± 2 .

Zebrina detrita

A gaster-caecum határon 30 ± 2 NADPH-d pozitív idegsejt található.

Helicella obvia

A caecum izomrétegeiben számos, 15-20 μm átmérőjű és néhány 25-30 μm átmérőjű NADPH-d pozitív unipoláris neuron jelenik meg, melyek axonjai a myentericus rosthálózathoz csatlakoznak. A rostkötegek egyes ágait NADPH-d reaktív bipoláris neuronok kapcsolják össze. Megfigyehetők a myentericus rostrendszer által képzett pericelluláris kosarak, nem NADPH-d aktív sejtek körül.

Monachoides umbrosa

A caecum területén 24 ± 2 NADPH-d aktív neuron volt detektálható.

Trichia hispida

A NADPH-d festődő sejtek száma 10 ± 2 .

Succinea putris

A NADPH-d pozitív neuronok száma 8 ± 1 , melyek axonjai a myentericus rostkötegekhez jutnak.

Clausilia dubia és *Discus rotundatus*

A NADPH-d aktív idegsejtek száma 4 illetve 3.

Achatina fulica, *Limax maximus*, *Arion ater* és *Arion subfuscus*

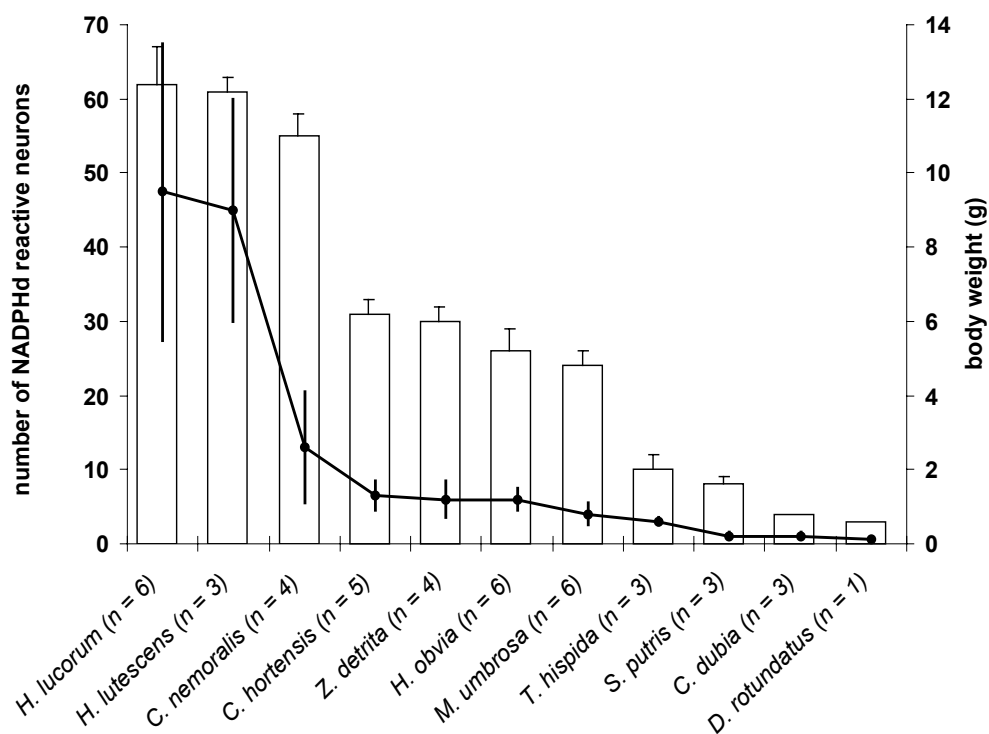
NADPH-d reaktív idegi elemek nem detektálhatók a tápcsatorna területén.

- **A plexus submucosus**

A plexus submucosus NADPH-d reaktív hálózata igen fejlett *Helix lucorum*, *Helix lutescens*, *Helicella obvia*, *Cepaea nemoralis*, *Cepaea hortensis*, *Discus rotundatus*, *Helicella obvia*, *Monachoides umbrosa*, *Trichia hispida* és *Zebrina detrita* fajokban. Számos pericelluláris végfonat jelenik meg (10. ábra/B, D).

• **A viscerális izomzat innervációja NADPH-d aktív végződések által**

A középbéli simaizomzatot minden esetben innerválták NADPH-d aktív rostok, ha a myentericus plexus tartalmazott NADPH-d pozitív idegsejteket (9. ábra/B, 10. ábra/E).



11. ábra: Az enterális NADPH-d pozitív sejtek száma és a testtömeg közötti összefüggés

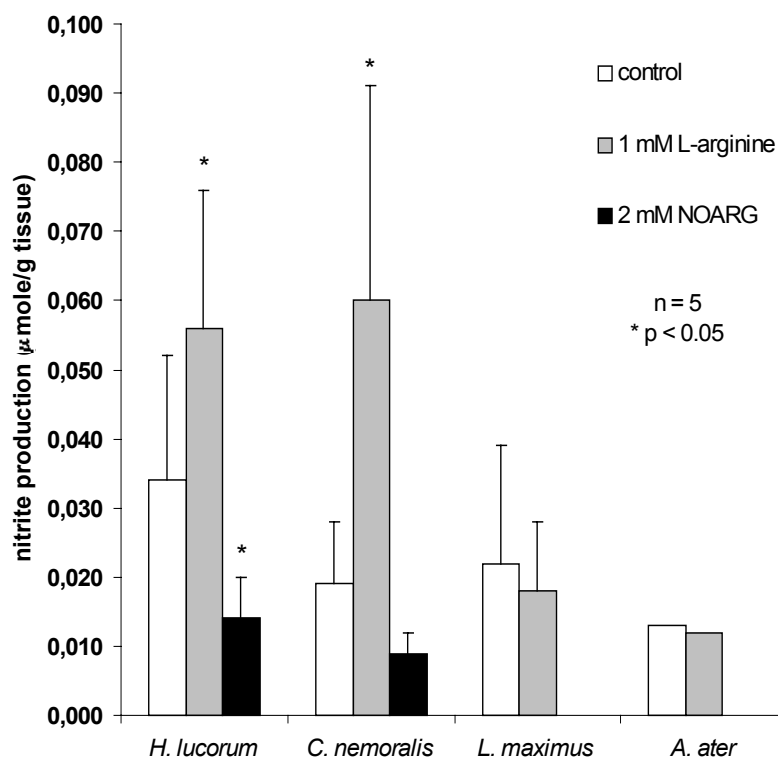
Az oszlopok a NADPH-d reaktív myentericus idegsejtek számát, a folytonos vonal a vizsgálatához felhasznált csigák átlagos testtömegét jelzi (n=mintaszám). Röszer et al. (2004) *Invert Biol* 123 (2) – in press

2.2. Az enterális szövetek bazális nitrit produkciója

Az enterális rendszer NO termelését *Helix lucorum* és *Cepaea nemoralis*, középbéli szegmenseiben követtük a NO-származék nitrit kolorimetriás mérésével. Negatív kontrollként NADPH-d aktív sejtektől mentes tápcsatornaszakaszt (rectum), valamint NADPH-d pozitív enterális idegsejtekkel nem rendelkező két csigafajból (*Arion ater* és *Limax maximus*) származó caecum szövetmintákat vizsgáltunk.

Ha a mintákat 20 percig PBS-ben inkubáltuk, a szövetek nitrit teremlése a következőképpen alakult: *Helix lucorum* $0,034 \pm 0,018$, *Cepaea nemoralis* $0,019 \pm 0,009$, *Arion ater* $0,013 \pm 0,006$, *Limax maximus* $0,022 \pm 0,017$ $\mu\text{mol/g}$.

A szövetek nitrit-termelését az izolálást követő huszadik, negyvenedik és hatvanadik percben mérve, közel állandó értéket kaptunk (*Helix lucorum* izolált középbéli szegmentumának nitrit produkciója az izolálást követő húsz percben $0,003 \pm 0,001$ $\mu\text{mol/g}$. Az izolálás utáni negyvenedik, illetve hatvanadik percben mért húsz perc alatti nitrit-termelés $0,003 \pm 0,011$ és $0,040 \pm 0,010$ $\mu\text{mol/g}$ [n=3]).



12. ábra: Az enterális szöveti nitrit-produkció összehasonlítása különböző fajokban

A világos oszlopok a kontroll értékeket (inkubálás PBS-ben), a szürke oszlopok 1 mM L-arginin, míg a fekete oszlopok 2 mM NOARG hatását jelzik.

Rőszér et al. (2004) *Invert Biol* 123 (2) – in press

2.3. NOS szubsztrát és NOS inhibitorok hatása az enterális nitrit-termelésre

A nitrit produkciót 1 μ M L-arginin szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte aktívan táplálkozó *Helix lucorum* és *Cepaea nemoralis* középbéli szegmentumaiban. Ellentétes hatást váltott ki 2 mM NOARG (általános NOS inhibitor) alkalmazása. *Arion ater* és *Limax maximus* enterális nitrit produkcióját, illetve a rectumból származó minták nitrit-szintjét L-arginin nem befolyásolta (12. ábra).

3. A NITRERG ENTERÁLIS HÁLÓZAT HOSSZÚ TÁVÚ GÁTLÁSA *HELIX LUCORUM* DORMÁNS IDŐSZAKÁBAN

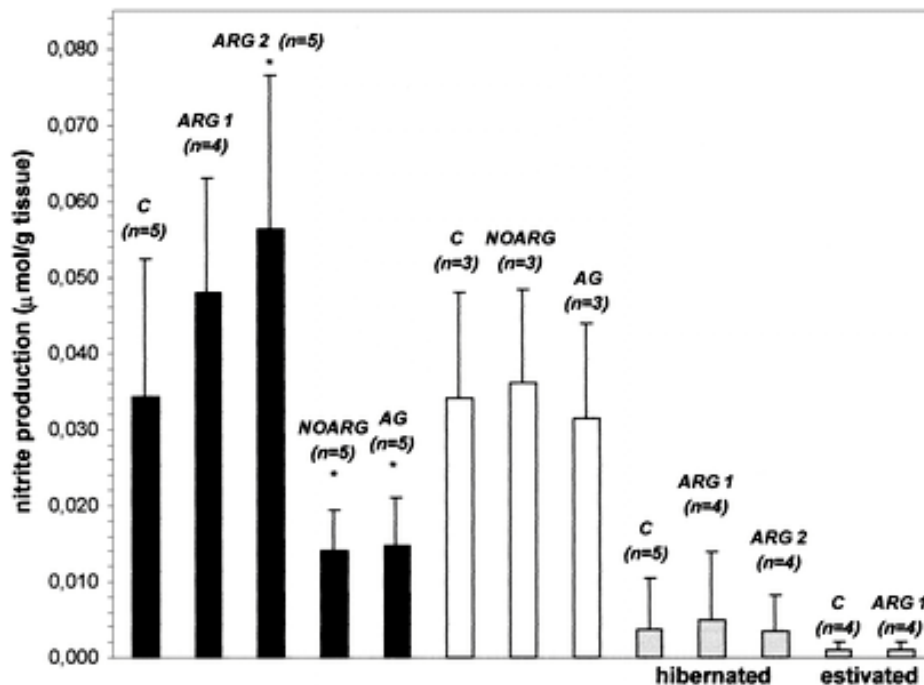
3.1. A NADPH-d pozitív idegplexus szerkezete a hibernatio idején

A reaktív idegsejtek száma 56 ± 11 aktívan táplálkozó *Helix lucorum* egyedekben, 57 ± 10 pedig dormáns (hibernált) egyedekben. A hibernatio alatt a plexus szerkezete nem mutat különbséget az aktív időszakban leírt hálózathoz képest. A NADPH-d festett sejtek relatív optikai denzitása (λ 620) szintén

közel azonos aktív és hibernált csigákban (aktív: $0,006 \pm 0,005$, hibernált: $0,009 \pm 0,003$).

3.2. A bazális nitrit termelés aktív és dormáns állapotban. L-arginin, NOARG és aminoguanidin hatása

Aktívan táplálkozó csigákból izolált caecum minták nitrit-produkcióját L-arginin dózisfüggően növelte, míg NOARG és aminoguanidin (AG) szignifikánsan redukálta azt. Az enterális szövet alap nitrit-produkciója $0,034 \pm 0,018 \mu\text{mol/g}$ volt, melyet $10 \mu\text{M}$ L-arginin $0,047 \pm 0,015 \mu\text{mol/g}$ -ra, míg 1 mM L-arginin $0,056 \pm 0,020 \mu\text{mol/g}$ -ra növelt. A rectum nitrit-szintjét a NOS gátlók nem befolyásolták. Estivált és hibernált egyedekből származó caecum minták nitrit produkciója alig volt detektálható ($0,001 \pm 0,001$ illetve $0,003 \pm 0,007 \mu\text{mol/g}$) és L-argininnel sem volt fokozható (13. ábra).



**13. ábra: Az enterális szöveti nitrit-produkció aktív és
dormáns állapotban (*H. lucorum*)**

A fekete oszlopok mutatják a nitrit-szint alakulását aktív csigákból származó caecum mintákban. A világos oszlopok aktív csigák rectum mintáinak nitrit-tartalmát jelzik. A szürke oszlopok dormáns (hibernált és estivált) csigák caecumában mutatják a nitrit-produkció változását. **C:** kontroll, **ARG1:** 10 μM L-arginin, **ARG2:** 1 mM L-arginin, **NOARG:** 1 mM NOARG, **AG:** 10 mM AG, *: p<0,05, n=mintaszám)

Röszer et al. (2004) *Cell Tissue Res* 316:255-262

3.3. L-arginin és NOARG hatása a középbéli mozgási aktivitásra aktív és hibernált *Helix lucorum* egyedekben

Vizsgálataink során az izomszegmensek izometrikus tenzióváltozásait regisztráltuk. A tenzió növekedése az izom tónusának fokozódását illetve kontrakció kialakulását, míg csökkenése a tónus csökkenését és relaxáció létrejöttét jelzi.

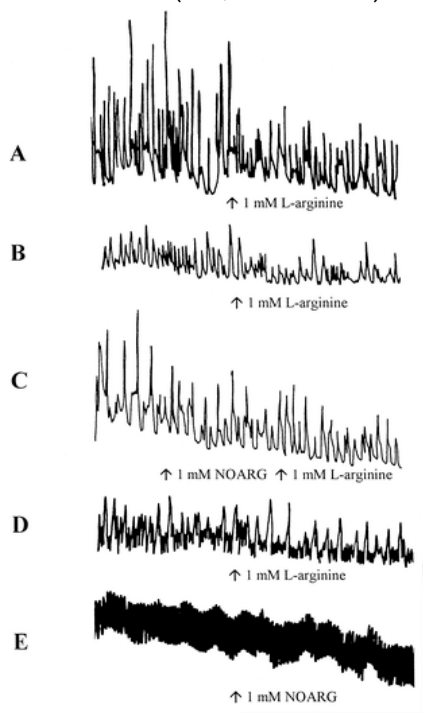
Aktívan táplálkozó csigák

A gaster-caecum határon végigvonuló hosszanti izomréteg spontán működésére kontrakciósorozatok és nyugalmi szakaszok szabályos váltakozása jellemző.

A caecum összehúzódásainak frekvenciája $2,6 \pm 0,8$ /min normál Krebs-oldatban. 1 mM L-arginin, vagy 1 mM NOARG nem befolyásolta a frekvenciát. Az összehúzódások erőssége $1,036 \pm 0,404$ mN normál Krebs-oldatban. L-arginin vagy NOARG jelenlétében $0,332 \pm 0,169$ mN illetve $0,256 \pm 0,110$ mN. A rectum $2,8 \pm 0,3$ /min frekvenciával és $0,177 \pm 0,024$ mN amplitudóval húzódott össze. A mozgási aktivitást L-arginin nem befolyásolta (14, 15. ábra).

Hibernált csigák

A caecum mozgására szapora kontrakciók jellemzőek. A kontrakciók frekvenciája $4,4 \pm 1,0/\text{min}$ volt normál Krebs-oldatban. Az összehúzódások ereje $0,192 \pm 0,093$ mN. Ezeket az értékeket sem 1 mM L-arginin, sem 1 mM NOARG nem módosította (14, 15. ábra).

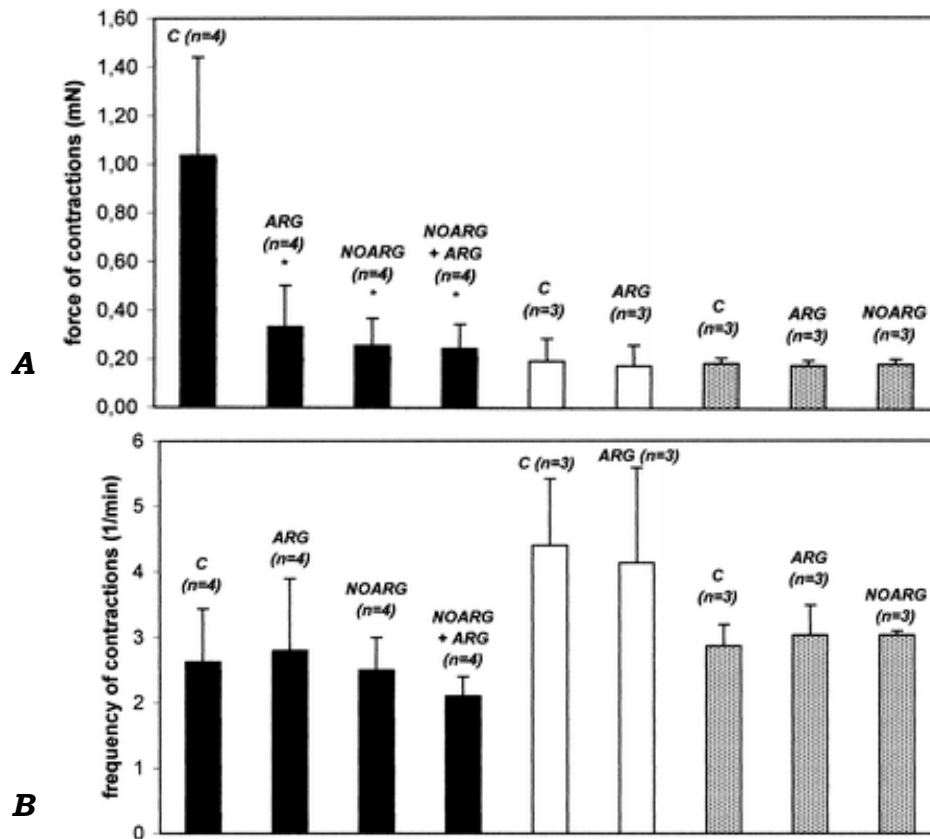


14. ábra: L-arginin és NOARG hatása az enterális izomzat mozgási aktivitására (mechanikus regisztrátumok)

A: caecum aktív csigából (*H. lucorum*), **B:** caecum hibernált csigából, **C:** caecum aktív csigából, **D-E:** rectum aktív csigákból, vízszintes tengely: idő (10 perc), függőleges tengely: kontrakciós erő (mN)

A nyilak jelzik azt az időpontot, amikor az L-arginint és a NOARG-t az izompreparátumokhozadtuk.

Röszer et al. (2004) *Cell Tissue Res* 316:255-262



15. ábra: Az enterális izomkontrakciók amplitudója (A) és frekvenciája (B)

A fekete oszlopok aktív *H. lucorum* egyedekből izolált caecum szegmensek, a fehér oszlopok hibernált egyedek caecum, míg a szürke oszlopok rectum szegmensek adatait mutatják. *: $p < 0,05$, n =mintaszám, **C**: kontroll (inkubálás Krebs-oldatban), **ARG**: inkubálás 1 mM L-arginint tartalmazó Krebs-oldatban, **NOARG**: inkubálás 1 mM NOARG-t tartalmazó Krebs-oldatban. Röszer et al. (2004) *Cell Tissue Res* 316:255-262

VI. ÖSSZEGZÉS

VI. ÖSSZEGZÉS

1. A disszertáció főbb megállapításai

Jelen disszertáció eredményeit a következő pontokban összegzem:

1. A NADPH-d hisztokémiai technika felhasználásával leírtuk a NOS-tartalmú idegsejteket és azok nyúlványrendszereinek anatómiai viszonyait *Helix lucorum* központi idegrendszerében és számos Pulmonata csiga enteralis ideghálózatában.
2. Mind a központi idegrendszerben, mind az enteralis 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 varikozitások érik el, melyek lehetővé

teszik, hogy az FMRFamid transzmitterként befolyásolja ezen sejtek működését (NO szintézisét).

4. A központi dúcok intraganglionáris NOS-aktivitása FMRFamiddal fokozható volt, míg az ismert FMRFamid-receptor antagonistá amilorid-hidroklorid jelenlétében csökkent az FMRFamid NO-produkciót provokáló hatása. 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 középbél 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.

2. A NADPH-d reaktivitás és a NOS azonosságának bizonyítása

Idegsejtekben a NADPH-d reaktivitásért olyan enzim felelős, melynek reduktáz része paraformaldehid fixálást követően működőképes marad, így β -NADPH jelenlétében a preparátumhoz adott tetrazóliumkéket vízben oldhatatlan, stabil formazánná redukálja (Thomas és Pearse 1961). A NOS NADPH-dependens elektrontranszportáló mechanizmusa működőképes marad aldehid fixálás után és dikumarollal sem gátlható (Nakos és Gossrau 1994). A sejt egyéb NADPH-dependens enzimeinek, így a NADPH-dehidrogenázoknak, a citokróm p450-reduktáznak, az alkalikus foszfataznak NADPH-d reaktivitását az aldehides rögzítés, valamint a dikumarol megszünteti.

Kontroll vizsgálatainkban mind a dehidrogenázokat, mind a mitokondrium légzőláncának enzimeit kizártuk, mint a NADPH-d aktivitásért felelős molekulákat, mivel gátlószereik (mikonazol, nátrium-azid, dikumarol) jelenléte a neuronális

NADPH-d reaktivitást nem befolyásolta. A szövetek hőkezelése megszüntette a NADPH-d festődést, egyértelműen jelezve, hogy annak kialakulása enzimműködéshez kapcsolódik. Ezt erősíti az is, hogy magas koncentrációjú cisztein jelenléte sem befolyásolta a neuronális NADPH-d festődést, noha a cisztein szulfhidril csoportjai elektrondonorként katalizálhatják a tetrazóliumsók formazánná alakulását (ezt a műtermék-képződéshez vezető folyamatot semmi-dehidrogenáz jelenségnek nevezik).

A 4%-os paraformaldehid fixálást követően, meghatározott protokoll szerint (Scherer-Singler et al. 1983, Nakos és Gossrau 1994) végzett NADPH-d reakciót a NOS markerének tekintik gerincesek idegsejtjeiben, mivel a NOS-immunreaktív neuronok egyúttal NADPH-d aktivitást is mutatnak (Bredt et al. 1991, Dawson et al. 1991, Matsumoto et al. 1993).

Gerinctelenek idegrendszerében a NADPH-d reaktív neuronok többsége nem jelölhető emlős nNOS elleni antitesttel (Moroz et al. 1994, Cooke et al. 1994, Huang et al. 1997). Ezidáig a puhatestűek köréből *Helix pomatia* (Huang et al. 1997) és *Lymnaea stagnalis* (Korneev et al. 1998) NOS enzimének szekvenciáját ismerjük. A *Helix*-NOS egyetlen gerincesekből ismert NOS izoformához sem hasonlít, míg a

Lymnaea-NOS hét aminosavból álló ismétlődő szekvenciákat tartalmaz, melyben eltér az emlős-nNOS szerkezetétől. Mindezen különbségek immuncitokémiai eltéréseket okozhatnak, melyek magyarázhatják az emlős-nNOS elleni antitest sikertelen kötődését gerinctelen NOS molekulákhoz. A *Helix*- és *Lymnaea*- NOS enzimet a cerebrális és a buccális ganglionok NADPH-d reaktív neuronjaiból izolálták, melyek a táplálékfelvételt szabályozó ritmusgenerátor aktivátoraiként működnek. Ezekből a neuronokból a táplálékfelvétel mozgássorozatának kezdetekor NO-szenzitív elektródokkal NO felszabadulás is mérhető volt (Elphick et al. 1995; Kobayashi et al. 2000). Néhány csigafaj perifériás NADPH-d aktív struktúráiból is mértek elektródokkal NO-felszabadulást, melynek mértéke L-arginin hozzáadásával fokozható volt (Moroz et al. 1995).

Mindezek az adatok megerősítik, hogy az általunk detektált, formaldehid- és dikumarol-rezisztens neuronális NADPH-d aktivitás a NOS jelenlétére utal.

3. A nitrerg és az FMRFamiderg sejtek anatómiai kapcsolata

A nitrerg sejtek leírt eloszlása *Helix lucorum* központi idegrendszerében jó egyezést mutat korábbi munkákkal (Cooke et al. 1994, Huang et al. 1997, Pisu et al. 1999). Immuncitokémiai munkánk szerint a nitrerg sejtek többségének sejttestét, illetve iniciális axonszegmensét FMRFamid-immunjelölt végződés veszik körül a procerebrumban, a mesocerebrumban, a pedális és a viscerális ganglionokban.

A sejttestek és az axonvégződés fénymikroszkóppal látható kapcsolatát Ábrahám (1965) pericelluláris kosárnak írta le. A pericelluláris kosár elektronmikroszkópos szerkezetére az idegrost gyöngyfűzér-szerű megvastagodásai, a varixok jellemzőek. A varixok a transzmitterek felszabadulási helyei. A beidegzett sejt membránja a varixok felszínét követve, mintegy azok negatív lenyomatát adva betüremlik, így a varixok kissé belesüllyednek a perikaryonba, míg az intervarix szegmentek a sejtfelszínhez simulnak (Elekes és Nässel 1990, Elekes 1991, Elekes et al. 1994). A pericelluláris kosár, illetve a varikozitásokat adó axonvégzések igen gyakori

sejtkontaktusok a csigák idegrendszerében (Pentreath et al. 1975, Elekes és Nässel 1990, Elekes 1991, Elekes et al. 1994).

Az általunk megfigyelt kapcsolat a nitrerg és az FMRFamiderg sejtek között, megegyezik a pericelluláris kosár fénymikroszkópos szerkezetével, így bizonyítja a NO-termelő neuronok innervációját FMRFamiderg rostok által.

4. A nitrerg elemek strukturális diverzitása az enteralis idegrendszerben

Enterális nitrerg elemeket csakis *Helix*-alkatú csigákban (Helicacea, Succineacea, Vertiliginacea) a caecum falában azonosítottunk. A caecum nitrerg hálózata azonos alapterv szerint épült fel a különböző fajokban, azonban a nitrerg hálózat fejlettsége nem azonos az egyes fajokban. A hálózat redukciójának tendenciája jól követi az egyes fajok testméretének csökkenését. Ebből következik, hogy a nitrerg hálózat kiterjedése és sejtszáma a testmérettel és a teljes enterális hálózat méretével párhuzamosan csökken (11. ábra).

A nitrerg rostok a myentericus és a submucosalis plexus számos idegsejtjén végződnek, vélhetően a felszabaduló NO azok működését módosítja. A nitrerg végzódések minden vizsgált *Helix*-alkatú fajban beidegzik a középbéli szakasz

simaizomzatát. A nitrerg hálózat csak a caecum falában jelenik meg, így szabályozó funkciója kifejezetten a caecum területére és a gaster caudális szakaszára korlátozódhat, bár *Helix* fajok esetében a nervus intestinalis ganglionsejtjei is nitrerg innervációt fogadnak. Ezáltal a NO a felsőbb tápcsatorna működését is módosíthatja a nervus intestinalis transzmissziójának befolyásolásán keresztül.

Az enterális nitrerg hálózat szerkezete arra enged következtetni, hogy a középbél motoros működését szabályozza.

5. A NADPH-d reaktív szövetek nitrit-produkciójának és a NOS aktivitás azonosságának bizonyítása

Az izolált ganglionok és a középbél-szegmensek NO termelését a NO lebomlási termékének tekinthető nitrit-ionok mérésén alapuló módszerrel követtük.

Vizes közegben a NO molekulák molekuláris oxigénnel reagálnak és nitrogén-dioxidot (NO_2) alkotnak. Két NO_2 reagál egy újabb NO molekulával, minek eredményeként dinitrogén-trioxid (N_2O_3) keletkezik. A N_2O_3 erős oxidáns, reagál vízzel, miközben nitrát (NO_3^-) és nitrit (NO_2^-)-ionok keletkeznek (Ignarro et al. 1993, Beckman és Koppenol 1996). Az általunk

kidolgozott módszer lényege, hogy a szövet inkubációs közegében keletkező nitrát-ionokat nitrát-reduktázzal nitrit ionokká alakítjuk, majd a teljes nitrit-mennyiséget mérjük Griess-reagens segítségével.

A Griess-reakció detektálási határa 0,222 μM nitrit-ionokra nézve (Marzinzig et al. 1997, Guevara et al. 1998, Borcharding et al. 2000). Kontroll vizsgálatainkban nitrát-ionokkal a Griess reagens nem adott színreakciót. A nitrát-reduktáz aktivitását kontroll mérésekben ellenőriztük. Hogy kiszűrjük az inkubációs közegbe kerülő fehérjék hatását a nitrát-reduktáz aktivitására, kontroll vizsgálatban összehasonlítottuk az ismert mennyiségű nitrát-iont tartalmazó vizes oldatban és inkubációs közegben mért aktivitást, mely azonosnak adódott és megfelelt a felhasznált *Aspergillus* nitrát-reduktáz unit-definíciójának. A vizsgált inkubációs közegek átlagos fehérjetartalma 5% alatt volt. A validálás során nátrium-nitroprusszid (nátrium-pentacianonitrozil-ferrát) hígítási sorában mértük a nitrit-produkciót. A nátrium-nitroprusszid molekuláiból vizes oldatban fénysugárzás hatására NO molekulák szabadulnak fel (Feelisch 1998). A mért nitrit-koncentráció arányos volt a nátrium-nitroprusszid koncentrációjával.

Mind a ganglionok, mind az enterális hálózat nitrit-produkciója dóziszfüggően növelhető volt L-arginin hozzáadásával, illetve konvencionális NOS-gátlókkal csökkenthető volt. Ezzel szemben a NADPH-d aktivitású sejteket nem tartalmazó szövetek nitrit-szintjét sem L-arginin sem NOS-gátlók nem befolyásolták.

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a NADPH-d reaktív sejtek nitrit-termelése a neuronális NO szintézis indikátorának tekinthető, mivel a nitrit-szint növekedése dóziszfüggő módon kiváltható a NOS szubsztrát L-arginin adásával, de gátolható a konvencionális NOS inhibitorok alkalmazásával. A nitrerg sejtekből álló szövetek nitrit-produkciója arányos a NOS katalitikus aktivitásával.

6. Az FMRFamid hatása a ganglionáris NOS aktivitásra

Anatómiai leírásaink alapján kimondható, hogy *Helix lucorum* nitrerg dűcsejtjeinek felszínét FMRFamid tartalmú varikozitások érik el, melyek lehetővé teszik, hogy az FMRFamid transzmitterként befolyásolja ezen sejtek működését (NO szintézisét).

A központi idegsejtek NO szintézisét szintetikus FMRFamid dóziszfüggően provokálja. A hatás csökkenthető az

ismert amilorid-érzékeny FMRFamid receptor Na^+ -csatornák blokkolásával (Cottrell 1997), így feltételezhető, hogy a neuropeptid elsődleges támadáspontjai a sejtmembránban lokalizált amilorid-érzékeny ioncsatornák.

7. A NOS aktivitás alakulása a hipometabolikus dormáns állapotban. A NO hatása az enterális motoros működésre

Hibernált, illetve estivált *Helix lucorum* középbéli szakaszaiban nem tapasztalható számottevő NOS aktivitás, noha a NOS eloszlása változatlan a dormáns időszak alatt. Aktív csigákban L-arginin és NOARG a spontán motoros aktivitás amplitudóját képes csökkenteni, ezzel szemben hibernált csigákban nincs hatásuk az izomzat működésére.

Az általunk vizsgált izomkötegek a gaster-caecum határán haladnak át, kontrakcióik továbbítják a gyomortartalmat a caecumba, ahonnan a caecum körkörös izomrétegének kontrakciója préseli azt a középbéli mirigy vezetékeibe. Aktívan táplálkozó csigákban erőteljes, szabályos időközönként jelentkező kontrakciókat, míg hibernált állapotban gyenge összehúzódásokat tapasztaltunk. A hibernatio alatt nincs táplálékfelvétel, ami magyarázza az ekkor jelentkező gyenge mozgási aktivitást.

A NO elsősorban simaizomrelaxáló funkciót tölt be a tüdőcsigák tápcsatornájában. A nitrerg neuronok egyrészt közvetlen simaizom-innerváció, másrészt enterális idegsejtek beidegzésén keresztül fejthetik ki hatásukat. A caecum izomrétegének NADPH-d pozitív innervációja mindegyik *Helix*-alkatú csiga esetében megfigyelhető volt, eszerint az itt felszabaduló NO simaizomműködést szabályozó szerepe valamennyi vizsgált *Helix*-alkatúban feltételezhető.

Dormáns állapotban nem tapasztalható bazális NOS aktivitás. L-arginin nem vált ki NO-szintézist, és nem befolyásolja a középbéli kontrakciókat. Mindezen megfigyelések azt jelzik, hogy a NOS molekula katalitikus aktivitása időlegesen gátolt a hipometabolikus időszak (hibernatio, estivatio) alatt.

8. Összegzés és értékelés

Az FMRFamid eddig mint izomműködést szabályozó molekula volt ismert a gerinctelen idegrendszerben (Muneoka et al. 1991, Hernádi et al. 1998). Az FMRFamidot kagylók idegrendszeréből izolálták (Price és Greenberg 1977), majd térképezték kagylók (Muneoka et al. 1991), csigák (Boer et al. 1980, Kanda et al. 1989, Elekes és Nässel, 1990) és rovarok

központi idegrendszerében, valamint rovarok neurohemális szervében, a corpora cardiacában (Boer et al. 1980). A kagyló *Mytilus edulis* anterior byssus retractor izomzatán (Muneoka et al. 1991), előlkopoltyús csigák, *Fusinus ferrugineus* és *Rapana thomasi* radula retractor izomzatán és atriális szívizomzatán (Kanda et al. 1989, Kobayashi és Sakata 1992) FMRFamid növeli a kontrakciók frekvenciáját és amplitudóját, vélhetően más transzmitter felszabadulásának serkentésén keresztül. *Helix* gastrointestinális rendszerében a gyomor és a nyelőcső izomzatának spontán kontrakcióit FMRFamid mérsékli, vagy megszünteti (Hernádi et al. 1998).

Az FMRFamid jelenléte azonban nem korlátozódik a gerinctelen állatvilágra. FMRFamid-tartalmú, gazdagon elágazó axonrendszerrel rendelkező idegsejtek találhatóak a halak retinájában (Wang et al. 2000), kétéltűek (Rastogi et al. 2001), hüllők (D'Aniello et al. 1999) és emlősök dorsális thalamusában és agytörzsében (Dockray et al. 1981, Yang és Majane 1990). Az FMRFamid izgató hatású az agytörzsi neuronokon (Dockray et al. 1981), továbbá az FMRFamid vezérelt amilorid-érzékeny nátrium-csatornák nyitódása hozzájárul a szimpatikus idegrendszer aktivációjához és a vérnyomás emeléséhez (Huang és Leenen 2002). Az FMRFamiderg sejteket tartalmazó

agyterületeken a NOS jelenléte is ismert (Bernstein et al. 2002, Gonzalez et al. 2002, Nazu és Thippeswamy 2002).

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 általános a gerincesek körében (Ward et al. 1992, Li et al. 1994, Balaskas et al. 1995, Olsson és Gibbins 1999, Villani 1999, Mirabella et al. 2000). 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 enteralis transzmisszió az eurázsiai kontinesen elterjedt *Helix*-alkatúakban fejlődött ki, ám hiányzik az afrikai kontinesen élő testvércsoportjukból (Achatinacea család). Az evolúciósan legfiatalabb, erősen adaptálódóott Zonitacea családból szintén hiányzik a nitrerg enteralis hálózat. A Zonitacea család több más anatómiai tulajdonságában is eltér a *Helix*-alkatúaktól, idegrendszerükben a ganglionok fúziója, a keringési rendszer progresszív fejlődése, a külső váz rudimentációja figyelhető meg.

A nitrerg jelátvitel tehát nem mondható konzervatívnak a tüdőscsigák filogenezisében.

Az enteralis 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 idegdúcaiban 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 enteralis idegsejtekben, 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 alulexpresszálttsága, vagy (3) egy modulátor molekula 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. SERFŐZŐ 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, tanácsaikat köszönöm.

A kutatást támogatta:

PRCH Diákok a Tudományért Szakalapítvány

OTKA T 42762

VII. HIVATKOZÁSOK

VII. HIVATKOZÁSOK

1. Ábrahám A (1965): Die Struktur der Synapsen im Ganglion viscerale von *Aplysia californica*. Z Mikr Anat Forsch 73:45-59
2. Ábrahám A (1983): Light- and electron-microscopic investigations into the gastro-intestinal nervous system of the vineyard snail (*Helix pomatia*). Z Mikrosk Anat Forsch 97:688-704
3. Adams CE, Freedman R (1997): Nicotinic antagonist alpha-bungarotoxin binding to rat hippocampal neurons containing nitric oxide synthase. Brain Res 776, 111-116
4. Adams CE, Stevens KE, Kem WR, Freedman R (2000): Inhibition of nitric oxide synthase prevents alpha7 nicotinic receptor-mediated restoration of inhibitory auditory gating in rat hippocampus. Brain Res 877, 235-244
5. Alba Y, Villaro AC, Sesma P, Vazquez JJ, Abaurrea A (1988): Gut endocrine cells in the snail *Helix aspersa*. Gen Comp Endocrinol 70:363-73

6. Ayajiki K, Okamura T, Toda N (1994): Neurogenic relaxation by nicotine in isolated cat middle cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 270,795-801
7. Balaskas C, Saffrey MJ, Burnstock G (1995): Distribution and colocalization of NADPH-diaphorase activity, nitric oxide synthase immunoreactivity, and VIP immunoreactivity in the newly hatched chicken gut. *Anat Rec* 243:10-18
8. Beckman JS, Koppenol WH (1996): Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271,1424-1437
9. Belai A, Schmidt HHHW, Hoyle CHV, Hassall CJS, Saffrey MJ, Moss J, Förstermann U, Murad, Burnstock G (1993): Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. *Neurosci Lett* 143:60-64
10. 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
11. Bernstein HG, Heinemann A, Krell D, Marwin C, Bielau H, Danos P, Diekmann S, Keilhoff G, Bogerts B, Baumann B (2002): Further immunohistochemical

- evidence for impaired NO signaling in the hypothalamus of depressed patients. *Ann N Y Acad Sci* 973:91-93
12. Boehning D, Snyder SH (2003): Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 26:105-31
 13. Boer HH, Scot LPC, Veenstra JA, Reichelt D (1980): Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. *Cell Tissue Res* 213:21-27
 14. 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
 15. Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH (1991): Nitric oxide synthase protein and mRNA are directly localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7:615-624
 16. Briggs CA (1992): Potentiation of nicotinic transmission in the rat superior cervical sympathetic ganglion: effects of cyclic GMP and nitric oxide generators. *Brain Res.* 573, 139-146

17. Bullock TH, Horridge GA (1965): Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates. Freeman and Co London, pp. 1321-1332
18. Chantler PD (1983): Biochemical and structural aspects of molluscan muscle. *in* Wilbur K (ed.): The Mollusca, Vol 4. New York: Academic Press, pp. 77-154
19. Chase R (2000): Structure and function in the cerebral ganglia. *Microsc Res Tech* 49:511-520.
20. Chikada M, Imaki T, Seki T, Harada S, Nakajima K, Yoshimoto T, Naruse M, Demura H, Minami S, Takano K (2000): Distribution of c-fos mRNA in the brain following intracerebroventricular injection of nitric oxide (NO)-releasing compounds: possible role of NO in central cardiovascular regulation. *J Neuroendocrinol* 11: 1112-23
21. 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 pulmonata mollusc *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res* 277:565-572
22. Cottrell GA (1997): The first peptide gated ion channel. *Exp Biol* 18:2377-2386

23. Csillik B, Nemcsok J, Boncz I, Knyihar-Csillik E (1998): Nitric oxide synthase and the acetylcholine receptor in the prefrontal cortex: metasynaptic organization of the brain. *Neurobiology (Bp.)* 6, 383-404
24. D'Aniello B, Pinelli C, Judhao AG, Rastogi RK, Meyer DL (1999): Comparative analysis of FMRFamide-like immunoreactivity in caiman (*Caiman crocodilus*) and turtle (*Trachemys scripta elegans*) brain. *Cell Tissue Res* 298:549-559
25. Dockray GJ, Vaillant C, Williams RG, Gayton RJ, Osborne NN (1981): Vertebrate brain-gut peptides related to FMRFamide and Met-enkephalin Arg6Phe7. *Peptides* 2:25-30
26. Dawson VL, Dawson TM (1995): Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neurosci* 1:7-18
27. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991): Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci* 88:7797-780
28. Dawson TM, Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL (1998): Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res* 118:3-11

29. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994): Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl acad Sci USA* 91:4214-4218
30. Elhusseiny A, Hamel, E (2000): Muscarinic - but not nicotinic - acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 298-305
31. Elekes K (1991): Serotonin-immunoreactive varicosities in the cell body region and neural sheath of the snail, *Helix pomatia* ganglia: Electron microscopic immunohistochemical study. *Neuroscience* 42:38-41
32. Elekes K, Nässel DR (1990): Distribution of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res* 262:177-190
33. Elekes K, Nässel DR (1994): Tachykinin-related neuropeptides in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*: an immunocytochemical study. *Brain Res* 661:223-236

34. Elekes K, Hernádi L, Muren JE, Nassel DR (1994): Peptidergic neurons in the snail *Helix pomatia*: Distribution of neurons in the central and peripheral nervous systems that react with an antibody raised to the insect neuropeptide, leucokinin I. *J Comp Neurol* 341:257-272
35. Elekes K, Ude J (1994): Peripheral connections of FMRFamide-like immunoreactive neurons in the snail, *Helix pomatia*: an immunogold electron microscopic study. *J Neurocytol* 23:758-769
36. Elofsson R, Carlberg M, Moroz L, Nezlin L, Sakharov D (1993): Is nitric oxide (NO) produced by invertebrate neurones? *NeuroReport* 4:279-282
37. Elphick MR, Kemenes G, Staras K, O'Shea M (1995): Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding a mollusc. *J Neurosci* 15:7653-7664
38. Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci* 22:3386-91
39. Fehér E, Montague C (1994): Distribution and morphological features of nicotinamid adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) activity

in intrinsic neurons of the Oddi sphincter of the cat.
Neurosci Lett 170:114-6

40. Garcia-Vitoria M, Garcia-Corchon C, Rodriguez JA, Garcia-Amigot F, Burrell MA (2000): Expression of neuronal nitric oxide synthase in several cell types of the rat gastric epithelium. J Histochem Cytochem 48:1111-20
41. Garthwaithe J, Charles SL, Chess-Williams R (1998): Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the rat brain. Nature 336:385-388
42. Gelperin A (1994): Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. Nature 369:61-63
43. Gibson NJ, Nighorn (2000): A Expression of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the developing olfactory system of *Manduca sexta*. J Comp Neurol J 422(2):191-205
44. González A, Moreno N, Lopez JM (2002): Distribution of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the caecilian *Dermophis maxicanus* (amphibia:

- gymnophiona): comparative aspects in amphibians. Brain Behav Evol 60:80-100
45. Grossi L, Falucci M, Lapenna D, Marzio L (1996): Effects of nitric oxide on propagated clusters of spontaneous motor waves in an ex vivo rabbit intestinal preparation. Neurogastroenterol Motil 8:201-5
 46. 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
 47. Haberberger RV, Henrich M, Lips KS, Kummer W (2003): Nicotinic receptor alpha7-subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. Histochem Cell Biol 120, 173-181
 48. 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
 49. 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
50. Hernádi L, Elekes K (1999): Topographic organization of serotonergic and dopaminergic neurons in the cerebral ganglia and their peripheral projection patterns in the head areas of the snail *Helix pomatia*. J Comp Neurol 411:274-287
 51. Huang S, Kerschbaum NH, Engel E, Hermann A (1997): Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail *Helix pomatia*. J Neurochem 69:2516-2528
 52. Huang BS, Leenen FH (2002): Brain amiloride-sensitive Phe-Met-Arg-Phe NH₂-gated Na⁺channels and Na⁺-induced sympathoexcitation and hypertension. Hypertension 39:557-561
 53. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Burns RE (1993): Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. Proc Natl Acad Sci USA 90,8103-8107

54. Jacklet JW (1997): Nitric oxide signalling in invertebrates. *Invertebrate Neurosci* 3:1-14
55. Jiang JK, Ciu JH, Lin JK (2000) Local somathothermal stimulation inhibits motility of the internal anal sphincter through nitrergic neural release of nitric oxide. *Dis Colon Rectum* 43:381-8
56. Kanda T, Takabatake I, Fujisawa Y, Ikeda T, Muneoka Y, Kobayashi M (1989) Biological activities of ganglion extracts from a prosobranch mollus, *Fusinus ferrugineus*. *Hirosh J Med Sci* 38:109-16
57. 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
58. Kerkut GA, Walker RJ (1975): Nervous system, eye and statocyst. In: Fretter V, Peake J eds: *Pulmonates*, pp. 166-176. Academic Press, London
59. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1997): Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-How, why, when and where? *Nitric Oxide* 1:107-120
- Karila P, Shahbazi F, Jensen J, Holmgren S (1995): Enteric

- reflexes and nitric oxide in the fish intestine. J Exp Biol. 198:2405-12.
60. Kobayashi S, Sadamoto H, Ogawa H, Kitamura Y, Oka K, Tanishita K, Ito E (2000): Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Neurosci Res 38(1):27-34
 61. Kobayashi M, Sakata MF (1992): Peptidergic regulation of muscle movements in a prosobranch mollusc, *Rapana thomasi*. Acta Biol Hung 43:159-66
 62. Korneev SA, Picot J, Phillips R, Korneeva EI, O'Shea M (1998): Molecular characterization of NOS in a mollusc, expression in a giant modulatory neuron. J Neurobiol 35:65-76
 63. Krasko A, Schroder HC, Perovic S, Steffen R, Kruse M, Reichert W, Muller IM, Muller WE (1999): Ethylene modulates gene expression in cells of the marine sponge *Suberites domuncula* and reduces the degree of apoptosis. J Biol Chem 274:31524-30
 64. Lamanna G, Costaglion A, Vittoria A, Mayer B, Assisi L, Botte V, Cecio A (1999): NADPH-diaphorase and NOS enzymatic activities in some neurons of reptilian gut

- and their relationships with two neuropeptides. *Anat Embryol (Berl)* 199:397-405
65. Leake LD, Davis MP, Chen D, Moroz LL (1995): An unique model for the analysis of neuronal nitric oxide signaling: the leech CNS. *Acta Biol Hung* 46:135-145
 66. Luchtel D L, Martin A W, Deyrup-Olsen I, Boer HH (1997): Gastropoda: Pulmonata *in* *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Volume 6B: Mollusca II., 459-718. Willey-Liss, Inc.
 67. Li ZS, Young HM, Furness JB (1994): Nitric oxide in neurons of the gastrointestinal tract of an avian species, *Coturnix coturnix*. *J Anat* 184:261-72
 68. Maihofner C, Euchenhofer C, Tegeder I, Beck KF, Pfeilschifter J, Geisslinger G (2000): Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation. *Neurosci Lett* 290:71-5
 69. Martínez A (1995): Nitric oxide synthase in invertebrates. *Histochem J* 27:770-776
 70. Matsumoto T, Nakane M, Pollock JS, Kuk JE, Försterman U (1993): A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase

activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci Lett* 155:61-64

71. Mayer B, Andrew P (1998): Nitric oxide synthase: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Nauny-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358:127-133
72. 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
73. Meyer W (1994): NADPH diaphorase (nitric oxide synthase) in the central nervous system of spiders (Arachnida: Araneida). *Neurosci Lett* 3:165(1-2):105-8
74. 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
75. Mirabella N, Lamanna C, Assisi I, Botte V, Cecil A (2000): The relationships of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-d to nitric oxide synthase, vasoactive intestinal polypeptide, galanin and pituitary

- adenylate activating polypeptide in pigeon gut neurons.
Neurosci Lett 293:147-51
76. Mohr FC, Fewtrell C (1990): The effect of mitochondrial inhibitors on calcium homeostasis in tumor mast cells. Am J Physiol. 258,217-226
 77. Moroz LL, Park JH, Winlow W (1993): Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. NeuroReport 4:643-646
 78. Moroz LL, Radbourne S, Winlow W (1995): The use of NO-sensitive microelectrodes for detection of nitric oxide (NO) production in mollusc. Acta Biol Hung 46:155-167
 79. Moroz LL, Chen D, Gillette MU, Gillette R (1996): Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. J Neurochem. 66,873-876
 80. Moroz LL, Winlow W, Turner RW, Bulloch AGM, Lukowiak K, Syed NI (1994): Nitric oxide synthase-immunoreactive cells in the CNS and periphery of *Lymnaea*. NeuroReport 5:1277-1280
 81. Muneoka Y, Fujisawa Y, Matsuura M, Ikeda T (1991): Neurotransmitters and neuromodulators controlling the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. Comp Biochem Physiol 98:105-14

82. Müller U, Bicker G (1994): Calcium activates release of nitric oxide and cellular distribution of nitric oxide synthetasing neurons in the nervous system of the locust. *J Neurosci.* 14, 7521-7528
83. Nakamura E, Takahashi T, Taniuchi M, Hsu CX, Owyang C (1998): Nicotinic receptor mediates nitric oxide synthase expression in the rat gastric myenteric plexus. *Clin Invest.* 101, 1479-1489
84. 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
85. Nathanson JS, Seavone C, Seanlon C, McKee M (1995) Cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron* 14:781-94
86. Nazu M, Thippeswamy T (2002): Nitric oxide signalling system in rat brain stem: immunocytochemical studies. *Anat Histol Embryol* 31:252-256
87. 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
88. Olgart C, Gustaffson LE, Wiklund NP (2000): Evidence for nonvesicular nitric oxide release evoked by nerve activation. *Eur J neurosci* 12:1303-1309
 89. Olsson C, Gibbins I (1999): Nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract of the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. *Cell Tissue Res* 296:433-7
 90. Ott SR, Jones IW, Burrows M, Elphick MR (2000): Sensory afferents and motor neurons as targets for nitric oxide in the locust. *J Comp Neurol* 10;422(4):521-532
 91. Palumbo A, Di Cosmo A, Poli A, Di Cristo C, d'Iscia M (1999): Calcium/Calmodulin-dependent nitric oxide synthase, NMDAR2/3 receptor subunits and glutamate in the CNS of the cuttlefish, *Sepia officinalis*: Localization in specific neural pathway controlling inking. *J Neurochem.* 3(3):1254-63
 92. Pentreath VW, Berry MS, Cobb JLS (1975): Nerve ending specializations in the central ganglia of *Planorbis corneus*. *Cell Tissue Res* 163:99-110
 93. Perovic S, Seack J, Gamulin V, Muller WE, Schroder HC (2001) Modulation of intracellular calcium and

- proliferative activity of invertebrate and vertebrate cells by ethylene. BMC Cell Biol 2:7
94. 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
 95. Price DA, Greenberg MJ (1977): Purification and characterization of a cardio-excitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. Prep Biochem 7:50-62
 96. Quinson N, Niel JP, Miolan JP (2000): Nitric oxide released by gastric mechanoreceptors modulates nicotinic activation of coeliac plexus neurons in the rabbit. Eur J Neurosci 12:1521-4
 97. Rastogi RK, D'Aniello B, Pinelli C, Fiorentino M, Di Fiore MM, Di Meglio M, Iela L (2001): FMRFamide in the amphibian brain: A comprehensive survey. Microsc Res Tech 54:158-172
 98. Rozhkova EA, Fujimoto N, Sagami I, Daff SN, Shimizu T (2002): Interactions between the Isolated Oxygenase and Reductase Domains of Neuronal Nitric-oxide Synthase. J Biol Chem 277: 16888-16894

99. Sanchez-Alvarez M, Leon-Olea M, Talavera E, Pellicer F, Sanchez-Islas E, Martinez-Lorenzana G (1994): Distribution of NADPH-diaphorase in the perioesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. *Neurosci Lett* 169:51-55
100. Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG (1983): Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* 9:229-234
101. Schuttlewerth CWR, Murphy R, Furness JB (1991): Evidence that nitric oxide participates in nonadrenergic inhibitory transmission to intestinal muscle in the guinea-pig. *Neurosci Lett* 130:77-80
102. Si ML, Lee TJ (2002): Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors on cerebral perivascular sympathetic nerves mediate choline-induced nitrenergic neurogenic vasodilation. *Circ Res* 12, 62-69
103. Teaktong T, Graham A, Court J, Perry R, Jaros E, Johnson M, Hall R, Perry E (2003): Alzheimer's disease is associated with a selective increase in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes. *Glia* 41, 207-211

104. Teng B, Murthy KS, Kuemerle JF, Grider JR, Sase K, Michel T, Makhoulf GM (1998): Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit smooth muscle cells. *Am J Physiol* 275, G342-351
105. Thomas E, Pearse AGE (1961): The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie* 2:266-282
106. Xue C, Pollock J, Schmidt HH, Ward SM, Sanders KM (1994): Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst.* 49,1-14
107. Yang HY, Majane EA (1990): Mammalian Phe-Met-Arg-Phe-NH₂-peptides: Structure, biological activity and distribution. *Prog Clin Biol Res* 342:86-91
108. Young HM, Anderson CR, Furness JB (2000): Nitric oxide in the peripheral autonomic nervous system. In: Steinbusch HWM, deVente J, Vincent SR (eds.): *Functional Neuroanatomy of Nitric Oxide System*. Pp. 215-249. Elsevier Amsterdam, New York, Oxford
109. Van Noorden CJ, Butcher RG (1986): A quantitative histochemical study of NADPH-ferrihemoprotein reductase activity. *Histochem J* 18,364-370

110. deVente J, Hopkins DA, Markering-van Ittersum M, Emson PC, Schmidt HHHW, Steinbusch HWM (1998): Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neurosci* 87:207-241
111. 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
112. Virgilli M, Monti B, LoRusso A, Bentivogli M, Contestabile A (1999): Developmental effects of in vitro inhibition of nitric oxide synthase in neurons. *Brain Res* 839:164-172
113. Villani L (1999): Developmental pattern of NADPH-diaphorase activity in the peripheral nervous system of the cichlid fish *Tilapia mariae*. *Eur J Histochem* 43:301-10
114. Walker RJ, Bascal Z, White AR, Pedder S, Franks CJ, Muneoka Y, Holden-Dye L (1995): Actions of neuroactive peptides and nitric oxide on *Ascaris*, *Achatina* and *Helix* tissues. *Acta Biol Hung* 46:183-195

115. Waldman S, Murad F (1997): Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmac Rev* 39:163-196
116. Wang X, Morishita F, Matsushima O, Fujimoto M (2000): *Carassius* RFamide, a novel FMRFa-related peptide, is produced within the retina and involved in retinal information processing in cyprinid fish. *Neurosci Lett* 289:115-118
117. Ward SM, Xue C, Shuttleworth CW, Bredt DS, Snyder SH, Sanders KM (1992): NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization of canine proximal colon. *Am J Physiol* 263-277-284Zayas RM, Qazi S, Morton DB, Trimmer BA (2000): Neurons involved in nitric-oxide mediated cGMP signalling in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* 419:422-38
118. Zayas RM, Quazi S, Morton DB, Trimmer BA (2002) Nicotinic acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. *J Neurochem.* 83, 421-431.

VIII. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Röszer 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. Röszer 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. Röszer 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. Röszer T. Enterális nitrerg szabályozás az evolúció korai szakaszában. Magyar Anatómus Társaság Konferenciája, 2001. június, Debrecen
2. Röszer 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. Röszer 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. Röszer 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. Rószér T, Czimmerer Zs, 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 (in press) [IF:1,03]

Kötetben megjelent konferencia-összefoglalók száma: 8

A jelölt további tudományos tevékenysége

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 (megjelenik 2004. szeptemberben)

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

IX. SUMMARY

IX. SUMMARY

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

Introduction

Nitric oxide (NO) is an evolutionarily conserved signal molecule which mediates several function of the nervous system. NO is produced in a five electron oxidation of the amino acid L-arginine to L-citrulline by nitric oxide synthase (NOS). NOS containing cells are involved in the central ganglia of nemathelminths, annelids, gastropods, cephalopods, crustaceans, insects, chelicerates and echinoderms. The highly diffusible NO can enter an adjacent target cell as an intercellular messenger molecule and enhance the production of the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP) from guanosine triphosphate. Neuromodulation and neuroprotection via the NO/cGMP signaling mechanism is essential for some processes of the chemoreception and motor control, furthermore the synaptic potentiation in learning of the invertebrate nervous systems. In vertebrates, tissue specific

NOS isoforms, such as endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) and inducible (iNOS) are known. Some invertebrate-type NOS isoforms have been also isolated and characterized.

The aim of this study

The balance of enzymatic NO production is a crucial step in the NO signaling because NO can not be stored in neurons since its high ability to diffusion through biological membranes. Neuronal NOS metabolises L-arginine to NO and L-citrulline in a Ca^{2+} /calmodulin dependent manner in vertebrates, therefore the elevation of intracellular Ca^{2+} concentration through glutamate activated NMDA type Ca^{2+} channels or via nicotinic acetylcholine receptor activation is a key trigger of NO synthesis. In the insect brain not only the activity but also the intracellular localization of NOS is influenced by cytosolic Ca^{2+} concentration. In bivalvian hemocytes, morphine induced Ca^{2+} -transients can contribute to enhanced NO liberation. Although known gastropod type NOS enzymes share some structural homologies with the mammalian type nNOS they possibly liberate NO in a Ca^{2+} independent way.

Although we know the distribution of NOS and partially the function of NO in the nervous system, we have little information on the neurochemical signals affecting the NOS catalytic activity.

The aim of our study is to describe extracellular signals leading to enhanced or decreased NOS activity by histochemical and biochemical methods.

Materials and methods

In this work we used the central ganglia of *Helix lucorum* (Pulmonata, Gastropoda) and the enteric neuronal networks of several pulmonate snails, as alternative experimental paradigms.

The NOS-containing neurons were visualized by the standard NADPH-diaphorase (NADPH-d) histochemical reaction. The NO production of isolated tissues was detected by the colorimetric measurement of the NO derived nitrite.

An immunohistochemical method was used to label the invertebrate type neuropeptide FMRFamide-containing nerve cells. The effects of L-arginine, conventional NOS inhibitors, FMRFamide, furthermore FMRFamide receptor blocker amiloride hydrochloride were tested on the NO production of

neural tissues. The effect of L-arginine and NOS inhibitors were recorded on the isometric tension changes of intestinal muscles by an isometric transducer system.

Conclusion

The main findings of the present dissertation are summarized below:

- (1) The topography of NADPH-d labeled, NOS-containing neurons and enteric networks was described in the central ganglia of *Helix lucorum* and in the enteric nervous system of several families of the Pulmonate subclass.
- (2) The L-arginine dependent nitrite production was detectable both in the central ganglia and in the enteric networks. The nitrite formation was confined to the NADPH-d positive neural tissues and was reduced by conventional NOS inhibitors. Therefore the nitrite production of NADPH-d reactive tissues can be considered as an indicator of their NOS activity.
- (3) Anatomical connection was found between NOS containing and FMRFamide producing central

neurons in *Helix lucorum*. The FMRFamide containing varicosities around the nitrergic cell surfaces can be the sites of an FMRFamidergic transmission to NO liberating cells.

- (4) The intraganglionic NOS activity could be enhanced by FMRFamide. The known FMRFamide-receptor blocker amiloride-hydrochloride abolished the effect of FMRFamide.
- (5) The midintestinal motor activity could be influenced by L-arginine and NOS-inhibitors. The NO seems to be a smooth muscle relaxant agent in the investigated organisms.
- (6) In the hypometabolic dormant states of *Helix lucorum*, the enteric NO synthesis was blocked, although the organization of the nitrergic network was not altered during the resting periods. In dormancy, L-arginine could not influence the enteric motor activity.