

A cerebralizáció, az asztrogli architektónia és a vér-agy gát összetételének kapcsolata porcos halakban

Doktori tézisek

Ari Csilla

Semmelweis Egyetem
Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kálmán Mihály egyetemi tanár, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Matesz Klára egyetemi tanár, DSc
Dr. Kiss Anna egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vígh Béla egyetemi tanár, DSc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Wenger Tibor egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Röszer Tamás egyetemi tanársegéd,
Ph.D.

Budapest, 2008.

Bevezetés

A porcos halak osztályában, amely a gerincesek egy külön ágazatát képviseli, az agyak sajátos evolúción mentek keresztül. A porcos halak a cerebralizációnak, glia architektóniának és a vér-agy gát összetételnek különböző variációit mutatják. Ugyanakkor a porcos halak néhány csoportját, és egyes agyterületeket elhanyagoltak a korábbi neuroanatómiai tanulmányokban és csak néhány immunhisztokémiai technikát alkalmaztak a porcos halak glia szerkezetének leírása céljából.

A porcos halakon (Chondrichthyes) belül két fő alosztályt különítenek el, az Elasmobranchii, lemezeskopolyúsok alosztályt (cápák és ráják) és a Holocephali, tömörfejűek alosztályt (kimérák vagy patkányhalak vagy szellemcápák). A ma élő lemezeskopolyúsokat Compagno (1977) alapján négy főrendbe különítik: Squalomorphii, Galeomorphii, Squatinomorphii és Batoidea, míg a tömörfejűeken belül egy rendet ismernek három családdal.

Egy korábbi tanulmány szerint a Gnathostomata főbb ágazataiban - chondrichthian, actinopterygian, és sarcopterygian – két típusú agy szerveződés található meg a különböző fajokban: I-es típusú („lamináris”) és II-es típusú („elaborált”). Az I-es típusú agyakban,- amely többek között a squalomorf cápákra és a tömörfejűekre jellemző- a neuronális sejttetek nem vagy csak részben vándoroltak el a periventrikuláris mátrixtól. Az agy kamrák nagyok, míg az agyfal relatíve vékony. A II-es típusú agyakban,- amely a galeomorf cápákra és a rájákra jellemző- a neuronok kiterjedten vándoroltak, ezért ezek az agyak általában relatíve nagyobbak és

komplexebbek a lamináris szerveződésű agyakhoz képest. Több sejtcsoport különül el, a kamrák mérete redukálódott, míg az agyfal megvastagodott.

A porcos halak cerebralizációjának összehasonlítása más gerinces csoportokéval minimum convex polygonok segítségével mutatható be. Jerison (1973) egy kettős logaritmikus skálát használt hogy az agytömeg/testtömeg arányokat ábrázolja. Ugyanezt a módszert alkalmazta további adatokkal Northcutt (1977, 1978, 1981) és Smeets és mtsai. (1983) is. Ezen vizsgálatok alapján a porcos halak a cerebralizáció széles skáláját mutatják. Az agytömeg/testtömeg arány batoidokban és galeomorf cápákban kétszer-hatszor nagyobb, mint squalomorf cápákban. A Batoidea főrenden belül a Rajiformes rendbe tartozó rájáknál („skate”) ez az arány relatíve alacsony, míg a Myliobatiformes rendbe tartozó ráják mutatják a legmagasabb agytömeg/testtömeg arányt a porcos halakon belül.

Horstmann (1954) szerint a cápák és ráják asztrogliái elemei között különbség figyelhető meg. Rájákban az uralkodó glia elem a valódi asztrocita (nem endimális, csillag alakú sejt), úgy mint madarakban és emlősökben, míg cápákban az úgynevezett „taniciták” fordulnak elő túlnyomó részben, ezek a vékony és hosszú, rostszerű és általában radiálisan futó endimális sejtek, úgy mint hullókben és az anamnióták nagy részében.

A jelen tanulmányban három különböző asztrogliák markert alkalmaztam, glia fibrilláris savas proteint (GFAP), S100 proteint, és a glutamin szintetázt. A GFAP a legszélesebb körben alkalmazott asztrogliák marker és korábbi vizsgálatokban az anti-mlős GFAP antitesteket

sikeresen alkalmazták más gerincesekben, köztük porcos halakban is. Ezek a tanulmányok ugyanakkor a porcoshal GFAP és az emlős GFAP keresztreakciójának *in vitro* demonstrálására és szövetmintákra korlátozódtak. Az asztrociták nem minden esetben bizonyulnak GFAP immunreaktívnak madarakban és emlősökben, ezért további asztrogliamarkerek használata, úgy, mint a glutamin szintetáz vagy az S100, vált szükségessé. Elővizsgálatok azt mutatták, hogy ezek a módszerek sikeresen alkalmazhatóak porcos halakon és hasonló S100-al kapcsolatos eredményekről számolt be Chiba (2000) is.

A porcos halak vér-agy gátjában különbségek figyelhetők meg, ezért a gliovaszkuláris kapcsolataik kiemelkedően érdekesek. Míg cápákban és rájákban a vér-agy gátat a perivaszkuláris glia alkotja, a tömörfejűekben az endotél sejtek felelősek ezért a funkcióért, úgy, mint más gerincesekben is.

A disztroglikán komplex (DGC) a legfontosabb laminin receptor az integrinek mellett, amely szükséges az érstruktúra stabilizációjához, illetve a vér-agy gát érésehez és funkcionális integritásához. A komplex eredetileg izomszövetben volt leírva, de az agyban és más szervekben is előfordul. A DGC komponensei jól ismertek a *Torpedo* elektromos szervében, de az nem ismert, hogy ezek a fehérjék a porcos halak vérereiben is jelen lennének. A komplex felelős a víz-pórus csatorna fehérje, az aquaporin-4 eloszlásáért és kihorgonyzásáért. Az aquaporinok (AQP4 és AQP9) kulcsszerepet játszanak a homeosztázis fenntartásában.

Célkitűzések

A jelen tanulmány céljai a következők voltak:

- 1) A porcos halak asztrogliarchitektóniájáról pontosabb képet kapjunk, a jelen tanulmány kiegészítse a korábbi impregnációra és GFAP immunhisztokémiára alapuló vizsgálatokat glutamin szintetáz és S100 fehérje immunhisztokémiai kimutatásával.
- 2) A vizsgálatokat kiterjeszteni a porcos halak más fontos csoportjaira, úgy, mint a Myliobatiformes rendbe tartozó rájákra (a nagy agyméret miatt) és a tömörfejűekre (a különböző vér-agy gát miatt), amelyek gliastruktúráját korábban még nem tanulmányozták.
- 3) A rhombencephalon nagyobb részletességgel való tanulmányozása, amely agyterület a korábbi glia vizsgálatokban kevésbé volt érintve.
- 4) A porcos halak vér-agy gátjának néhány jellemző tulajdonságának feltárása: a disztroglikán komplex fehérjéinek, úgy, mint a disztroglikán (DG), disztrobrevin, disztrofin, szintrofin és utrofin, illetve az AQP4 és AQP9 jelenlétének és eloszlásának vizsgálata.
- 5) A cerebralizáció-típusok, a glia-architektónia, és a vér-agy gát összetétele közötti összefüggések feltárása.
- 6) Az asztrogliaevolúciós változásainak kihangsúlyozása a porcos halakban.
- 7) A megnövekedett agyterületek jelentőségének megtárgyalása ökológiai vonatkozásban.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

Majdnem minden fontos porcoshal csoport képviseltetve volt a vizsgálatok során: *Callorhinchus milii*: Holocephali; *Squalus acanthias*: Squaliformes; *Pristiophorus cirratus*: Pristiophoriformes; *Cephaloscyllium laticeps*, *Scyliorhinus canicula*: Carchariniformes; *Dipturus whiteyi*, *Raja miraletus*, *Raja clavata*: Rajiformes; *Torpedo marmorata*: Torpediniformes; *Dasyatis pastinaca*, *Myliobatis australis*, *Mobula japonica*: Myliobatiformes. Az értekezésben vizsgált fajok Last és Stevens (1994) határozó kulcsa alapján voltak azonosítva. Az állatok ivara, testhossza, testtömege és az *in situ* agy morfológia volt rögzítve. Az agyak az állatok halálát követően legkésőbb 2-3 órával lettek eltávolítva.

Szövetteni feldolgozás

Az állatok nem voltak perfundálva. Az agyak a helyszínen immerziós fixálással lettek fixálva 4%-os paraformaldehidben, majd 24 óra után friss fixálóba lettek helyezve két hétre. A *Mobula japonica* agyak immerziós fixálásához a nagy méret miatt AFA (90ml 80 % alkohol, 5 ml formalin, 5 ml jégecet, Northcutt, 1977, 1978) fixálót használtam, amely jól penetrálódik, majd 24 óra után 70 %-os ethanolba helyeztem szállítás céljából.

Beágyazás

Beágyazásra az alábbi módszerek voltak alkalmazva:

- **Agar** Metszés előtt agarba ágyasztuk az agyakat: forró, folyékony agart tartalmazó blokkokba helyeztük az agyburkóktól megszabadított agyat,

majd azokat hűtőben lehűtöttük. A *Mobula japonica* agyak feldolgozása, azok nagy mérete miatt agaros beágyazási módszerrel nem volt lehetséges.

- **Paraffin** Abban az esetben, amikor több, mint egy egyed állt rendelkezésre az adott fajból, az agyak egy részét paraffinba ágyasztuk. Egy részletes leírás található alább a *Mobula* agyak esetében alkalmazott eljárásról, mely eljárás némileg módosult a különböző, kisebb agyú fajok esetében.

A különösen nagy méretű *Mobula japonica* agyak dehidrációja érdekében azokat a következő oldatokkal kezeltem: 80 % ethanolban tároltam 7 napig, 90 % ethanolban 7 napig, 96 % ethanolban 2 x 7 napig, 100 % ethanolban 3 x 1 napig, 1 % celloidin methylbenzoatban 1+2 napig, és xilolban 2 x 1 óráig. Beágyazás előtt az agyakat paraplast: xilol (1: 2, 1:1 és 2:1 arányú) oldatokban tároltam, fél-fél órát. Ezután paraplastban 12 órát tároltam, majd 2x1 napig. Az agyak végül paraplastba (Sigma, Paraplast Plus P3683) lettek ágyazva.

Metszés

Agaros blokkba ágyazott agyakból 60-100µm vastagságú harántirányú metszetek készültek Vibratome mikrotómmal és a metszetek foszfát pufferbe kerültek (0,1 M, pH 7.4).

Paraffinos blokkba ágyazott agyakból szánkás, Reichert mikrotómmal 10µm vastagságú metszeteket készítettem, amelyeket albuminos, vagy krómzselatinos tárgylemezre húztam fel.

Ahol az a szövegben külön említve van, félvékony metszetek készültek. Felszálló alkoholsorban és propilén-oxiddal történő dehidrációt követően az agyak epoxy gyantába (Durcupan) voltak ágyazva. A blokkokat Reichert ultramikrotómmal metszettem és a metszetek toluidin kékkel lettek megfestve.

Immunhisztokémia

Az úszó szeletek 90 percig voltak előkezelve 20%-os normál kecskesavóval (disztrobrein esetében normál lósavó) az ellenanyagok nem specifikus jelölődésének visszaszorítása érdekében. Ezt követően foszfát pufferes (PBS, Sigma, 0,01 M, pH 7,4) öblítés következett minden reagens cseréje között.

A következő primer antitesteket alkalmaztam:

monoklonális anti-GFAP, egér, 1:100; poliklonális anti-GFAP, nyúl, 1:100; monoklonális anti-glutamin- szintetáz, egér, 1:100; poliklonális anti S-100, nyúl, 1:100; poliklonális anti-aquaporin 4, nyúl, 1:200; poliklonális anti-aquaporin 9, 1:100; poliklonális anti- α dystrobrein, kecske, 1:100; monoklonális anti-disztroglikán, egér, 1:100; monoklonális anti-disztrofin, egér, 1:2; poliklonális anti-szintrofin, nyúl, 1:100; poliklonális anti-utrofin, egér, 1:10.

Az immunanyagok (feloldás után, ha liofilizált formában érkezett) a gyártók útmutatása alapján voltak tovább hígítva a feltüntetett arányban 0,5% Triton X-100 tartalmú PBS-ben. A metszetek 40 órát voltak inkubálva 4°C-on. A markereket minden fajon párhuzamos metszetek sorozatán alkalmaztam.

Kettős immunjelölést szintén alkalmaztam anti-disztroglikánnal és anti-disztrobreinnel, vagy anti-szintrofinnal.

Előhívás

Az immunreakciók az alábbi módok egyikével kerültek előhívásra: immunperoxidáz vagy immunfluoreszcens módszerrel.

DAB reakció úszó metszeteken

Az immunhisztokémiai reakció előhívása az „ABC-módszer” szerint történt. Az immunperoxidáz módszert használva biotinilált anti-egér vagy anti-nyúl immunoglobulin használatát követően, avidin és biotinilezett tormaperoxidáz komplex (ABC) 1:100 hígítású alkalmazása történt 90 percig (ABC: 10ml 0,3% Triton X-100 0,1 M PB-ben oldva, A oldat: avidin, 100% hígítás /2 csepp/ 10 ml/, majd B oldat: biotinilezett enzim, 100% /2 csepp/ 10 ml/; Vectastain kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA; lassú keverés, 30 perc múlva használható az oldat), szobahőmérsékleten. Az immunkomplex DAB-reagens (inkubáció 0,05 % 3,3'-diaminobenzidin, 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,4 oldatban) segítségével lett láthatóvá téve. A DAB reakció hidrogén-peroxid oldattal történt (0,01 % H₂O₂, 10 percre, szobahőmérsékleten). A metszeteket PBS-ből kerültek felhúzásra és száradás után DePeX-el lettek lefedve.

Fluoreszcens reakció úszó metszeteken

Az immunfluoreszcens módszer szerint másodlagos ellenanyagként Cy3 festékkel konjugált anti-egér immunoglobulint (Jackson Laboratories, Baltimore, USA) és fluoesczein-izotiocianáttal (FITC) konjugált anti-nyúl és anti-kecske immunoglobulinokat (Jackson

ImmunoResearch Lab., Inc., Baltimore, USA) használtam. A másodlagos ellenanyagok 1:250-re voltak hígítva PBS-ben és 3 óráig voltak alkalmazva szobahőmérsékleten, sötétben. Ezután egy órás mosás következett PBS-ben, majd a metszeteket glicerol: bidesztillált víz 1:1-es keverékében lefedtem és lakkal lezártam a fedőlemezek szélén. A Cy3 zöld fény (550nm) hatására vörös fényt (570nm) bocsájt ki, míg a FITC kék (495nm) megvilágítás hatására zölden (519nm) fluoreszkál.

DAB reakció paraffinos metszeteken

Az immunhisztokémiai reakciók paraffinba ágyazott metszeteken hasonlóképpen zajlottak, mint az úszó metszeteknél, néhány módosítással (tárgylemezre felhúzott metszetek, nedves kamra, rövidebb inkubációs idők).

A metszetek egy részén az orientáció segítése végett a sikeres immunreakció felülfestése történt hematoxin-eosinnal (HE) vagy krezilibolyával (Nissl), amelyeket DePeX-el fedtem le.

Kontroll

A primer ellenanyag elhagyásával készültek kontroll reakciók, amikor a primer ellenanyag csak annak oldó közegével lett helyettesítve. Struktúrához kötött színreakció nem volt megfigyelhető ezekben a metszetekben. Ezeknek a módszereknek a párhuzamos alkalmazása kiküszöbölte az endogén peroxidáz vagy az endogén biotin okozta álpozitivitást, illetve a spontán fluoreszcenciát (például a paraformaldehid hatására). Pozitív kontrollként patkány agykéreg, illetve csirke kisagy metszeteken is el lettek végezve az adott immunreakciók. Néhány esetben a

peroxidáz által előhívandó anyagok 3%-os hidrogénperoxiddal voltak előkezelve, hogy az az endogén peroxidáz aktivitást gátolja.

Mikroszkópizálás és térképezés

Az így elkészült metszeteket Olympus BX51 típusú mikroszkóppal lettek vizsgálva, majd DP50 digitális kamerával lettek fotózva. A képek kontrasztját ADOBE Photoshop 5 programmal állítottam utána.

Dupla jelölések esetében a fluoreszcens metszetekről zöld, illetve kék fény alatt készültek fotók, egymás után, ugyanarról a területről. Ez a két kép volt kombinálva, és halványan kontrasztosva szintén az ADOBE Photoshop 5 program segítségével.

A vizsgált porcos halak agyi struktúrák azonosítása, nomenklatúrája (terminológiája), illetve a rövidítések Ariëns-Kappers (1906), Northcutt (1978, 1981), Butler és Hodos (2005), elsősorban Smeets és mtsai. (1983), és Smeets (1997) leírásai alapján készültek, amelyekben a *Hydrolagus collei* (Holocephali), *Squalus acanthias*, *Scyliorhinus canicula* és *Raja clavata* volt leírva.

A makroszkópos struktúra bemutatása érdekében mikroszkóp metszet kivettítővel rostrocaudális rajzok sorozata készült, amelyek az eredeti metszetek kontúrjait mutatják.

Eredmények

Az uralkodó glia elem radiális endimoglia (tanicit) volt a cápák minden agyterületén. A telencephalonban a radiális glianyúlványok a kamrai és a meningeális felszínnek között átértek. Ezek endimális eredete

tisztán megfigyelhető volt, úgy, mint a végtalpak, amelyek a piális felszínt borították. Míg helyi eltérések minden vizsgált fajban találhatóak voltak, nem volt jellemző különbség a tancita rendszerben a különböző fajokban, még a galeomorf és squalomorf cápák között sem. Nem-ependimális sejtek mind a négy cápa fajban megtalálhatóak voltak, mind perivaszkuláris, mind apovaszkuláris pozícióban.

Glutamin szintetáz immunhisztokémiai reakciója több sejtet jelölt, mint a GFAP vagy az S100 antitestek használata. A legtöbb apovaszkuláris sejtnek poligonális perikarionja volt, rövid vagy relatíve hosszú nyúlványokkal, asztrocitákra hasonlítva. Tipikus, a madarakban és emlősökben megtalálható asztrociták azonban nem voltak gyakoriak. Cápák közül a legtöbb asztrocita-szerű sejt *Pristiophorus*-ban volt található.

A Rajiformes rendbe tartozó rájákban a telencephalikus kamrák redukálódtak és radiális endimoglia nyúlványok voltak megfigyelhetőek körülöttük, a többi rájával (*Torpediniformes* és *Myliobatiformes*) ellentétben, amelyekben az oldalkamrák már csak jelzetten vannak meg. Minden batoid telencephalonjában nagy számban volt található asztrocita. Rajiform rájákban GFAP immunhisztokémiai reakciót követően ezek kizárólag az erekben és a meningeális felszínen voltak megfigyelhetőek, úgy, mint egy korábbi vizsgálatban is (Kálmán és Gould, 2001). Glutamin szintetáz immunhisztokémiai festést alkalmazva a rajiform ráják és a *Torpedo* telencephalonjában mindenütt láthatóvá váltak az asztrociták. *Mobula*-ban nemcsak ezek a markerek, de GFAP is kimutatott nemcsak perivaszkuláris, de apovaszkuláris asztrocitákat is.

A perivaszkuláris gliát különböző elemek alkotják cápákban és rájákban, néhány esetben még ugyanazon a fajon belül is. *Mobula*-ban néhány perivaszkuláris glia csak a nyúlványaival kapcsolódott az érhez, amely általában az emlősökben fordul elő. A meningeális felszínen levő glia limitans szintén sejtek alkották, a nyúlványok végtalpai helyett, mely utóbbi a cápákban figyelhető meg.

Kimérában DAB-pozitív asztrocita-szerű struktúrák voltak megfigyelhetőek a telencephalonfalban, rövid, radiális nyúlványokkal, ritkás kis csoportokban, de soha nem az erekhez kapcsolódva. Ezek immunreaktívnak bizonyultak glutamin szintetázra és S100-ra, de GFAP-ra nem. A meningeális felszín, legalábbis részben gliasejtekkel volt borítva és néhány telencephalikus terület felismerhető volt a glia mintázat alapján.

Cápákban a diencephalikus és mesencephalikus kamrák nagyok voltak. Radiális tanyciták voltak körülöttük, amelyek végtalpakot alkottak a meningeális felszínen. A tectumban réteges struktúra volt felismerhető, asztrocita-szerű sejtek nagyon ritkán fordultak elő.

Skate-ekben és *Torpedo*-ban, a diencephalonban az asztrociták mellett radiális nyúlványok is megtalálhatóak voltak, myliobatiform rájákban csak rövid endimális nyúlványok, úgy, mint a mesencephalonban is. A tömör tectum meningeális felszíne asztrocita-szerű sejtekkel volt fedve.

Kimérában a diencephalonban és a mesencephalonban endimális eredetű radiális glia nyúlványok finom és sűrű szövedéke volt látható, és réteges mintázat volt megfigyelhető a tectumban.

A cerebellum struktúrája minden vizsgált cápa fajban hasonló volt: a fő rendszer radiális endimogliából állt, amely a molekuláris rétegbe nyúlt, mint a Bergmann-rostok. A cerebellum meningeális felszíne ezek végtalpaival volt borítva. A granuláris réteg glia nyúlványokkal volt behálózva, amelyek egy retikuláris mintázatot alkottak lyukakkal a granuláris sejteknek és a kisagyi glomerulosoknak.

Rájákban a kisagyi asztrogliá architektónia nem volt egyértelmű GFAP immunhisztokémia alapján. Az immunreakció S100-al, de leginkább a glutamin szintetázal azonban a cápákéhoz hasonló rendszert tett láthatóvá. *Mobula*-ban GFAP immunpozitív glia fészkeket alkotott a Purkinje sejteknek és a perivaszkuláris glia GFAP immunpozitívnek bizonyult a molekuláris rétegben is. A Bergmann-glia azonban nem volt immunreaktív GFAP-ra, csak glutamin szintetázra. Az eminentia granularis asztrogliá hálózata inkább asztrocitákból állt, mint endimogliából. Az idegkötegek által elfoglalt terület *Mobula*-ban számos GFAP immunpozitív asztrocitát is tartalmazott.

Kiméra kisagyban glia nyúlványok rendszertelenül futó hálózata volt megtalálható az eminentia granularisban nagy nagyítás mellett és pók alakú, asztrocita-szerű struktúrák is láthatóvá váltak, de ezt talán a különálló rostok kereszteződő oldalágai adták, míg a stratum moleculareban radiális rostok voltak megfigyelhetőek.

A rhombencephalon keresztmetszeteinek kontúrjai hasonlóak voltak cápákban és rájákban. A szürke- és fehérállomány asztrogliá architektóniája közötti különbség egyértelmű volt. A szürkeállomány

asztrogliáját finom nyúlványok sűrű szövedéke alkotta, a retikuláris területen glia nyúlványok kötegei hurkokat alkottak az axoncsoportok körül. A fehérállományban az axonok hosszú glianyúlványok által kötegeződtek, amelyek a középvonali glia szeptumból ágaztak el levélszerűen. Asztrociták nem voltak megfigyelhetőek ebben a régióban, kivéve *Myliobatis*-ban (a rhombencephalon zárt részében) és *Mobula*-ban, amelyben az asztrociták gyakoriak voltak a szürke állományban és a fehér állomány glia sövényeiben is előfordultak.

Cápákban, skate-ekben és *Torpedo*-ban a gerincvelői asztrogliá architektóniája a rhombencephalonban leírtakhoz volt hasonló. *Mobula* gerincvelőben a fehérállományt szintén egy glia sövény rendszer hálózta be, míg a szürke állomány asztrocitákat is tartalmazott.

Kiméra rhombencephalonban ugyanaz a három fő terület volt megkülönböztethető gliaszervezet alapján, a szürke, a fehér és a retikuláris gliaállomány. Egy erős glia sövény a középvonalban kettévált, enyhén szétágazott ventrális irányban, és legyező-szerűvé vált a bazális felszínnél.

A porcos halak agyi érrendszere világosan kirajzolódott DG- β immunfestéssel, úgy, mint emlősökben, és az érrendszerben előforduló fajok közötti eltérések is megfigyelhetőek voltak.

Disztrofin, utrofin, szintrofin, és α -disztrobrevin minden fajban kimutatható volt, de általában a jelölődés gyengébb volt, mint a DG esetében és soha nem mutatták ki az egész érhálózatot. Az AQP4 vagy AQP9 elleni immunfestés nem volt meggyőző.

Következtetések

1) Összességében véve az S100 immunfestés, de főleg a glutamin szintetáz több asztrogliá elemet mutatott ki, mint a GFAP immunfestés. Glutamin szintetáz elleni immunhisztokémiai festés nemcsak galeomorf cápákban és *Pristiophorus*-ban, de *Squalus*-ban (Squalomorphi) is kimutatott asztrocitákat, és GFAP immunnegatív asztrogliá struktúrákat rájákban.

2) A három Myliobatiformes rendből származó vizsgált fajok közül, *Mobula japonica*-ban GFAP immunopozitív asztrociták voltak megtalálhatóak minden agyterületen és csak *Mobula*-ban volt található néhány olyan perivaszkuláris glia, amely az emlősökhöz hasonlóan a nyúlványaival kapcsolódott az érhez.

Általánosságban a *Callorhinchus milii*, a tömörfejűek egy képviselőjének glia architektóniája a *Squalus acanthias*-éhoz hasonlóan bizonyult, amely a kevésbé fejlett agytípusú squalomorf cápákhoz tartozik. Néhány, a squalomorf glia mintázatnál előrehaladottabb fejlődést mutató tulajdonság is fellelhető volt azonban: néhány telencephalikus terület felismerhető volt a glia mintázat alapján, és a meningeális felszín, legalábbis részben glia sejtekkel volt borítva, nemcsak a radiális glia végtalpaival. A telencephalon féltekékben asztrocita-szerű elemek voltak kimutathatóak, amelyek jelenléte fejlettebb tulajdonságnak tekinthető.

A véregek immunfestése minden glia markerrel a

lemezeskopoltyúsokéhoz hasonlóan bizonyult, habár azok vér-agy gátjának alkotását más sejt típusnak tulajdonítják.

3) Az asztrogliá architektónia különbsége cápák (radiális endimoglia az uralkodó elem) illetve ráják (asztrocita az uralkodó elem) között csak a prosencephalonra és mesencephalonra korlátozódtak. Az asztrociták nem uralkodtak el a konzervatív agyterületeken, mint a rhombencephalonban, ellentétben a progresszív agyterületekkel.

4) A disztroglikán elleni immunfestés az egész érendszert láthatóvá tette porcos halakban, még a fajok közötti és regionális különbségeket is. A disztroglikán komplex és csatolt fehérjéi a vizsgált porcoshal fajok ereiben mindenhol megtalálhatóak voltak, míg az AQP4 és AQP9 valószínűleg nincs jelen, szemben a madarakkal és az emlősökkel.

5) Nem volt olyan specifikus asztrogliá struktúra, amely megkülönböztetné a galeomorf és squalomorf cápák agyát, különbség kizárólag a cápák és ráják között volt, azonban csak vékony agyfállal rendelkező cápa fajokat volt lehetőség vizsgálni. Úgy tűnik, hogy az asztrogliá struktúra inkább az agy makroszkópos struktúrájával van összefüggésbe, mintsem a lamináris/ elabrált kategóriákkal. Sem a vér-agy gátban levő különbségek, sem a cerebralizációban levő különbségek nem tükröződtek disztroglikán immunoreaktivitásbeli különbségekben. A telencephalonban azonban az érhálózat valamilyen szinten összefüggést mutatott az asztrogliá architektónia különbségeivel.

6) Habár az asztrogliá evolúciós változásai némiképp hasonlóan a lemezeskopoltyúsokban és a magzatburkosokban, egy fontos különbség

megfigyelhető volt: lemezeskopoltyúsokban az asztrociták a progresszív agyterületekkel ellentétben nem dominálnak a konzervatív agyterületeken.

Függelékben:

- 7) A nagy agyméret néhány porcoshal családban az élőhellyel, speciális termoregulációs képességekkel és/vagy az embrióba áramló megnövekedett energiaáramlással hozható összefüggésbe. A telencephalon megnövekedése azokban a porcos halakban van jelen, amelyek 3-dimenziós környezetben élnek (pelágikusak) és ez a megnagyobbodás talán a komplex szociális viselkedéssel függ össze. A nagy, erősen lebenyezett és asszimmetrikus cerebellum összefüggésbe hozható a széles körű migrációs viselkedéssel, és talán a lokomotoros aktivitással illetve a szenzorimotoros integrációval.

Köszönetnyilvánítás

A friss fajok nagy részét tasmán halászoktól kaptam, akiknek nagyon hálás vagyok a segítségükért. A friss egyedek megszerzéséhez nyújtott segítségükért köszönet illeti Barry Bruce, Alastair Graham, John Stevens and Michelle Treloar barátaimat CSIRO Marine Research Laboratories-ból (Hobart, Tasmania, Ausztrália), a Kotori tengerbiológiai Intézetet (Montenegro), a budapesti Tropicariumot, Glenn Northcutt professzort a Scripps Óceánográfiai Intézetben (San Diego, USA), John O'Sullivan barátomat a Monterey Bay Aquariumban (USA), Oscar Sosa Nishizaki-t a mexikói CICESE intézetből, João Pedro Correia-t a lisszaboni aquariumból (Portugália), Ellen Freund-ot és Heidi Dewar-t. Szeretnék köszönetet mondani Bakó Máriának és Oswald Erzsébetnek a szövettani feldolgozásban nyújtott segítségükért. A vizsgálatok a 60930 számú OTKA grant (Kálmán Mihálynak) és a Semmelweis Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolájának támogatásával készültek. Csillag Andrásnak professzor úrnak nagyon hálás vagyok a munka során nyújtott támogatásért és a disszertáció megírásához nyújtott hasznos tanácsokért.

Hálás vagyok a családomnak és a jó barátaimnak, akik keményen dolgoztak, hogy a lelkem egészséges maradjon abban a hosszú és nehéz időszakban, amíg megalkottam ezt a munkát.

A tézissel kapcsolatos közlemények:

Mihály Kálmán, **Csilla Ari**, 2002: Distribution of GFAP immunoreactive structures in the rhombencephalon of sterlet (*Acipenser ruthenus*) and its evolutionary implication; Journal of Experimental Zoology, 2002, 293: 395-406.

IF: 1,548

Csilla Ari, Mihály Kálmán, 2008. Evolutionary changes of astroglia in Elasmobranchii comparing to Amniotes: a study based on three immunohistochemical markers (GFAP, S-100, and glutamine synthetase) Brain Behav Evol 71:305-324.

IF: 2,195

Csilla Ari, Mihály Kálmán, 2008. Glial architecture of the ghost shark (*Callorhynchus milii*, Holocephali, Chondrichthyes) as revealed by different immunohistochemical markers, Journal of Experimental Zoology (közlés alatt)

IF: 2,756

Nem a tézissel kapcsolatos közlemények:

Gál János, Vincze Zoltán, Jakab Csaba, **Ari Csilla**, Lefler Kinga Katalin (2005) Multiplex nyeles fibroma homoki tigriscápa (*Carcharias (Odontaspis) taurus*) állkapcsán; Magyar Állatorvosok Lapja, 127.242-245.

IF: 0,114

Csilla Ari, João P. Correia, 2008: Role of sensory cues on food searching behavior of a captive *Manta birostris* (Chondrichthyes, Mobulidae), Zoo Biology, (közlés alatt)

IF: 0,779

Közlésre benyújtott cikkek:

Csilla Ari, 2008: The brain of *Mobula japonica* (spinetail devilray, *Myliobatiformes*, *Elasmobranchii*) in gross morphological and ecological perspectives, Journal of Fish Biology

Csilla Ari; Mihály Kálmán, 2008: Immunohistochemical detection of dystroglycan, and some of its associated proteins in the brain of chondrichthyes, Journal of Comparative Biochemistry and Physiology

Bemutatott posztterek:

Csilla Ari, Mihály Kálmán, 2001: Search for astroglia in the GFAP-free areas of the brains of cartilaginous and bony fishes applying immunohistochemical staining of glutamine synthetase and S-100 protein; Magyar Neurobiológiai Társaság Konferenciája, Szeged

Mihály Kálmán, Csilla Ari, 2001: Comparative study of astroglial markers, GFAP, glutamine synthetase and S-100 in skate brain; 96. Versammlung in Münster, Németország

Csilla Ari, Mihály Kálmán, 2003: Supposed sexual dimorphism on the cerebellum of the ray *Mobula japonica* (order Myliobatiformes); Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists and the American Elasmobranch Society, Manaus, Brazilia

Mihály Kálmán, Csilla Ari, Robert M. Gould, 2003: Similar tendencies in the evolution of astroglia in elasmobranchs and amniotes. Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists and the American Elasmobranch Society, Manaus, Brazilia

Csilla Ari, Mihály Kálmán, 2003: Morphometrical studies on the cerebellum of a ray species (*Mobula japonica*) of the order Myliobatiformes- sexual dimorphism? Magyar Neurobiológiai Társaság Konferenciája, Balatonfüred

Csilla Ari, István Stuber, 2004: Three-dimensional movements of captive Mobulids (*Manta birostris* and *Mobula mobular*); European Elasmobranch Society meeting, London, Anglia

Csilla Ari, Mihály Kálmán, Joao P. Correia, István Stuber, 2004: Analysis of movements by computerised tridimensional video reconstruction; Neuroscience Meeting, San Diego, USA

Csilla Ari, João P. Correia, 2005: A study on the sensory and learning

capabilities of a captive *Manta birostris* (Mobulidae); Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists and the American Elasmobranch Society Meeting, Tampa, USA

Mihály Kálmán, Csilla Ari, 2007: Evolutionary correlations of brain structure and glial architecture in Chondrichthyes: forebrain and hindbrain. 5th European Conference of Comparative Neurobiology, Paris, Franciaország

Megjelent abstractok:

Csilla Ari, Mihály Kálmán, 2001: Search for astroglia in the GFAP-free areas of the brains of cartilaginous and bony fishes applying immunohistochemical staining of glutamine synthetase and S-100 protein; Neurobiology

Mihály Kálmán, Csilla Ari, 2001: Comparative study of astroglial markers, GFAP, glutamine synthetase and S-100 in skate brain; Anat Supl 183: 104.

Csilla Ari, Mihály Kálmán, 2003: Morphometrical studies on the cerebellum of a ray species (*Mobula japonica*) of the order Myliobatiformes- sexual dimorphism? Clinical Neuroscience 56:5.