

Összehasonlító morfológiai és elektrokémia vizsgálatok földigiliszták izomzatának szerotonerg beidegzésében

Correlative Morphometric and Electrochemical Measurements of Serotonergic Innervation in Earthworm Muscles

TAKÁCS Boglárka¹, Dr. CSOKNYA Mária², Dr. GÁBRIEL Róbert², Dr. NAGY Géza¹

¹Általános és Fizikai Kémia Tanszék, Pécsi Tudományegyetem, H-7624, Pécs, Ifjúság u. 6

²Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék, H-7624, Pécs, Ifjúság u. 6

Tel.: +3672503600, E-mail: tboglarka@freemail.hu, www.pte.ttk.hu

ABSTRACT

Distribution of serotonin content of nervous fibers in both the somatic and the visceral muscle of Eisenia fetida have been investigated using immunocytochemical staining and voltammetric measurements. Good correlation was found between the innervation density and i_p values of Differential Pulse Voltammetry (DPV) in different anatomical areas. As far as we know this is the first report using in vivo voltammetry investigating serotonin content in earthworm, Eisenia fetida.

1. BEVEZETÉS

Szerotonin (5-HT) az egyik legfontosabb szignál molekula a földigilisztákban. A hasdúc-lánc 5-HT tartalmú neuronjai idegrostokkal kapcsolódnak a bőrízomtömlőhöz (szomatikus izom), valamint a bélrendszerhez (viscerális izom). Az ideg-izom szinapszisokban a szerotoninnak fontos szerepe van [4], hatása kettős, lehet serkentő [5] és gátló [1] egyaránt, a farmakológiai vizsgálatok tanulsága szerint a hatás a 5-HT pillanatnyi koncentrációjától függ.

Az 1970-es évek közepétől indult hódító útjára az in vivo voltammetria módszere, aminek segítségével könnyen nyomon követhetők az elektroaktív neurotranszmitterek/modulátorok koncentrációváltozásai élő állatokban.

Korábban megjelent tanulmányainkban bemutattuk a szerotonin rostok előfordulását, megállapítottuk az izomzatra kifejtett hatását és hatékony koncentrációját, leírtuk a közvetítő 5-HT receptor típusát. Ezen ismeretek birtokában vetődött fel a kérdés, hogy vajon elektrokémiai úton, in vivo voltammetria segítségével detekálható-e az 5-HT koncentráció az izomsejtek rostjaiban.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Állatok

Vizsgálatainkat *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida) kifejlett példányain végeztük. A kísérletek megkezdéséig klímaszekrényben tartottuk őket standard hőmérsékleten (10 °C) és páratartalomban (60%).

2.2. Immuncitokémiai vizsgálatok

2.2.1. Fixálás

Az állatokat szénsavas vízben érzéstelenítettük. A test első 20 szelvényét Zamboni-oldatban [6] fixáltuk 24 órán keresztül.

A fixálás után a szöveteket 0.1 M-os foszfát-pufferben (PBS, pH 7.4) mostuk, felszálló etanol sorozatban dehidratáltuk és Paraplastba ágyasztuk. 7 μ m vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk egy rotációs mikrotom segítségével (Anglia Scientific Instruments LTD, Cambridge, England) és a metszeteket króm-alumínium-zselatin bevonatú tárgylemezre vettük fel.

2.2.2. Fénymikroszkópos immuncitokémia

Deparaffinálás és rehidratálás után a következő protokollt követtük: a metszeteket 3x20 percig foszfát-puffer–Triton X–100 (PBS–TX) oldatban mostuk, 0.25%–os marha szérumban albumint, 0.025% TX–et és 0.01% Na–azidot tartalmazó PBS–sel hígított 10%–os normál kecske szérumban előinkubáltuk.

Az elsődleges antitesttel [nyúl poliklonális anti 5–HT antiszérumban (Sigma)] való 12 órás inkubálás után, PBS–ben való mosást követően a metszeteket biotinilált kecske anti–nyúl IgG (Sigma) 1:20 arányban hígított szérumával inkubáltuk 1 órán át, majd egy újabb PBS–es mosás után ExtrAvidin Peroxidáz (Sigma) 1:20 arányban hígított komplexében történő újabb 1 órás inkubálás következett.

Az összes antiszérumban PBS–TX–BSA–ban hígítottuk ki és szobahőmérsékleten dolgoztunk velük. A lokális peroxidáz aktivitás indikálására 0.05% 3,3–diaminobenzidint és 0.01% H₂O₂–ot tartalmazó 0.1 M TRIS–HCl pufferben inkubáltuk a metszeteket 15 percig.

A metszeteket felszálló etanol sorozatban dehidratáltuk, xyloban tisztítottuk és DPX–el fedtük le.

A kontroll vizsgálatokat az elsődleges antiszérumban elhagyásával és helyette 1%–os normál kecske szérumban hozzáadásával készítettük.

2.2.3. Kvantitatív fénymikroszkópiás vizsgálatok

A preparátumokat CCD kamerával ellátott Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A fényképeket Adobe Photoshop 7.0 szoftver segítségével értékeltük ki. A színes képeket szürke árnyalatossá konvertáltuk, az így kapott inverz fotókat használtuk, így módon az általunk vizsgálni kívánt terület (5–HT tartalmú idegelemek) automatikusan fehér árnyalatú lett. A denzitometriai vizsgálatokhoz négy anatómiai területet választottunk ki: a test első szelvényét, a második szelvényt, mint a bőrízomtömlő részeit, valamint a garat és a gyomor területét. Az immunpozitív terület arányát a Histogram menü segítségével határoztuk meg és fejeztük ki annak százalékos előfordulását.

2.3. Voltammetriás vizsgálatok

2.3.1. Mikroelektrodok

33 µm átmérőjű szénszálakból készítettük az elektrodokat. A szénszálakat a Specailty Materials (Massachusetts, USA) cégtől kaptuk ajándékba. Minden alkalommal egyetlen szénszál helyezettünk egy üveg kapillárisba (d=1.1 mm), majd egy vertikális kapilláris húzó készülék segítségével (P–30 Micropipette Puller, Sutter Instrument Co.) mikropipettát húztunk. Egy éles penge segítségével levágtuk a mikropipettából kilógó szénszálakat. Az elektromos kontaktust a mikropipetta belsejébe juttatott higany és réz szál biztosította. Az elektrod felületére Nafion film bevonatot készítettünk oly módon, hogy az elektrodokat 5%–os Nafion (Sigma) oldatba mártottuk háromszor, minden alkalommal 3–5 másodperc időtartamig és a bemártások között 2–3 perc száradási időt biztosítottunk. Ezután az elektrodokat vagy szobahőmérsékleten szárítottuk 12 órán keresztül, vagy 80°C–os kemencében 10–15 percig.

1 mm átmérőjű Ag/AgCl huzalt használtunk kvázi referencia elektrodként és 0.3 mm átmérőjű Pt huzalt segédelektrodként.

2.3.2. In vivo vizsgálatok

A vizsgálataink során DPV mérési programot alkalmaztunk PAR (Model 273 A) és CH Instrument 700C Elektrokémiai mérőállomás alkalmazásával. A leggyakrabban alkalmazott mérési paraméterek az alábbiak voltak: pásztázási potenciál ablak –0.2 V, +1.2 V; pásztázási sebesség 20 mV/sec; lépés hossz 1.000 mV; potenciál pulzus szélesség 50 ms; potenciál pulzus nagyság 50mV.

Az állatokat szénsavas vízben érzéstelenítettük, majd 2 csoportra osztottuk őket. Az egyik csoportban a mikroelektrodot függőlegesen, a bőrízomtömlő dorzális oldala felől vezettük be az első és a második testszelvény körkörös izomrétegéig. Míg a másik csoport esetében a bőrízomtömlő dorzális felét, a 3–15 szelvények között felvágtuk, hogy a garat és a gyomor jól láthatóvá váljon, majd ezután juttattuk az elektrodokat függőlegesen az említett két szerv saját izomrétegébe.

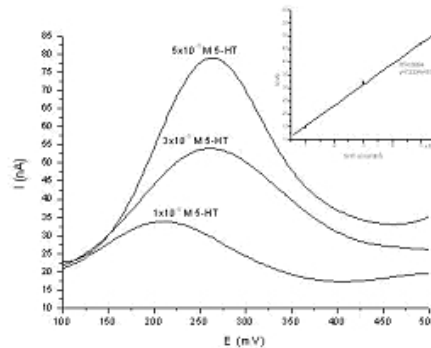
A szénszál mikroelektrodokat mind a vizsgálat előtt, mind a vizsgálat után ismert koncentrációjú, frissen készített 5–HT (Sigma) oldatok alkalmazásával kalibráltuk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. In vitro vizsgálatok

A 5–HT, mint elektroaktív molekula, 4 elektronos reakcióban (CECEC mechanizmus szerint) oxidálódik a szénszál felületén.

A földigiliszták szerotonin tartalmú rostjaiban az 5-HT koncentrációja a μM -os nagyságrendbe esik, ezért szükséges DPV mérőprogramot alkalmazni a voltametriás méréshez. A lehetséges méréstartomány felmérésére in vitro voltametriás vizsgálatokat végeztünk. Az 1. ábra $33\ \mu\text{m}$ átmérőjű szénszálás elektród segítségével, különböző koncentrációjú szerotonin oldatokban készített DPV voltammogramokat, és a voltammogramok alapján szerkesztett kalibrációs görbét mutatja.



1. ábra

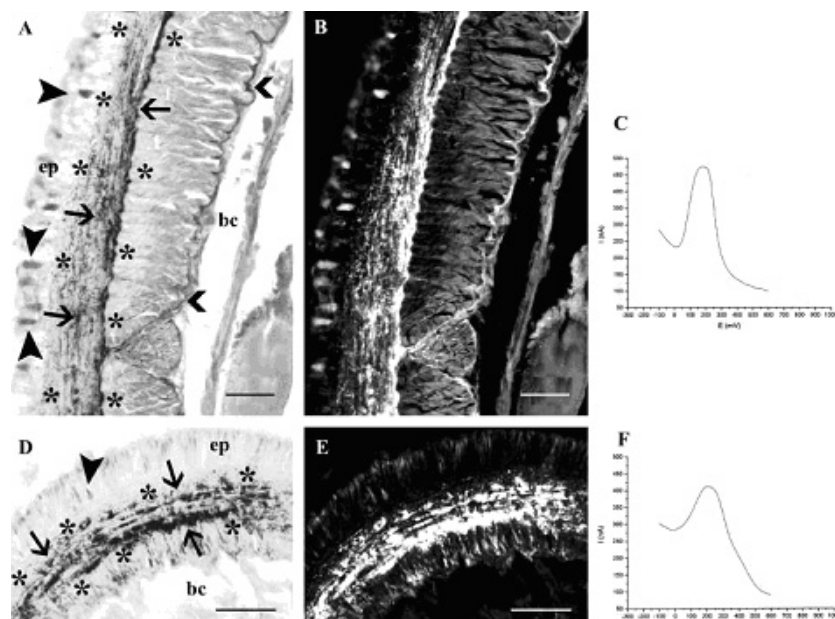
Különböző koncentrációjú 5-HT oldatokban készített DP voltammogramok. Az inset a kalibrációs görbét mutatja (pásztázási potenciál ablak $-0.2\ \text{V}$, $+1.2\ \text{V}$; pásztázási sebesség $20\ \text{mV/sec}$; lépés hossz $1.000\ \text{mV}$; potenciál pulzus szélesség $50\ \text{ms}$; potenciál pulzus nagyság $50\ \text{mV}$).

3.2. In vivo vizsgálatok

3.2.1. Bőrizomtömlő

A földigiliszták bőrizomtömlője három fő rétegből áll, az epitheliumból, a körkörös – és a hosszanti izomrétegből. A neurotranszmitterek/modulátorok ugyancsak három idegfonadékból szabadulnak fel. Ezek közül is a legfejlettebb a körkörös – és hosszanti izomréteg között húzódó plexus muscularis [3].

A rost vastagsága az általunk használt mikroelektródok hegyátmérőjének tartományába esik, így módon az elektródot a rostokba juttatva azok belsejében voltammogramokat vehettünk fel Differenciál Pulzus üzemmódban. Ezzel párhuzamosan denzitometriás mérés technikával az immunreaktív rostok %-os előfordulását is meghatároztuk. Két anatómiai régióban vizsgáltuk a 5-HT tartalmat és a rostok denzitását, nevezetesen az első testszelvényben, azaz a prostomiumban és a második testszelvényben.



2. ábra

Immunhisztokémiai és voltametriás mérések eredményeinek összehasonlítása a testfal 1. és 2. testszelvényeiben

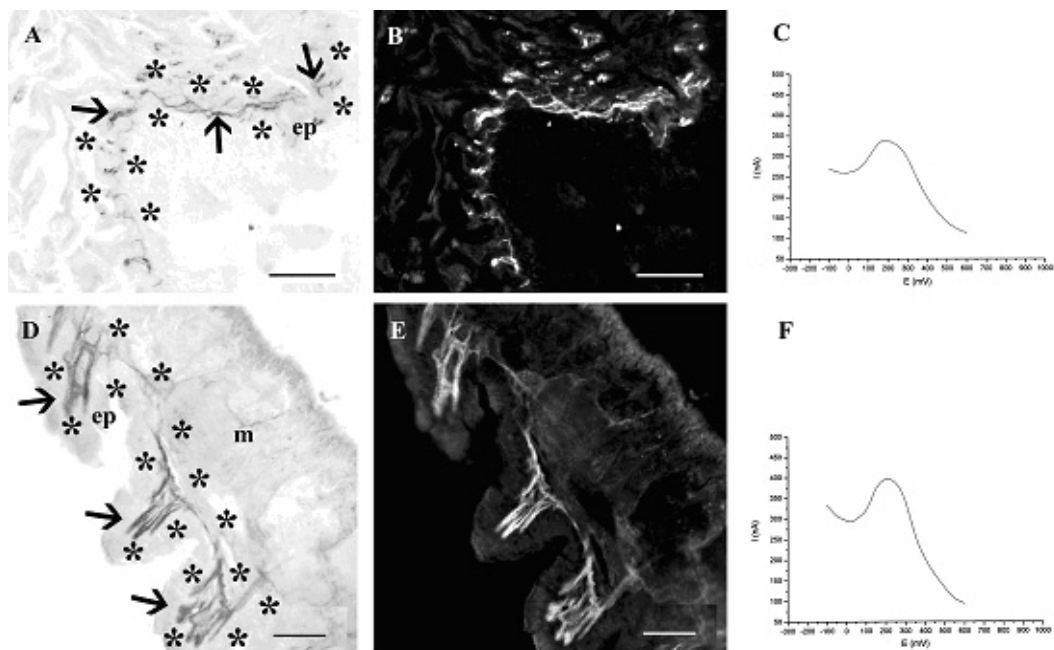
A 2. A ábrán (ep: epithelium, bc: body cavity) a 2. testszelvény gazdag innervációja látható, míg a 2. D (ep: epithelium, bc: body cavity) ábrán a prostomiumé. A 2. B és 2. E ábrák mutatják be az immunhisztokémiai fotókból készített denzitometriás képeket. A 2. C ábrán a 2. testszelvény plexus muscularisában készített DPV felvétel látható, míg a 2. F ábra a prostomium muscularis plexusában készített DPV felvételt mutatja. Mind az A, mind pedig a D fotón csillagokkal határoltuk körül az általunk vizsgált immunpozitív területet, a nyilak pedig a muscularis idegfonadéokra mutatnak. Mind a négy mikrófotón (2. A, 2. B, 2. D, 2. E) a skála jelzés 50 μm hosszú. A denzitometriás fotókon (2. B és 2. E) jól látható a plexus vastagsága közötti különbség, amit a DPV felvételekről (2. C és 2. F) leolvasható csúcsáramintenzitások is alátámasztanak.

A denzitometriás adatfeldolgozással kapott immunpozitív rostok előfordulása a 2. testszelvény esetében $2.73 \pm 1.0\%$ -nak ($n=4$) adódott, míg ugyanez az érték a prostomium, azaz az 1. testszelvény esetében $1.02 \pm 0.2\%$ ($n=4$) volt. Hasonlóan a denzitometriás adatokhoz, a DPV felvételekről leolvasható csúcsmagasság a 2. testszelvény esetében 272.5 ± 15.0 nA-nek ($n=4$) adódott, míg az első testszelvényben készített DPV felvételek csak 135.0 ± 5.8 nA ($n=4$) csúcsáramintenzitást adtak. Az előzetes kalibráció alapján a regisztrált csúcsáramintenzitások (i_p) kb. 320 μM és 158 μM 5-HT koncentrációknak felelnek meg.

3.2.2. Garat és gyomor

A földigiliszták, és így az általunk tanulmányozott *Eisenia fetida* viscerális szerveinek beidegzésében is fontos szerepe van a 5-HT-nak. A garat és a gyomor egész hosszában egy enterikus idegfonadék húzódik, mely idegrostokból épül fel [2].

Munkánk ezen részében a viscerális szervek beidegzéséről kapott immunhisztokémiai–denzitometriai adatokat kívántuk összehasonlítani a voltammetriás módszerrel nyert áramintenzitás értékekkel. Eredményeinket a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra.

Immunhisztokémiai és voltammetriás mérések eredményeinek összehasonlítása garat és gyomor testrészek esetében

A 3. A ábra az eredeti 5-HT immunfestett morfológiai képet mutatja be (ep: epithelium), míg a 3. B ábrán ennek denzitometriás adatfeldolgozás céljából készített inverze látható. A fotók a garatról készültek. A 3. C ábrán a garatban készített voltammetriás felvétel látható, DPV üzemmódban.

A 3. D fotón látható kép a gyomorról készült 5-HT immunfestéssel, a 3. E ábrán pedig az előző fotó denzitometriás képe látható. A 3. F ábrán látható a gyomor enterikus plexusában készített DPV felvétel. Mind az 3. A, mind pedig a 3. D fotón csillagokkal határoltuk körül az általunk vizsgált immunpozitív területet, a

nyilak pedig az enterikus fonadékra mutatnak. Mind a négy mikrófotón (3. A, 3. B, 3. D, 3. E) a skála jel hossza 50 μm .

A denzitometriás eljárással kapott immunpozitív rostok százalékos előfordulásai a garat esetében $1.12 \pm 0.6\%$ -nak ($n=4$), míg a gyomor esetében $1.28 \pm 0.6\%$ -nak ($n=4$) adódtak. Az ugyanezen két területen szénszálas mikroelektroddal detektált csúcsáramintenzitások a következők voltak: 122.5 ± 5.0 nA ($n=4$) és 137.5 ± 12.6 nA ($n=4$). Az előzőleg felvett kalibrációs egyenes alapján ezek az i_p értékek kb. 158 μM és 161 μM 5-HT koncentráció értékeknek felelnek meg.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkban a trágyagiliszta (*Eisenia fetida*) különböző anatómiai területeinek 5-HT tartalmát vizsgáltuk két különböző módszerrel: egyrészt a széles körben alkalmazott immunhisztokémia festéssel, kiegészítve azt denzitometriás vizsgálatokkal, másrészt szénszálas mikroelektroddal, voltametriás méréseket végezve. Célunk az volt, hogy a két módszer eredményeit összehasonlítsuk, valamint, hogy a voltametriás módszer földigilisztákban való alkalmazhatóságáról és használhatóságáról információkat kapjunk.

Mind a viscerális-, mind pedig a szomatikus izmok 5-HT beidegzését megvizsgáltuk mind a két módszer segítségével. Véggkövetkeztetésként elmondhatjuk, hogy a voltametriás adatok jó egyezést mutattak az immunhisztokémia festési eljárás, valamint a denzitometriás kiértékelés eredményeivel. Ez számunkra azt jelenti, hogy a szénszálas mikroelektroddal végzett DPV alkalmas módszer a földigiliszták különböző testsejtszerveiben lévő 5-HT koncentráció nyomon követésére. A módszer előnye, hogy élő, altatott állatokon végezhető a kísérletek, különböző anatómia régiók vizsgálhatók egymás után. Különböző időben ismételhetők a mérések azonos helyen, így a lokális koncentrációváltozások is figyelemmel kísérhetők.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők ezúton szeretnének köszönetet mondani Kiss Gyeretyánnának a technikai segítségért. A kutatásainkhoz az anyagi segítséget a MTA–PTE Adaptáció Biológiai Kutatócsoport és a Magyar Tudományos Alap (OTKA, T049502) nyújtotta.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Anctil, M., Laberge, M., Martin, N., 1984. Neuromuscular pharmacology of the anterior intestine of *Chaetopterus variopedatus*, a filter-feeding polychaete. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C, 343–351.
- [2] Barna, J., Csoknya, M., Lázár, Zs., Hámos, J., Elekes K., 2001. Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). *J. Neurocytol.* 30, 313–325.
- [3] Csoknya, M., Takács, B., Koza, A., Dénes, V., Wilhelm, M., Hiripi, L., Kaslin, J., Elekes, K., 2005. Neurochemical characterization of nervous elements innervating the body wall of earthworms (*Lumbricus*, *Eisenia*): immunohistochemical and pharmacological studies. *Cell Tissue Res.* 321, 479–490.
- [4] Gardner, C.R., Walker, R.J., 1982. The roles of putative neurotransmitters and neuromodulators in Annelids and related invertebrates. *Progr. Neurobiol.* 18, 81–120.
- [5] Krajniak, K.G., Klohr, R.W., 1999. The effects of FMRFamide, serotonin, and acetylcholine on the isolated crop-gizzard of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 123A, 409–415.
- [6] Zamboni, L., De Martino, L., 1967. Buffered picric acid formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 35, 148B.