

XXXI. OTDK Biológia Szekció

***Az *Eisenia fetida* embriók fejlődése során megjelenő
GABA (gamma-aminovajsav) immunreaktív struktúrák***

Készítette: **RUMPLER ÉVA**

Biológus MSc I.

Témavezető: **Dr. (habil.) MOLNÁR LÁSZLÓ**

Pécsi Tudományegyetem

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1. 1. Modellállatunk az <i>E.fetida</i> és az embrionális fejlődés	3
1. 2. Az embrionális fejlődés szakaszolása	7
1. 3. Neurotranszmitterek.....	8
2. Célkitűzés	10
3. Anyag és módszer	10
3.1. Kísérleti állatok tartása és előkészítése.....	10
3.2. GABA immunhisztokémia	11
3.3. A hiszto- és citokémiai eredmények dokumentálása és képszerkesztés	11
4. Eredmények	12
5. Eredmények megbeszélése	19
6. Összefoglalás	23
7. Irodalomjegyzék	24
8. Köszönetnyilvánítás	28
9. Nyilatkozat	29

1. Bevezetés

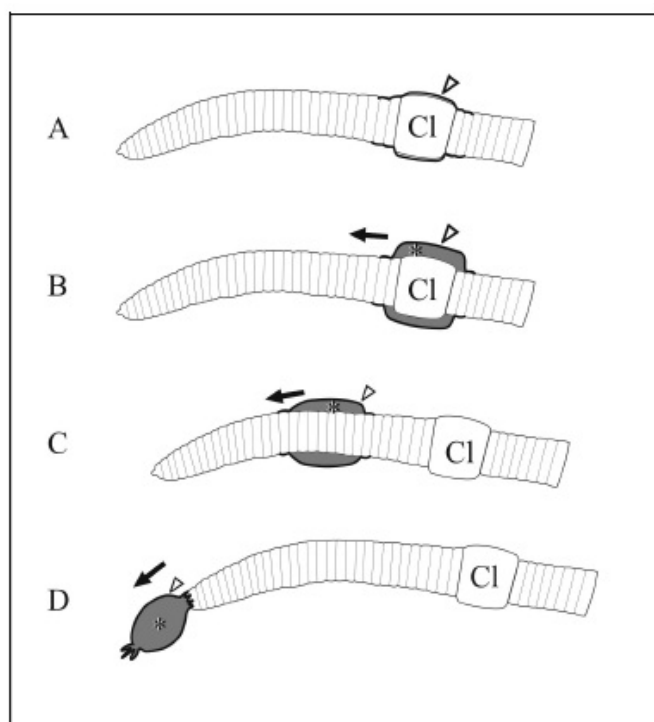
1.1. Modellállatunk az *E. fetida* és az embrionális fejlődése

A kevésértéjű gyűrűsféregek közé tartozó trágyagiliszta hosszú történettel rendelkezik az összehasonlító embriológiában és morfológiában. Számos Clitellata-nál (így az *E. fetida*-nál is) eltűnt az ősi Annelidákra még jellemző szabad lárvaállapot, és a teresztrializálódás következtében olyan reprodukív folyamatot alakítottak ki, melyben az embriók speciális zárt térben, ún. kokonokban található fehérjékkel táplálkoznak, így nem függenek a környezet nyújtotta táplálékmennyiségtől (1. ábra).



1. ábra: A reprodukív folyamat során létrehozott kokon (A); a kokon és a benne lévő embriók (B), a kokonból eltávolított embrió (C)

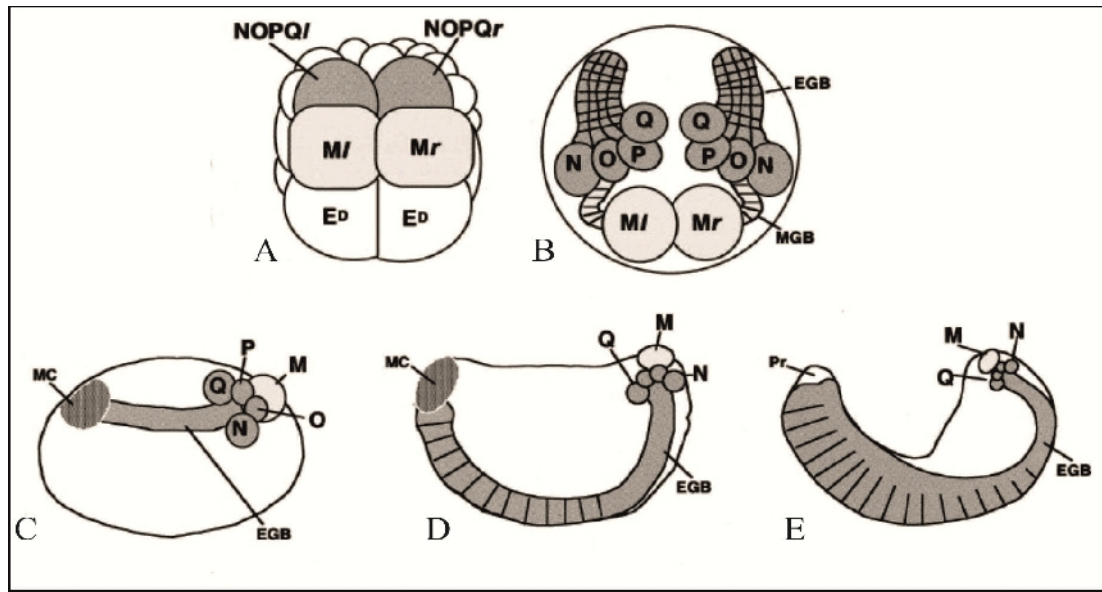
A párosodás után a felnőtt egyeden, az ivarszervek mögött erősen megduzzadt nyereg (clitellum) található. A nyereg a 30-32. szelvény tájékán helyezkedik el és mirigysejtekben gazdag. Ezen mirigysejtek nagy mennyiségű váladékot választanak el, amely a párosodáskor a két egyed összetapadását biztosítja, majd később kissé megszilárdul és mintegy tokot képez a nyereg körül. Az állat testének mozgatásával a képződményt a feji vég irányába tolja (2. ábra). A női ivarnyílásnál (14. szelvény) bele kerülnek a petesejtek. Tovább előre haladva, a párosodáskor kölcsönös hímvarsejtcsere útján az ondótartályba jutatott, és eddig itt tárolt hímvarsejtek szintén bele kerülnek a képződménybe (ondótartály nyílásai: 10-11. szelvény). Ezután megtörténik a megtermékenyítés. A feji végről lecsúszó tok nyitott végei összetapadnak, és az így kialakuló kokonban fejlődnek ki a giliszták (ZBORAY, 1992).



2. ábra: Az *E. fetida* kokonrakási folyamata (A-D); Jelölések: Cl: clitellum; nyílhegyek: kokonfal; nyilak: kokon haladásának iránya; csillag: szikalbumen (BOROS és mtsai, 2008)

Az embrionális fejlődés időtartalma erősen függ a külső környezet hőmérsékletétől (22-24°C-on 23-27 nap). Egy kokonban általában 3-7 darab megtermékenyített petesejt található, melyek fehérjékben és szikanyagokban gazdag glikolipoproteideket és glikoproteideket tartalmazó kokonfolyadékban fejlődnek (WILSON, 1887; ROUABAH-SADAoui és MARCEL, 1995). A kokonalbumen tápanyagokat, védőfehérjéket és hormonokat (pl. PACAP, CTR, periviscerokininek) is tartalmaz (Boros és mtsai, 2010, Boros és mtsai, publikálatlan eredmények). Az embriók szikanyaga mérsékelt mennyiségben van jelen, a teljes tápanyag szükségletet az embriogenezis alatt nem tudja fedezni, így a kokonban lévő albumen fogyasztása feltétel a kikelési állapot elérésében. Az albumen felszívása korán jelentkezik az embriogenezis során. Ahhoz, hogy ez megvalósulhasson összehangolt izommozgás szükséges a garatfalban. Az izommozgás kialakításában, vagyis a garatfal innervációjában a sztomatogasztrikus idegrendszer játszik fontos szerepet. Így a kokonalbumen felszívásának feltétele, a sztomatogasztrikus ganglionok fejlődésének korai embrionális állapotban. Az embriók fejlődése a kokonalbumen mennyiségétől és minőségétől jelentős mértékben függ (BOROS és mtsi., 2008). Versengés alakul ki a fejlődő embriók között az albumen hasznosításáért. Egymás érzékelésében a primer érzékhámsejtek játsszák a fő szerepet,

melyek a központi idegrendszerrel kommunikálva tájékoztatják az embriót a környezet ingereiről.



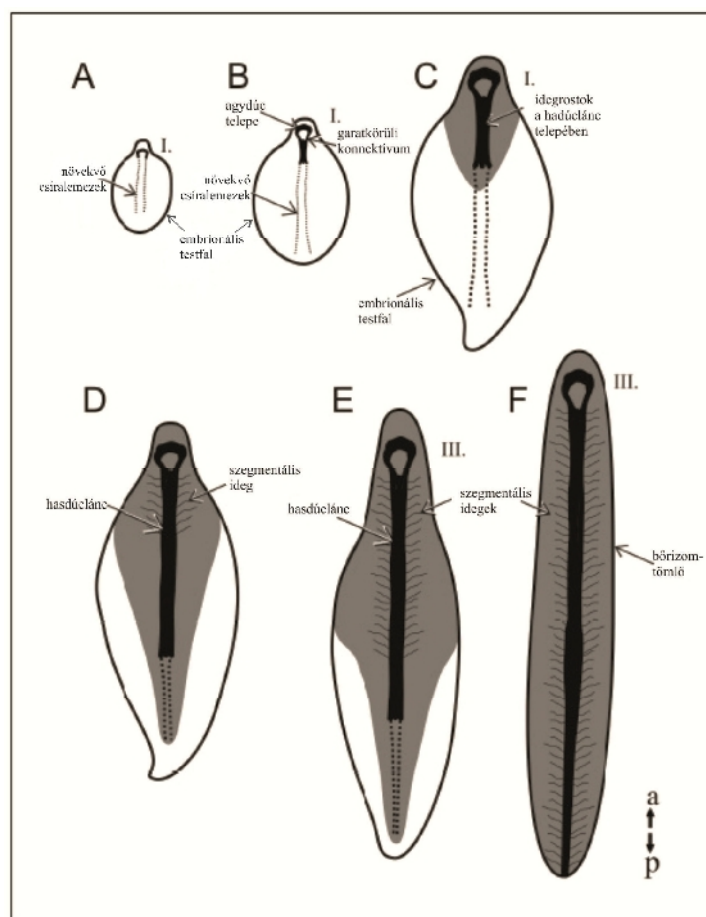
3. ábra: Az oligochaeta gyűrűsféreg embrionális fejlődésének folyamata. (A) Ml és Mr: bal illetve jobb mezoteloblaszt, NOPQl és NOPQr: ektoteloblaszt prekursorok bilaterális párja, E^D: endodermális prekursor sejtpár. (B) 2 napos embrió; NOPQ mindkét oldalon ektoteloblasztokat (N, O, P, Q) termelt; ektodermális csíralemez (EGB) fejlődik az ektoteloblasztokból mindkét oldalon; mezodermális csíralemez (MGB) növekszik az M teloblasztokból. (C-E) Ektodermális csíralemez morfogenezise. Embriók 2,5 (C), 4 (D) és 6 (E) nappal a mezoteloblasztok kialakulása után; a csíralemez (EGB) kapcsolt az anterior véggel ún. mikromera sapka (MC) által, és kezdetben az embrió dorzális részén helyezkedik el (C); a csíralemez (EGB) a növekedés során folyamatosan íves formát vesz fel, miközben az embrió ventrális középvonalához simul (D); dorzális irányban megkezdődik a csíralemez kiterjedése (E); Pr: prostomium. (SHIMIZU és NAKAMOTO, 2001; módosítva)

Az *E. fetida* petesejtjei poli- és telolecitálisak. A trágyagiliszta embriói spirálisan barázdálódó kokonból fejlődnek ki. A fejlődés 4. napján alakul ki a gasztrula és a 6. napon nyolc ektoteloblaszt található jellemző elrendezésben a ventrális felszínen. Két prekursor sejtből származnak a teloblasztok: az ektoteloblaszt sejtekből (N, O, P, Q) és a mezoteloblaszt sejtekből (M-sejtek) (3. ábra). A teloblasztok ismétlődő aszimmetrikus osztódáson esnek át, miközben kisméretű blasztsejtek láncát hozzák létre (STOREY, 1989). A teloblasztok az embrió poszterior végén helyezkednek el (SHIMIZU és NAKAMOTO, 2001).

Az N teloblaszt alakul ki először a fejlődés 3. napján a dorzális felszínen, és az OPQ prekursor sejtekkel együtt vándorol a ventrális felszínhez a gasztruláció folyamán. A 3. nap végére a Q teloblaszt is kialakul az OPQ prekursor sejtéből. Az osztódás után a Q teloblaszt az N teloblaszttól és az OP prekursor sejtől laterálisan helyezkedik el. Az OP prekursor sejt a 4. napon osztódik, így létrejön az O és P teloblaszt is. Ezek a sejtek az N és a Q teloblaszt között kissé poszterior irányban helyezkednek el (DEVRIES, 1973).

Az ektoteloblasztok mellett a mezoteloblasztok is sorozatos inekvális osztódáson esnek át. Az osztódások során hozzák létre az embrió mindkét oldalán poszterior-anterior irányú, ventro-laterálisan elhelyezkedő csíralemezeket (3. ábra). A mezoderális csíralemez irányítja a központi idegrendszer szegmentálódását (DEVRIES, 1983; SHIMIZU és NAKAMOTO, 2001). A központi idegrendszer progenitor sejtjei (neuroblasztok) a neuroektodermából származnak. Az ektoteloblasztok utódsejtjei hozzák létre a neuronális csíralemezeket, amelyekből a ganglionok képződnek (ARAI és mtsai, 2001).

Az idegrendszer fejlődése anterior-poszterior irányú tengely mentén zajlik. A sztomodeum-telep kialakulása közben, az anterior záródott ektoderális csíralemez sejtjei folyamatosan osztódva hozzák létre az agydúc telepét. Az agydúc ekkor nyúlványtalan neuroblasztokból áll (4. A-B ábra). Az ektoderális csíralemezek ventrális záródása folyamatos. A záródott szakaszokon megjelennek antero-poszterior irányban a szelvényenkénti gangliontelepek (4. A-B ábra). Akkor jelennek meg először a garatalatti dúc és az anterior gangliontelepek neuropiljében a rostok, amikor a csíralemezek ventrális záródása eléri a testhossz $2/3$ -át (4. C ábra). Ezzel párhuzamosan az agydúc telepében és a garatkonnektívumokban is kialakulnak az első rostok, és az agytelep poszterior irányba hátracsúszik (4. D ábra), ez a folyamat más gyűrűsféreg fajban is leírásra került (MYOHARA, 2004). Eközben az anterior testvég epitéliumában megjelennek az első szenzoros sejtek és az első sertetokok, továbbá az elülső testrész ganglionjaiban kialakulnak az első szegmentális ideggyökök (4. D ábra). Amikor az agydúc a végleges helyére került (3. szelvény) hasdúclánc ganglionjainak többségében már rostok találhatók és a laterális idegek is megjelentek. Ebben az állapotban átlagosan 10 szelvény már záródott az anterior testvégen, és sok szelvényben jelen vannak a szenzoros sejtek (4. E ábra). A kikelés előtt közvetlen a testszelvények záródtak, az idegrostok és laterális idegek minden ganglionban kialakultak, továbbá az óriásrostok is kialakultak teljes egészében. (4. F ábra). Az embrionális fejlődés folyamán az idegrendszer sejtjeinek száma növekedést mutat, de a kikelés után a sejtszám még változik, és a központi idegrendszer tovább differenciálódik (SOLT és MOLNÁR, 2001).



4. ábra: *E. fetida* embriók különböző fejlettségű állapotainak vázlatrajza. A: E0; B: E1; C: E2; D: E3; E-F: E4. Jelölések: szürke terület: hosszanti és körkörös izomréteg; a: anterior oldal; p: proszterior oldal; római számok: az agydúc helyének szelvéyszáma. (PROSSER, 1933; módosítva)

1.2. Az embrionális fejlődés szakaszolása

Az embrionális fejlődés öt szakaszra osztható. E0 szakasz: a zigóta állapottól 25 sejtés embrió állapotig tart. A zigóta holoblasztikus osztódása a csíralemezek kialakulását, és az ezt követő száj és garat fejlődését eredményezi. Az E1-es szakaszban a meghosszabbodott csíralemezek az embrió ventrális középvonalán láthatók és a száj és garat kialakulása befejeződik (BOROS és mtsai., 2008). Az albumin az embrióba kerül, és biztosítja a táplálékot a következő fejlődési szakaszokhoz (DEVRIES, 1983). Az E2-es fejlődési szakaszban a csíralemezek dorzális irányba növekednek, valamint az egyesülésük megfigyelhető az anterior régióban. A szegmentáció megkezdődik az anterior testrészen. E3 szakasz: a csíralecek egyesülése már a poszterior testrégiókban is megfigyelhető és a test szegmentációja jellemző, viszont még nagy mennyiségű albumin található a test középső részén. Az E4-es szakaszban a

kikelés előtt a test meghosszabbodik és teljes mértékben szegmentálódott, kialakult a karakterisztikus gilisztaforma (BOROS és mtsai., 2008).

1.3. Neurotranszmitterek

Irodalmi adatokból ismert, hogy a gyűrűsférgek idegsejtjeiben a klasszikus neurotranszmittereken (acetilkolin, adrenalin, noradrenalin) kívül, aminosavak és aminosavszármazékok is lehetnek kémiai ingerületátvivők (KERKUT és mtsai., 1967; MYHRBERG, 1967). Köztudott, hogy az embriogenezis és a neurogenezis egyaránt genetikailag determinált, ám a különböző fejlődési folyamatok epigenetikus faktorok (neurotranszmitterek/neuromodulátorok) által befolyásoltak. A gerinctelenek neurogenezisében a szerotonin és az FMRF-amid szerepét vizsgálták. A szerotonin a neuronok differenciálódása, az axonok növekedésére, elágazására van hatással, továbbá a perifériás funkciók kialakulásában és a gangliogenezisben játszhat szerepet (KOZA és CSOKNYA, 2004; KOZA és mtsai, 2006). Míg az FMRF-amid általános morfogenetikus hatással rendelkezik csigákban (CROLL és VORONEZHSKAYA, 1995). Feltehetően a gerincesekben leírt folyamatokhoz hasonlóan a gyűrűsférgekben is befolyásolja a neuroblasztok proliferációját és differenciálódását is, így például serkenti az axonok növekedését.

Az *E. fetida* idegrendszere egy multitranszmitteres rendszer, de vannak korán expresszálandó vegyületek, így például a GABA. A gerinces idegrendszerben történő felfedezése óta a GABA inhibitoros folyamatokban való részvételét számos tanulmány bizonyította. Felismerték, hogy nem csak a centrális, hanem a perifériás idegrendszerben is transzmitterként funkcionál gerincesekben és gerinctelenekben egyaránt (ERDŐ és WOLFF, 1990). Jelenlétét kimutatták a kifejlett földigiliszta egyedek központi és perifériás idegrendszerében (TELKES és mtsai., 1996). A GABA excitatórikus és inhibitoros hatással működhet a csiga központi idegrendszerében (HATAKEYAMA és ITO, 2000). *C. elegans*ban GABA-aktiválta kationcsatornák révén excitatórikus hatásokat is kifejt (GOILLARD és MARDER, 2003). *Lymnaea stagnalis* procerebrum tanulmányozásakor leírták, hogy a GABA gátlásoldást idéz elő, ezáltal fokozva, modulálva a serkentő bemeneteket (KOBAYASHI és mtsai, 2012). Fontos felismerés, hogy a GABA-nak nem csak a neurotranszmisszióban lehet szerepe. A GABA mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben neurotrofikus faktorként funkcionálhat, mely részt vesz a neuronális fejlődés szabályozásában (ERDŐ és WOLFF, 1990). Lehetséges hormonális szerepét írták le rákban (SULJAK és mtsai, 2010).

Emellett trofikus faktorként funkcionálhat az idegrendszer fejlődésében és valószínűsíthető, hogy kemoattraktánsként vagy pozícionális targetként szolgál gerinces szervezetekben (FOA és COOK, 1998). A patkány központi idegrendszerét vizsgálva leírták, hogy a GABA serkenti a kemokinézist, tehát a neuronok szignál felé történő mozgását (BEHAR és mtsai, 1994). Gerinctelenekben is leírtak hasonló jelenséget, az inhibitoros GABA előbb jelenik meg, mint az excitatórikus glutamát a *Cherax drestructor* fejlődése során. Az inhibitoros motoneuronok valószínűleg befolyásolják az aktivitásfüggő folyamatokat a testfalban, beleértve a serkentő innerváció kialakítását és stabilizációját (FOA és COOK, 1998).

2. Célkitűzés

Az irodalmi adatok áttekintése után ismert, mely transzmitterek szabadulnak fel az *E. fetida* embriogenezise során a központi és perifériás idegrendszerben. A GABA nemcsak transzmitterként, hanem növekedési faktorként is funkcionál. (FOA és COOK, 1998; FERGUSON és MCFARLANE, 2002). Képesek lehetnek befolyásolni a neuronok növekedését, fejlődését. Részt vehet a serkentő innerváció kialakításának regulációjában, illetve a serkentő bemenetek modulálásával befolyásolhatja a fejlődést. Így vizsgálataink során az embrionális fejlődés GABAerg rendszerére koncentráltunk. Célunk az volt, hogy detektáljuk az embriogenezis során megjelenő és változó GABA immunreaktív struktúrákat, és lehetséges funkcióikra következtessünk.

Koza és Csoknya (2004) publikált eredményeket az *E. fetida* GABAerg elemeinek megjelenéséről az embrionális fejlődés során. Megerősítették a GABA korai megjelenését mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben, emellett az anterior-poszterior irányú az fejlődést. Azonban részletesen nem tanulmányozták a GABAerg struktúrák mintázatát, illetve fejlődésük kinetikáját, továbbá az általuk alkalmazott embrionális fejlődés szakaszolás eltér az irodalomban szereplőtől.

3. Anyag és Módszer

3.1. Kísérleti állatok tartása és előkészítése

Kísérleti állatunk a trágyagiliszta (*Eisenia fetida*, Sav.) (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae), melynek embrióit vizsgáltuk. Standard laboratóriumi körülmények között (hőmérséklet 22°C, 12 órás megvilágítás, folyamatos légcseré; tenyésztalaj összetétele: 50% virágföld (pH 6,8-7,2), 20% kvarchomok, 10 % tőzeg és 20 % reszelt burgonya) tartottuk a kikelt és ivarérett egyedekkel együtt a kokonban fejlődő embriókat.

Közvetlenül a vizsgálatok megkezdése előtt gyűjtöttük ki a különböző fejlettségi állapotú embriókat tartalmazó kokonokat a tenyészetekből. A fejlettségi állapotra a kokonok falának színéből következtettünk, illetve sztereomikroszkóp alatt a fal áttetszősége miatt a különböző fejlettségű embriók láthatóak voltak.

A kokonokat csapvízzel nedvesített papírtörllővel tisztítottuk. Majd Sylgard alapú bonctálban, 7,5 pH-jú gilisza Ringerben (102 mM NaCl, 1,6 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂ és 5 mM Tris-HCl puffer) boncoltuk ki az embriókat.

3.2. GABA immunhisztokémia

Az embriókat a kokonból való eltávolítás után szobahőmérsékletű Boer-fixálóban (3 ml pikrinsav telített oldata, 1 ml 25%-os glutáraldehid, 40 µl jégcet frissen összeállított keveréke) 3 órán át, sötétben fixáltuk. A mintákat 4 x 15 percig 70%-os alkoholban mostuk, majd elszíntelenedésig PBS-ben (phosphate buffer saline), többszöri váltás által, hozzávetőlegesen 1 napig. Triton-X 100 tartalmú pufferben permeabilizáltuk 2 héten át. Ezt követően szokványos háromlépéses indirekt immunhisztokémiai eljárással (avidin-biotin-tormaperoxidáz módszer) és diaminobenzidines (DAB) vizualizálással tettük láthatóvá a GABAerg elemeket az embriókban (MOLNÁR ÉS GÁBRIEL, 2001).

Endogén peroxidáz gátlást hajtottunk végre 1 órán át. Elegyünk: 500 µl metanol, 470 µl desztillált víz és 30 µl hidrogén-peroxid. Ezt követően mintánkat 3 x 10 percig PBS-ben mostuk. Az előinkubálás Triton-X-ABS-ben 1 órán át zajlott. A primer antiszérumot 2 napig hagytuk a mintákon. Ezt követően 1 napon keresztül, többszörös váltásban, Triton-X tartalmú PBS-ben mostuk a mintákat. A szekunder antitestet szintén 1 napig hagytuk hatni. A reakciót követően a mintákat 1 napon keresztül PBS-ben mostuk. A tercier oldat ugyancsak 1 napon át reagálhatott a mintákkal. PBS-ben történő alapos mosást követően, a hívás 3%-os DAB (5 perc előinkubálás) és tízszeresen hígított hidrogén-peroxid elegyében történik, mikroszkópos kontroll alatt. Hívásleállítás: PBS-sel.

Primer antitestünk specifitásáról GABA-preabszorpciós teszttel győződtek meg korábban a tanszéken dolgozó munkatársak. Ha a primer antitestet az inkubálás során nem adták hozzá a reakciósorhoz, a szokványosan alkalmazott inkubációs idő elteltével sem kaptak specifikus festődést az embrió idegrendszerében.

3. 3. A citokémiai eredmények dokumentálása és képszerkesztés

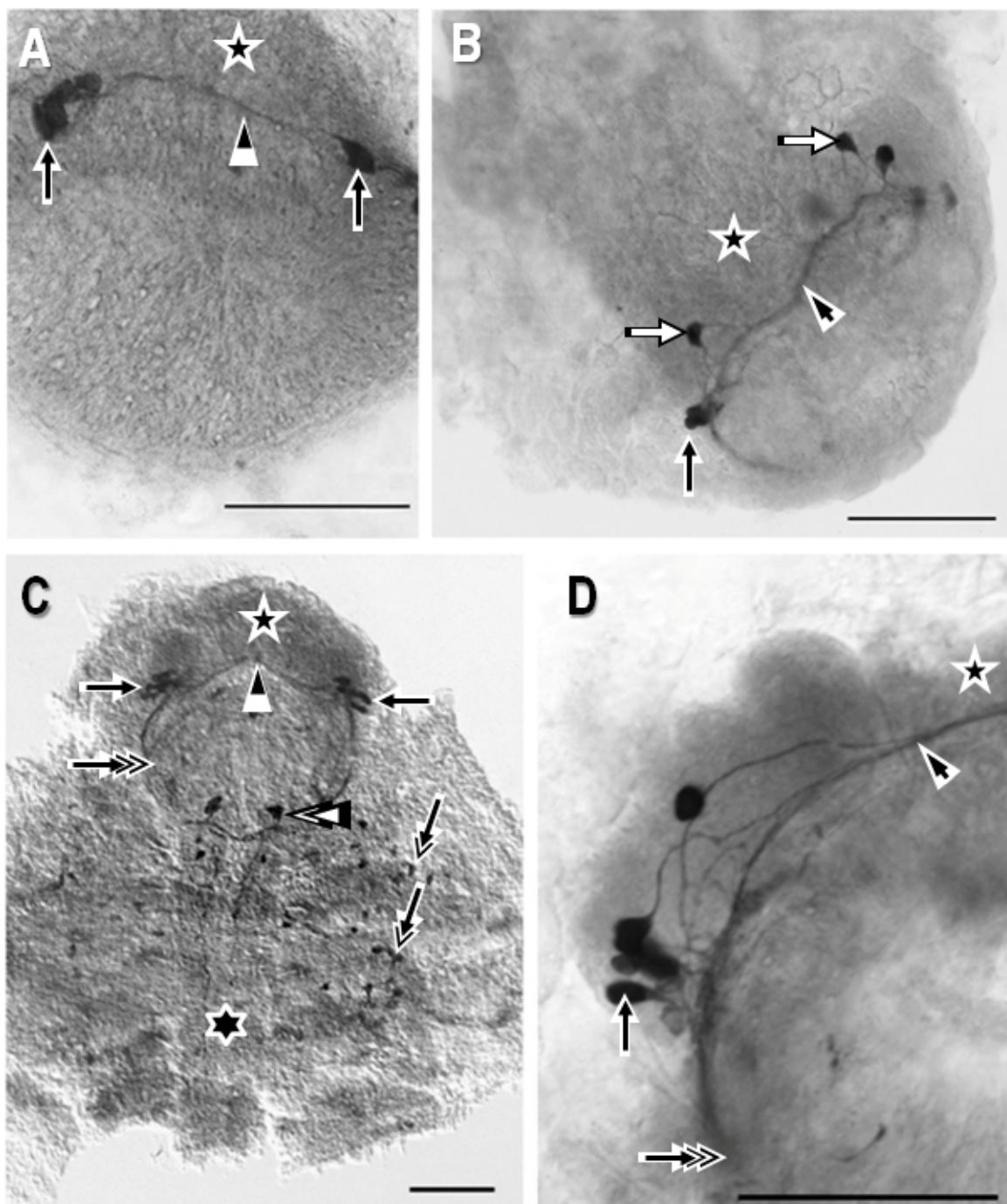
Az embriókból készített preparátumokat Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóppal vizsgáltuk, és azokról digitális mikrofotókat készítettünk. Az eredmények kiértékelése során, a preparátumokról készített fotókat CorelDraw és Paint programok segítségével szerkesztettük.

4. Eredmények

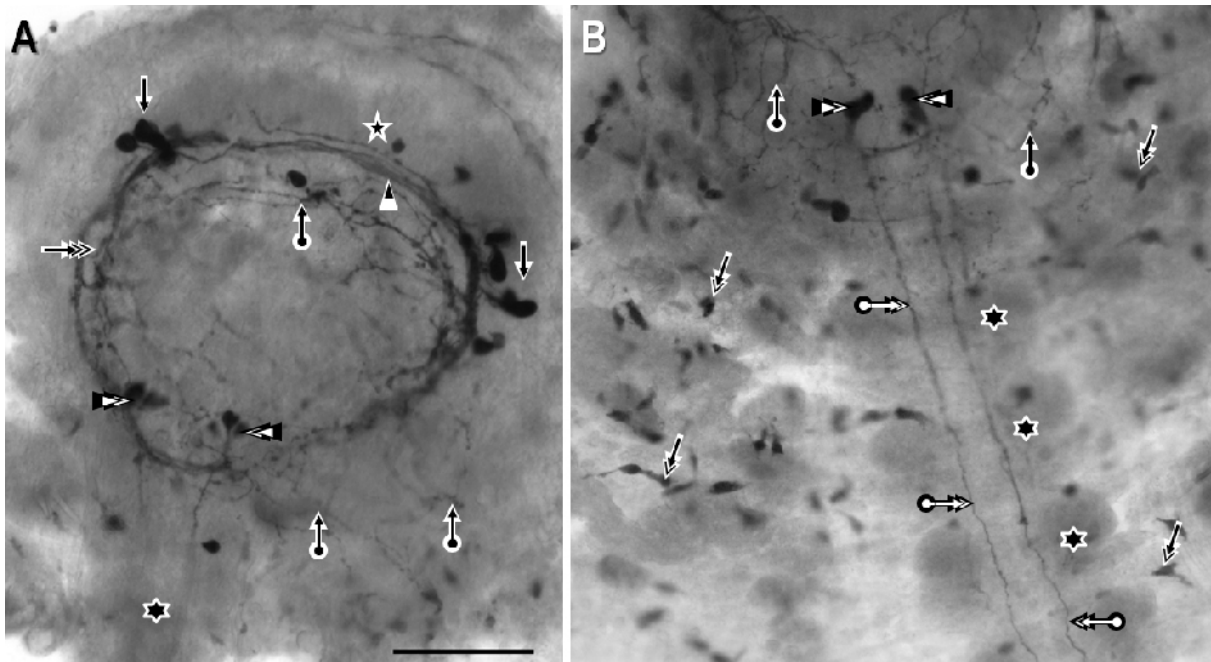
Immuncitokémiai vizsgálataink szerint a GABA az embrionális fejlődés korai szakaszában már akkor expresszálódik az *E. fetida* szervezetében, amikor a központi idegrendszer telepe kialakul és megindul a stomodeum differenciálódása (E1 fejlődési állapot kezdete). Az első jelölt neuronok (4-6 db) a sztomatogasztrikus ganglionok telepében jelennek meg (5. A ábra). A sztomatogasztrikus ganglionok méretének növekedése ebben a stádiumban nem jár együtt a GABA-immunreaktív sejtek számának emelkedésével, de a belőlük kiinduló nyúlványok fejlett rosthálózatot alakítanak ki az agydúc és a garatalatti dúc telepeiben (5. D ábra). Az E1 fejlődési állapot végén jelennek meg az agydúc és garatalatti dúc első jelölt neuronjai (5. B és C ábra). Az agydúc laterális részein megfigyelhetők egy-egy bipoláris neuron nyúlványai, amelyek az agydúc fejlődő neuropiljébe és a garatkonnektívumokba futnak. Ekkor jelennek meg a garatalatti dúcban (5. C ábra) azok a jelölt neuronok, amelyek nyúlványai a későbbiekben egyértelműen azonosítható polisegmentális interneuronális rostrendszert építik fel.

Az előbélben néhány gyengén festődő sejt (feltehetően primér érzékhámsejt) már ekkor felismerhető. Az elülső testszelvények hámrétegében megfigyelhető szabálytalan elrendeződésű sejtek a fejlődő bőrizomtömlő primér érzékhámsejtjei (5. C ábra). Megállapítható, hogy a bőrizomtömlő GABA-IR primér érzékhámsejtjeinek megjelenése és differenciálódása követi a központi idegrendszer antero-poszterior irányú differenciálódási folyamatát.

Az E2 fejlődési stádiumban indul meg a GABA-immunreaktív (GABA-IR) sejtek számának növekedése a központi idegrendszerben, és ekkor már nagy számban figyelhetők meg az erősen festődő sejtek a differenciálódó szájüregben és garatban, valamint az elülső testszelvények hámrétegében. A GABA-IR sejtszám növekedésével párhuzamosan megfigyelhető a nyúlványrendszer intenzív fejlődése és a jellegzetes rostrendszer kialakulása mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben. A legfeltűnőbb változás a hasdúcláncban és az előbélben figyelhető meg. A hasdúcokban az antero-poszterior fejlődési iránynak megfelelően egymás után jelennek meg az első szegmentális ideg mögött elhelyezkedő perikaryonok, amelyek nyúlványai a polisegmentális rostrendszer kialakításában vesznek részt (6. B ábra). Az előbélben jól fejlett rostrendszer, a száj- és garatplexus kialakulása figyelhető meg (6. A ábra). Az agydúc sejtszáma ebben a fejlődési állapotban változatlan marad.



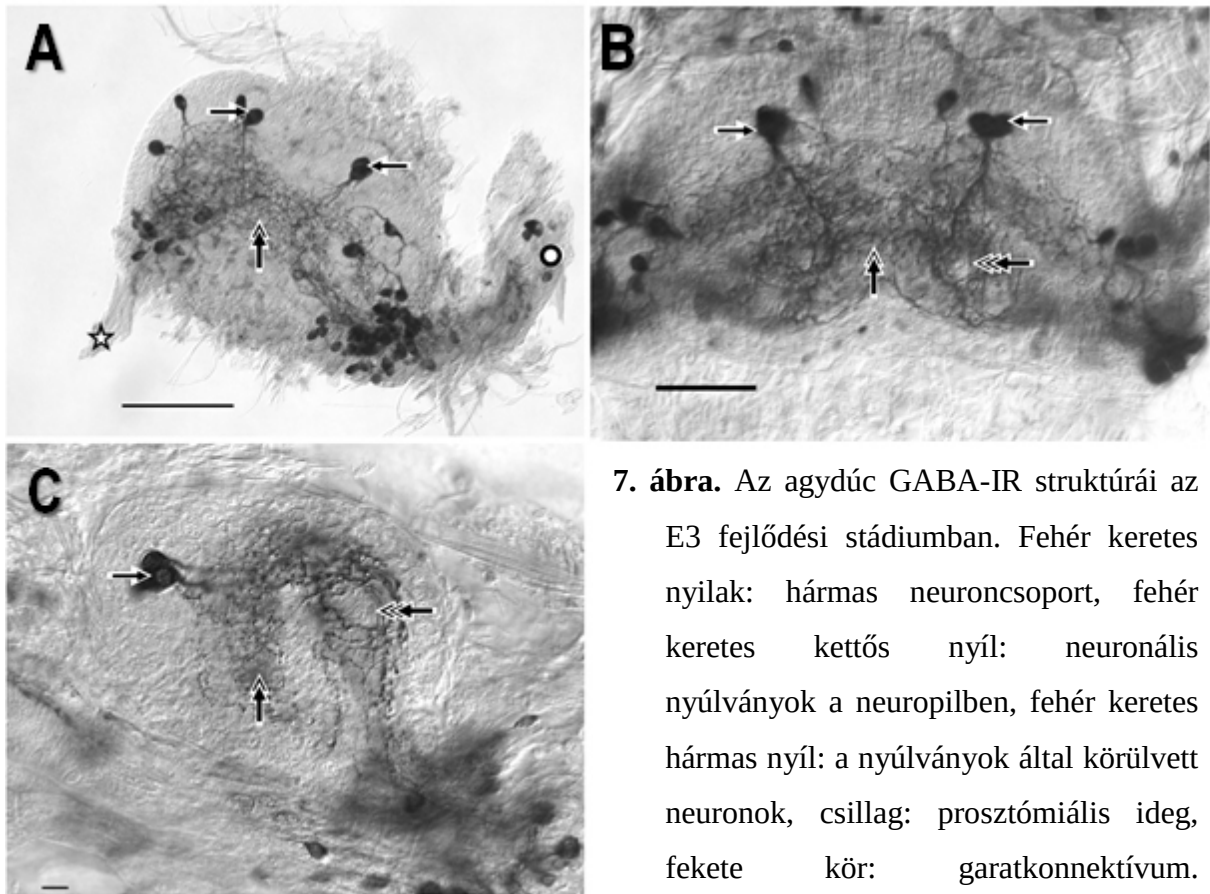
5. ábra: Az E1 fejlődési stádium GABA-IR struktúrái. A: a fejlődés kezdetén a sztomatogasztrikus ganglionokban (fehér keretes nyilak) jelölt sejtek, az agydúc telepében (ötágú csillag) nyúlványok (fehér keretes nyílhegy) figyelhetők meg. B-D: A fejlődés későbbi szakaszában az agydúc telepében bipoláris neuronok (fekete keretes nyilak) jelennek meg, a garatalatti dúcban megfigyelhetők a poliszegmentális rostrendszer kialakító neuronok (fekete keretes kettős nyílhegy), a bőrízomtömlőben a primér érzékhámsejtek (fehér keretes kettős nyilak). Hatágú csillag: hasdúclánc, hármass nyíl: garatkonnektívum. Aránymérték: 100 μ m.



6. ábra: Az E2 fejlődési állapot jellegzetes GABA-IR struktúrái. Megfigyelhető a száj-és garatplexus (körvégű nyilak) differenciálódása (A) és a poliszegmentális rostrendszer (körvégű kettős nyilak) lefutása a hasdúcok (hatágú csillagok) mediális részén (B). Hármás nyal: garatkonnektívum, fehér keretes nyílhegyek: GABA-IR rostok az agydúcban, fekete keretes nyílhegyek: garatalatti dúc jelölt sejtjei, fehér keretes kettős nyilak: primér érzékhámsejtek. Aránymérték: 50 μ m.

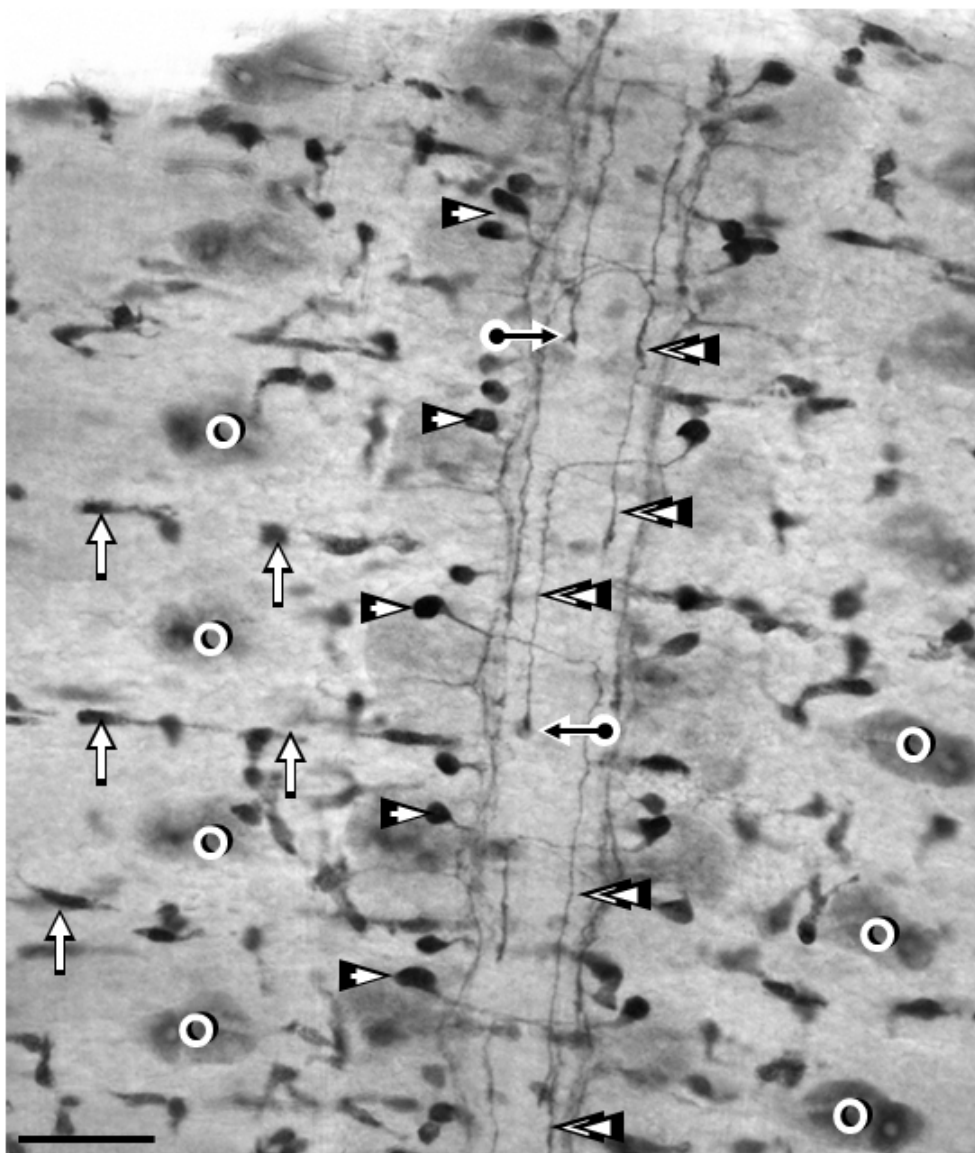
A fejlődő bőrizomtömlőben az antero-poszterior tengely mentén megfigyelhető a primér érzékhámsejtek számának növekedése, a nyúlványok kialakulása (6B ábra), majd a véletlenszerű elrendeződés fokozatos rendezetté válása. Ekkor az érzékhámsejtek érzékbimbókba rendeződnek, amelyek többsége a szelvények közepén, a sertetokokkal egy vonalban (ún. sertesor) helyezkedik el, a többi a szelvény elülső és hátsó részén random mintázatot mutat.

Az E3 fejlődési stádiumban az agydúc mindkét hemiganglionjában megjelenik egy-egy három neuronból álló csoport, amelyek varikózus nyúlványai részben a neuropilben, részben az agydúc elülső részén elhelyezkedő perikaryonok körül hoznak létre egy fejlett hálózatot (7. ábra). A fejlődés későbbi szakaszaiban egészen a kikelésig az agydúc GABA-IR struktúráinak a mintázata nem változik, sőt ezek a struktúrák a kifejlett állatokban is hasonló elrendeződésben figyelhetők meg (Molnár és mtsai, publikálatlan adat). Ezzel szemben jelentős szerkezeti változások következnek be a hasdúclánc, továbbá a sztomatogasztrikus ganglionok és a stomodeum GABA-IR struktúráinak mintázatában.



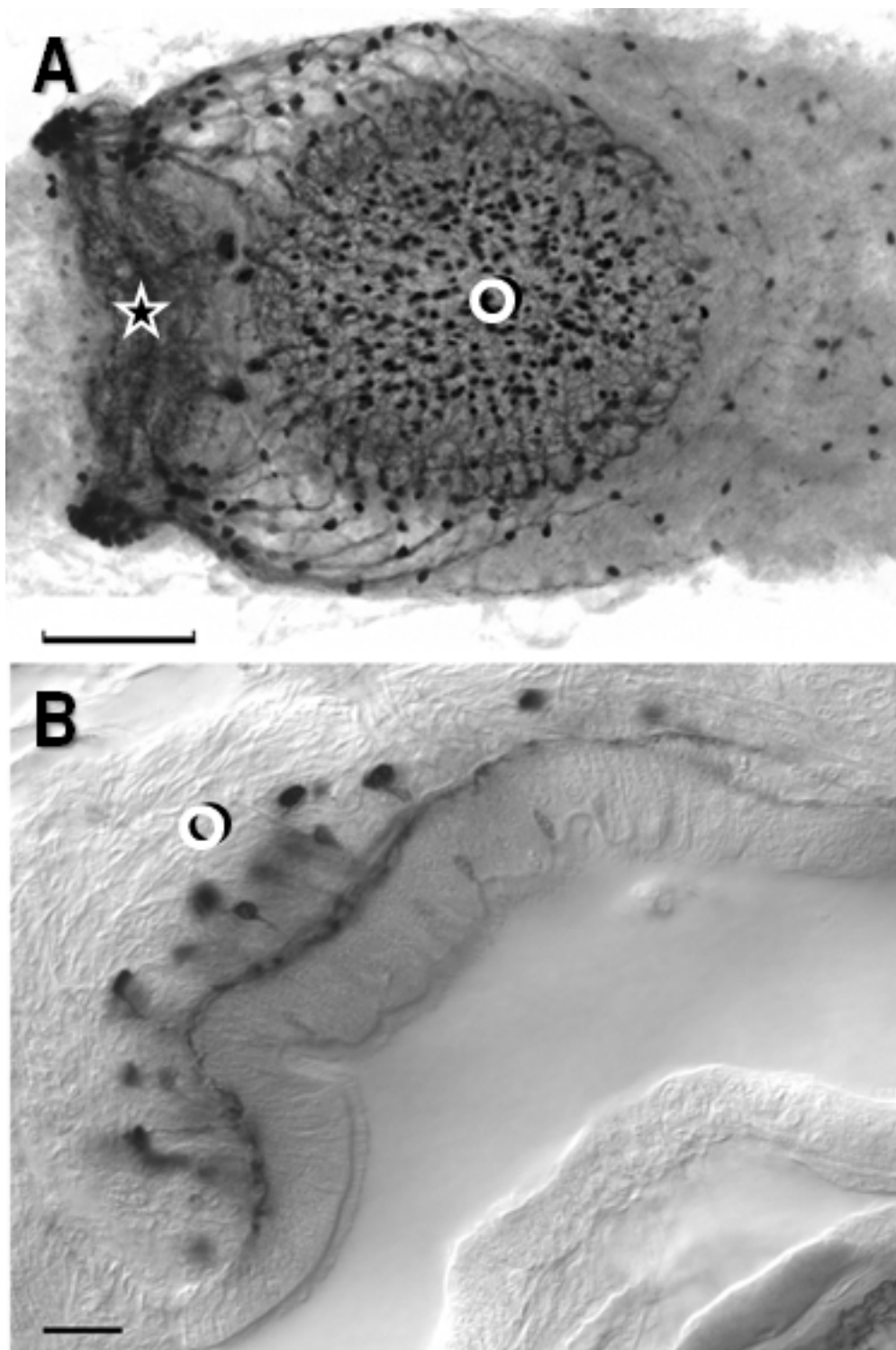
7. ábra. Az agydúc GABA-IR struktúrái az E3 fejlődési stádiumban. Fehér keretes nyilak: hármes neuroncsoport, fehér keretes kettős nyíl: neuronális nyúlványok a neuropilben, fehér keretes hármes nyíl: a nyúlványok által körülvelt neuronok, csillag: prosztómiális ideg, fekete kör: garatkonnektívum. Aránymérték: A 50 μ m, B:25 μ m, C 10 μ m.

A hasdúclánc ganglionjaiban az antero-poszterior tengely mentén megjelennek az első szegmentális ideg mögött elhelyezkedő neuronok, amelyek ipsi- és contralaterális nyúlványai a poliszegmentális rostrendszer alakítják ki. A perikaryonok száma fokozatosan nő az embrionális fejlődés során, ez főleg a középbél alatt elhelyezkedő ganglionokban figyelhető meg. Először a dorzális, majd a dorzolaterális és végül a ventrolaterális perikaryonok jelennek meg. A poliszegmentális rendszer fejlődése szelvényenként eltérő lehet, ennek következtében megfigyelhető az egyes neuronok nyúlványainak lefutása. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a poliszegmentális rostrendszer alkotó nyúlványok legalább négy dűcot áthidalnak (8. ábra).

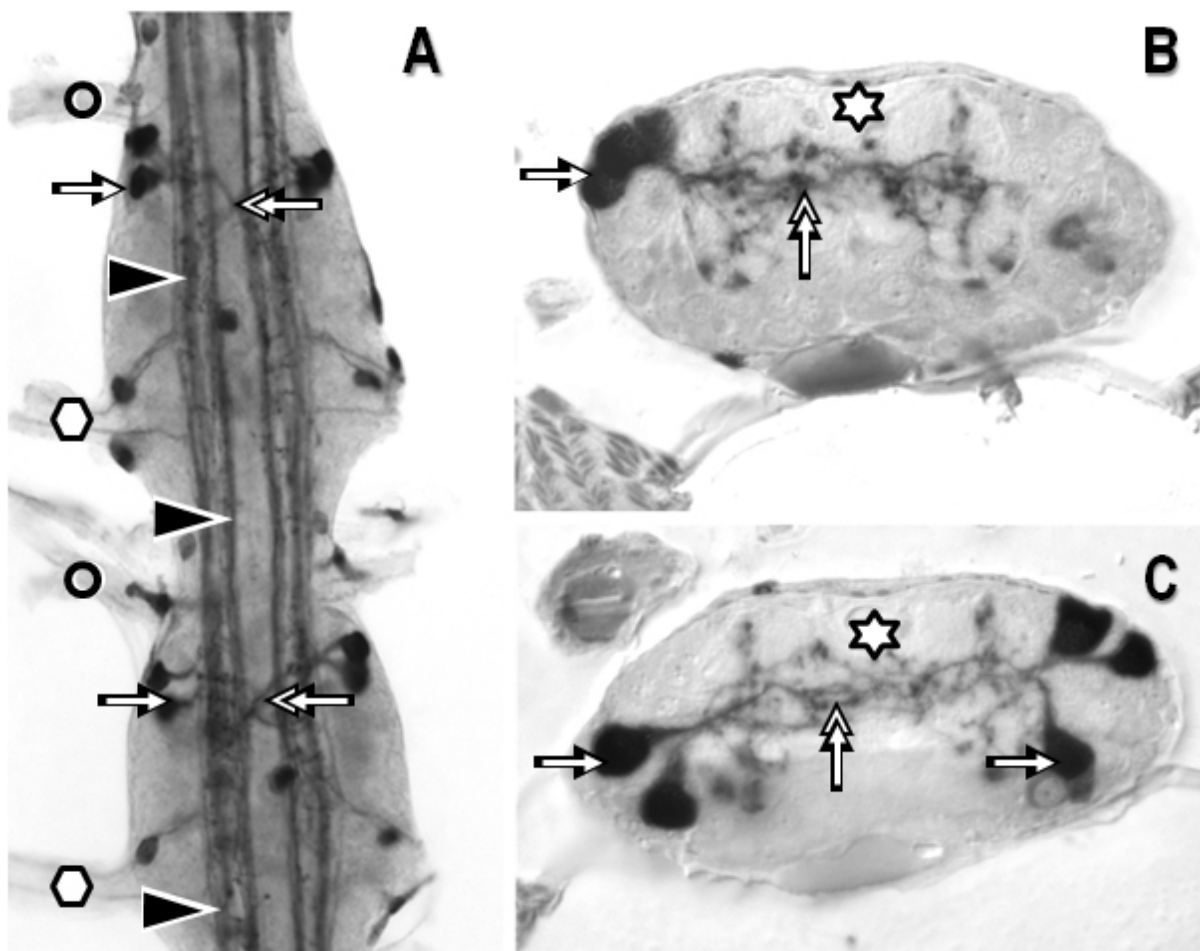


8. ábra. A poliszegmentális rostrendszer fejlődése a középbél alatti ganglionokban. A poliszegmentális rostrendszert létrehozó neuronok (fekete keretes nyílhegy) és kontralaterális lefutású nyúlványaik (fekete keretes kettős nyílhegyek), továbbá a növekedési kúp (körvégű nyilak) jól megfigyelhetők. Fekete keretes nyilak: sorba rendeződő primér érzékhámsejtek, fehér körök: fejlődő metanefridiumok. Aránymérték: 25 μ m.

Az E4 (közvetlenül a kikelés előtti) fejlődési állapotban a központi idegrendszer legelső dúcainak GABA-IR struktúráinak mintázata nem változott (9. A ábra). Sem az agydúcban, sem a garatalatti dúcban nem tapasztaltunk változást. Feltűnő azonban a garat dorzális falában a GABA-IR neuronok számának nagymértékű növekedése. Míg az agydúcban a jelölt sejtek száma nem érte el a tízet hemigangliononként, a garat dorzális falában 170 ± 27 neuront találtunk.



9. ábra. Az agydúc (ötágú csillag) és a garat dorzális falának (fehér kör) GABA-IR struktúrái. Feltűnő, hogy az agydúcban nem változott a jelölt sejtek száma és mintázata, míg a garatalatti dúc dorzális falában jelentős mértékben nőtt a sejtszám.



10. ábra. A hasdúclánc GABA-IR struktúráinak mintázata totálpreparátumban (A) és metszetekben (B, C).

A hasdúclánc GABA-IR rostrendszere ekkorra teljesen kifejlődik. Megfigyelhető a ganglionok dorzális oldalán futó négy rostköteg, amelyek főleg az első pár szegmentális ideg mögött elhelyezkedő neuronok ipsi-és contralaterális nyúlványaiból szerveződnek (10. A ábra). A jelölt rostköteg a centrális neuropilben, a dorzális óriásaxonok nyúlványai közelében helyezkednek el. A contralaterális rostok a mediális óriásaxon nyúlványrendszerét veszik körül, feltehetően annak működését befolyásolják.

Az első szegmentális ideg mögött, dorzolaterális pozícióban lévő sejtek contralaterális, valamint ipsilaterális nyúlványokat bocsátanak ki, melyek a szelvények közötti összehangolást végző polyszegmentális idegeket hozzák létre (10. B ábra).

A GABA immunreaktív rostrendszert a hasdúclánc ganglionjának keresztmetszetén elemeztük. A dorzolaterális sejtcsoport rostrendszere az óriásaxonok közvetlen közelében, azok körül helyezkedik el (10. A ábra). A dorzolaterális GABAerg sejtcsoport rostrendszere megfigyeléseink alapján 4 rostköteget hoz létre (10. B ábra). A dorzolaterális sejtcsoporttól

kissé poszterior irányban a hasdúclánc ganglionjában ventrolaterális sejteket ismertünk fel, melyek az előbb említett rostrendszerhez projiciálnak (10. C ábra).

5. Az eredmények megbeszélése

Az *E. fetida* embrionális fejlődése során korai állapotban is kimutathatók a központi és perifériás idegrendszerben transzmitter-specifikus struktúrák, melyeket immunhisztokémiai módszerrel azonosítottunk. Korábbi kísérletek alapján a GABA immunhisztokémiai kimutatása esetében biztosak lehetünk abban, hogy GABA-t tartalmazó struktúrákat festettünk. Az általunk alkalmazott szérumok felhasználásával különböző állatokban, így a gilisztában is, csak specifikus struktúrákat találtak (FOA és COOK, 1997; HATAKEYAMA és ITO, 2000; CSOKNYA és mtsai, 2002; FERGUSON és MCFARANE, 2002; KOZA és CSOKNYA, 2004; MOLNÁR és mtsai, 2006).

Vizsgálataink eredménye alapján megállapíthattuk, hogy a GABA az embrionális fejlődés korai szakaszában megjelenik a sztomatogasztrikus ganglionok telepében, az agy- és garatalatti dúcban és a garatkonnektívumokban (garatideggyűrűben). Mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben antero-poszterior tengely mentén történt a GABAerg rendszer fejlődése.

A GABA az embriogenezis azon szakaszában jelenik meg a test elülső pólusán, amikor a csíralemezek már kialakultak, de a szegmentáció még nem kezdődött meg. A garatideggyűrű GABA-pozitív sejtjeinek fejlődésével párhuzamosan történik a sztomatogasztrikus ganglionok fejlődése.

Korábban leírták, hogy a központi idegrendszer nem fejt ki számottevő hatást az *E. fetida* béltraktusának motilitására. A bélcsatorna ritmikus aktivitását a perifériás idegrendszerhez tartozó sztomatogasztrikus ganglionok koordinálják (MILLOT, 1943; BARNA és mtsai, 2001). Az elsőként megjelenő GABAerg struktúrák a sztomatogasztrikus idegrendszer részét képezik. Jól ismert, hogy az *E. fetida* embrionális fejlődése során az embriók a kokonban található fehérjét felszívják és felhasználják. A kokon albumenjének mennyisége és minősége nagyban befolyásolja az embrió fejlődését (BOROS és mtsai., 2008). A sztomatogasztrikus idegrendszer korai megjelenése arra utal, hogy a fejlődő embrió bélműködése az embriogenezis korai szakaszában beindulhat, ami fontos a tartalék fehérje, a szik felszívása szempontjából. A garatizom mozgását kétféle hatás biztosíthatja: idegi és hormonális. A

tápcsatorna működését egy gerinctelen neuropeptid, az FMRFamid is befolyásolja (KRAJNIAK és KLOHR, 1999).

Emlősnél is arra a következtetésre jutottak, hogy a GABA-nak szerepe van az enterikus idegrendszer neurotranszmissziójában (JESSEN, 1981). A GABA emlős enterikus interneuronok transzmittere, ami excitatórikus GABA_A vagy inhibitoros GABA_B receptorokra hat, melyek a motilitást és mukózális funkciót befolyásolják (KRANTIS, 2000).

A GABA a legjobban elterjedt inhibitoros neurotranszmitter gerincesekben és gerinctelenekben (COOPER és mtsai., 1991; NIRANJALA és mtsai, 1995). Számos élőlényben, prokariótáktól a gerincesekig kimutatták (NIRANJALA és mtsai, 1995). A gerincesek központi idegrendszerében való felfedezése óta bizonyították gátló folyamatokban való részvételét (TODD és mtsai., 1992). Fő inhibitoros neurotranszmitter a kifejlett emlős agyban (WATANABE és mtsai, 2003). Excitatórikus és inhibitoros neurotranszmitterként is szerepelhet *Caenorhabditis elegans*-ban (MCLINTIRE és mtsai., 1993). A GABA neurotrofikus faktorként is működhet a neuronális fejlődés regulációjában a centrális és a perifériás idegrendszerben egyaránt (ERDŐ és WOLFF, 1990). A GABA általános neurotranszmitterként funkcionál *Limnodrilus hoffmeisteri* (Annelida, Oligochaeta) szenzoros-, interneuronális és motoros rendszerében (MOLNÁR és mtsai, 2006).

KOZA és CSOKNYA (2004) alapján az általunk vizsgált fajban a GABA szintézise indul meg legkorábban, ezért valószínű, hogy több módon is befolyásolhatja az idegi struktúrák fejlődését, valamint a szöveti differenciálódást. Rákok embrionális fejlődésének vizsgálata során hasonló eredményre jutottak. A GABAerg elemek előbb megjelennek a neuromuszkuláris rendszerben, valamint a központi idegrendszerben, mint ahogy a serkentő glutamát szintézise megkezdődne, továbbá a GABA mennyisége folyamatosan növekszik a kikelésig (FOA és COOK, 1997). Azonban vannak ellentmondó eredmények is, hiszen korábbi vizsgálatok szerint puhatestűekben a szerotonin és az FMRFamidok korábban jelennek meg az embriogenezis során, elhúzódó hatással modulálják a fejlődést (FRANCHINI, 2005). *Lymnaea stagnalis* embrionális centrális idegrendszerben GABA immunreaktív sejteket nem találtak, de kikelés után már megtalálhatóak voltak (HATAKEYAMA és ITO, 2000).

E. fetida embriogenezise során a korán megjelenő GABA több lehetséges hatásmechanizmussal rendelkezhet, valószínűleg hasonlóval, mint a gerincesek és más gerinctelenek embrionális fejlődésében.

A GABA immunoreaktív rendszer korai kiterjedése a fejlődő embrióban arra enged következtetni, hogy a rendszer neuronjainak trofikus szerepe van az idegrendszer

kialakulásának irányításában vagy modulálásában. A GABA megjelenése rákokban egybeesik az axogenezis kezdetével. Ez utalhat arra, hogy a GABAerg neuronok képesek befolyásolni az idegsejtek fejlődését, valószínűleg trofikus módon (FOA és COOK, 1997). Ezt más kísérletek is alátámasztják. Korábbi vizsgálatok során regenerációs folyamatokban exogén GABA hatására serkent az axonok helyreállása (CSOKNYA és mtsai., 2002).

Egy további lehetőség, hogy a neuromuszkuláris innerváció fejlődő inhibitoros komponensei rendelkeznek a potenciállal, hogy kontrolálják az excitatórikus innerváció fejlődését (FOA és COOK, 1997).

Továbbá elképzelhető, hogy a GABA nem inhibitoros neurotranszmitterként funkcionál az embrió korai fejlődése során, hanem excitatórikus neurotranszmitterként szerepel. Kikelt rákok esetén figyelték meg a jelenséget, hogy mozgásaik sporadikusak voltak. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy ekkor az izomkontrakciók még excitatórikus GABAerg hatásra következtek be, és a később kialakult glutamáterg irányításra alakul ki a finomabb mozgás (FOA és COOK, 1997).

A piócában (*Hirudo medicinalis*) a testfal longitudinális izmaihoz futó inhibitoros motoneuronok központi inhibitoros szinapszisok által vannak összekötve az excitatórikus motoneuronokkal, melyek ugyanazon izmot innerválják. A gátló kapcsolatok transzmittere a GABA. A preszinaptikusan felszabaduló neurotranszmitter depolarizálja az inhibitort, vagy közvetlen az excitatórikus sejtestre hatva hiperpolarizálja a posztzinaptikus excitort. A kipreparált és kultúrában növesztett inhibitorok GABA-t szintetizáltak a prekursor glutamát jelenlétében, míg az excitorok nem termeltek észlelhető mennyiséget a GABA-ból ugyanazon körülmények között. Egyedi izomkötegek inhibitoros és excitatórikus motoneuronok által egyaránt innerválva vannak oly módon, hogy az inhibitoros és excitatórikus idegvégződéses és neurotranszmitter receptorok térben és elektromosan elkülönülnek. Az inhibitoros szinaptikus kapcsolatok esszenciális szereppel bírnak a ritmikus motoros mintázatok generálásában piócák esetében (HOLLIS, 1986).

E. fetida embriókban a garatalatti dúctól a testvéig terjedő kontra- és ipszilaterális rostokból felépülő interneurális polisegmentális hálózat fejlődését figyeltük meg. A központi idegrendszer szelvényes kinézete ellenére eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy minimum 3-4 ganglion képezhet egy egységet, melyet interneuronok hangolnak össze. A ganglionok dorzolaterális sejtcsoportjainak rostrendszere az óriásaxonok közvetlen közelében helyezkedik el. Tehát az interneuronok kapcsolatot létesíthetnek az

óriásaxonokkal. Ezt az interneuronális rendszert más gyűrűsféregben is leírták (MOLNÁR és mtsai, 2006).

Megfigyeléseink szerint a GABA neurotranszmitterként szerepel az *E. fetida* embriók szenzoros-, motoros- és interneuronális hálózatában. Eredményeink és az áttekintett irodalmi adatok alapján, a GABA nem egyszerű inhibitoros neurotranszmitter az embriogenezis során. Valószínűsíthetjük, hogy a GABA fontos szerepet lát el, mint növekedési faktor a fejlődés folyamán, és nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy excitatórikus hatással rendelkezik.

6. Összefoglalás

A GABA gerincesekben és gerinctelenekben egyaránt előfordulhat gátló neurotranszmitterként és fejlődési szignálmolekulaként. Ezen adatok ismeretében vizsgálataink során az *E. fetida* embriók GABAerg rendszerét elemeztük immunhisztokémiai módszerrel. A GABA először az első embrionális fejlődési állapotban a csíralemezek kialakulása és a szegmentáció kezdete után jelent meg. Az első GABA immunreaktív (IR) sejtek az idegrendszerben tűntek fel, így a sztomatogasztrikus ganglionokban és a garatideggyűrűben. A fejlődés későbbi szakaszában az anterior-poszterior tengely mentén karakterisztikus neuroncsoportok jelentek meg az első szegmentális ideg mögött minden ganglionban. Ezen neuroncsoportok ipszi- és kontralaterális nyúlványai megszakítás nélküli polisegmentális interneuronális hálózatot hoztak létre a garatalatti dúctól a terminális ganglionig. A növekvő GABAerg idegnyúlványok lefutása alapján a nyúlványok legalább négy szegmentális ganglionon keresztülfutnak, mielőtt más idegnyúlványokkal szinaptizálnának.

A periférián először GABA IR sejtek a dorzális garatfalban jelentek meg, és számuk szignifikánsan nagyobb volt, mint az agydúcban. A sztomatogasztrikus ganglionok és a garatfal neuronjai egyaránt a száj és a garat területét innervárlják, melyek fontos szerepet játszanak a kokon albumenjének a fejlődő emésztő csatornába szívásában. Az albumen a fejlődés későbbi szakaszaiban energiaforrásként szolgál. A formálódó testfal első GABAerg sejtjei a primer érzékhámsejtek voltak, melyek a késői E1-es és a korai E2-es fejlődési állapotban jelentek meg. Néhány kerek jelölt sejt, melyeket primer érzékhámsejtekként azonosítottunk, random elhelyezkedést mutattak a test elülső végén található szelvényekben. A fejlődés folyamán unipolárisává váltak, a sertesorban elhatárolható csoportokat alakítottak ki, és centrális nyúlványukat a szegmentális idegen keresztül a hasdúclánchoz küldték.

Eredményeink azt mutatják, hogy a GABA neurotranszmitterként volt jelen az *E. fetida* embriók szenzoros, motoros és interneuronális hálózatában, melyek számos szövet és szerv differenciálódásában vehetnek részt.

7. Irodalomjegyzék

- ARAI A., NAKAMOTO A., SHIMIZU T. (2001): Specification of ectodermal teloblast lineages in the embryos of the Oligochaete Annelid *Tubifex*: Involvement of novel cell-cell interactions. *Development*, 128: 1211-1219.
- BARNA J., CSOKNYA M., LÁZÁR ZS., BARTHÓ L., HÁMORI J., ELEKES K. (2001): Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). *Journal of Neurocytology* 30: 313-325
- BEHAR T. N., SCHAFFNER A. E., COLTON C. A., SOMOGYI R., OLAH Z., C. LEHEL, BARKER J. L. (1994): GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *The Journal of Neuroscience*, 14: 29-38
- BOROS Á. (2010): PACAP-szerű és CAPA peptidek expressziója és lehetséges funkciói *Eisenia fetida* kifejlett egyedeiben és embrióiban. PhD értekezés, Pécs
- BOROS Á., REGLÓDI D., HERBERT ZS., KISZLER G., NÉMETH J., LUBICS A., KISS P., TAMÁS A., SHIODA S., MATSUDA K., POLLÁK E., MOLNÁR L. (2008): Changes in the expression of PACAP-like compounds during the embryonic development of the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Molecular Neuroscience*, 36: 157-165.
- CSOKNYA M., BARNA J., ELEKES K. (2002): Reorganization of the GABAergic system following brain extirpation in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Acta Biologica Hungarica* 53: 43-58.
- COOPER J. R., BLOOM F. E., ROTH R. H. (1991): The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, New York, 133- 166.
- Croll R. P. és Voronezhskaya E. E. (1995): Early FMRFamide-like immunoreactive cells in gastropod neurogenesis. *Acta Biologica Hungarica* 46: 295-303.
- DEVRIES J. (1973): La formation et al destinee des feuillets embryonnaires chez le lombriciens *Eisenia foetida* (Annelide, Oligochete). *Arch. Anat. Microsc. Morph. exp* 62, 15-38.
- DEVRIES J. (1983): The determination of the mesodermic metamerism specificity in the embryo of earthworm *Eisenia foetida* Sav. (effect of bromodeoxyuridine). *Archives of Biology*, 94: 23-40.
- ERDŐ S. L., WOLFF J. R. (1990): γ -Aminobutyric Acid outside the mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, 15: 2720-2732.
- FERGUSON S. C. D., MCFARLANE S. (2002): GABA and development of the *Xenopus* optic projection. *Journal of Neurobiology*, 51: 272-284.

- FOA L. C., COOKE I. R. C. (1997): The ontogeny of GABA- and glutamate-like immunoreactivity in the embryonic australian freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Developmental Brain Research*, 107: 33-42.
- FRANCHINI A. (2005): The distribution of cells containing FMRFamide- and 5-HT-related molecules in the embryonic development of viviparud ater (Mollusca, Gastropoda). *European Journal of Histochemistry*, 49: 301-308.
- GOILLARD J.-M., MARDER E. (2003): Exciting guts with GABA. *Nature Neuroscience*, Volume 6, Number 11
- HATAKEYAMA D., ITO E. (2000): Distribution and developmental changes in GABA-like immunoreactive neurons in the central nervous system of pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Comparative Neurology* 418: 310-322.
- HOLLIS T. C. (1986): Evidence for GABA as a neurotransmitter in the leech. *The Journal of Neuroscience*, 6: 2848-2856.
- JESSEN K. R. (1981): GABA and enteric nervous system. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 38: 69-76.
- KERKUT G. A., SEDDEN C. B., WALKER R. J. (1967): Cellular localization of monoamines by flourescence microscopy in *Hirudo medicinalis* and *Lumbricus terrestris*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 21: 687-690.
- KOBAYASHI S., MATSUO R., SADAMOTO H., WATANABE S., ITO E. (1012): Excitatory effects of GABA on procerebrum neurons in a slug. *Journal of Neurophysiology* 108: 989-998
- KOZA A., CSOKNYA M. (2004): Embryogenesis of GABAergic elements in the nervous system of *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Acta Biologica Hungarica* 55: 323-333.
- KOZA A., WILHELM M., HIRIPI L., ELEKES K., CSOKNYA M. (2006): Embryogenesis of the serotonergic system in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta): Immunohistochemical and Biochemical Studies. *The Journal of Comparative Neurology* 497: 451-467.
- KRANTIS A. (2000): GABA in the mammalian enteric nervous system. *News in Physiological Sciences*, 15: 285-290.
- KRAJNIAK K. G., KLOHR R. W. (1999): The effects of FMRFamide, serotonin, and acetylcholine on the isolated crop-gizzard of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 123: 409-415
- MCLNTIRE S., JORGENSEN E., KAPLAN J., HORVITZ H. R. (1993): The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364: 337-341

- MILLOT F. L. N. (1943): The visceral nervous system of the earthworm.: I. nerves controlling the tone of the alimentary canal. *Proceedings of Royal Society, London*, 131: 271-295.
- MOLNÁR L., KISZLER G., POLLÁK E., DERES L. (2006): Distribution pattern of γ -amino-butyric acid immunoreactive neural structures in the central and peripheral nervous system of the tubicid worm, *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Hydrobiologia*, 564: 33-43.
- MYOHARA M. (2004): Differential tissue development during embryogenesis and regeneration in an Annelid. *Developmental Dynamics* 231: 349-358.
- NIRANJALA J. K., MEDINA-KAUWE L., GIBSON K. M. (1995): Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and non neural tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112: 247-263.
- PROSSER C. L. (1933): Correlation between development of behavior and neuromuscular differentiation in embryos of *Eisenia foetida*, Sav. *Journal of Comparative Neurology*, 58: 603-641
- ROUABAH-SADAoui L., MARCEL R. (1995): Analysis of protein nutrient reserves of the clitellum and cocoon albumin in *Eisenia fetida* Sav (Annelida, Oligochaeta). Demonstration of a glycolipoprotein comparable to vitellogenin. *Reproduction, Nutrition, Development*, 35: 491-501.
- SHIMIZU T., NAKAMOTO A. (2001): Segmentation in Annelids: cellular and molecular basis for metameric body plan. *Zoological Science* 18: 285-298.
- SOLT Zs., MOLNÁR L. (2001): Investigation of the development of a subintestinal ganglion in *Eisenia fetida*: a histological and histochemical study. *Neurobiology*, 9: 59-60.
- STOREY G. K. (1989): Cell lineage and pattern formation in the earthworm embryo. *Development* 107: 519-531.
- SULJAK S. W., ROSE C. M., SABATIER C., LE T., TRIEU Q., VERLEY D. R., LEWIS A. M., BIRMINGHAM J. T.: Enhancement of muscle contraction in the stomach of the crab *Cancer borealis*: a possible hormonal role for GABA
- TELKES I., CSOKNYA M., BUZÁS P., GÁBRIEL R., HÁMORI J., ELEKES K. (1996): GABA-immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Annelida). *Cell Tissue Res.* 285: 463-474
- TODD A. J., SPIKE R. C., RUSSEL G., JOHNSTON H. M. (1992): Immunohistochemical evidence that Met-enkephalin and GABA coexist in some neurons in rat dorsal horn. *Brain Research*, 584: 149-156.
- ZBORAY G. (1992): Összehasonlító anatómiai praktikum I. Tankönyvkiadó, Budapest, 87-95.

WATANABE M., MAEMURA K., KANBARA K., TAMAYANA T, HAYASAKI H. (2003): GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International Review of Cytology*, 213: 1-47.

WILSON E. B. (1887): The germ-bands of *Lumbricus*. *Journal of Morphology*, 1: 183-192.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek dr. Molnár Lászlónak, aki nagymértékben hozzájárult elkészült munkámhoz, valamint mindazoknak, akik közreműködtek: dr. Pollák Edit, dr. Boros Ákos, dr. Somogyi Ildikó, Gunszt Dóra és Steib Anita.

9. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Rumpler Éva a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül az:

- irodalom összegyűjtését
- kísérleti állatok gyűjtését, előkészítését
- fixálását
- immunhisztokémiai protokoll végrehajtását
- eredmények dokumentálását

végeztem el.

.....
Rumpler Éva sk.

Pécs, 2013. január 9.