

A NAPI ÉS ÉVSZAKOS RITMUS BEÁLLÍTÁSÁÉRT FELELŐS CORPUS PINEALE ÖSSZEHASONBLÍTÓ FINOMSZERKEZETI ÉS IMMUNCITOKÉMIAI VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ GERINCESEKBEN

TÉZISEK

Dr. Fejér Zsolt

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vígh Béla egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Buzás Péter PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Somfai Gábor PhD, egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Keller Éva egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. László Lajos egyetemi docens, C.Sc.
Dr. Gerber Gábor egyetemi docens, C.Sc.

Budapest
2009

BEVEZETÉS

A corpus pineale a diencephalon legfelső, epithalamikus részéhez tartozik, amelyhez a habenulákkal kapcsolódik. Madarakban és emlősökben a szerv két embrionális telepől fejlődik, ami emlősökben és emberben a recessus intrapinealis előtti és mögötti szervterületnek felel meg. Körszájúaktól hullókgig a két telep különálló marad és két pineális szervet képez. A pineális szervek elvi felépítése hasonló, gliasejteken kívül retinális csap-jellegű fotoreceptor sejtekből és a retina másodlagos neuronjainak megfelelő neuronokból áll.

Körszájúak, halak és kétéltűek pinealocytaival szemben madarak és emlősök pinealocytaikat fejletlenebbeknek tekintik és mivel az emlős, ember pinealocyta – elsősorban felnőtt korban - nem rendelkeznek differenciált fotoreceptor kültaggal a legtöbb szerző ezt úgy értékeli, hogy elvesztették fényérzékelő képességüket. Bár fotoreceptor molekulák emlős pinealocytaikban is kimutathatók, mégis feltételezik, hogy a napi és évszakos bioritmus szabályozásához a retinából kapnak fényinformációt, még pedig a szimpatikus idegek segítségével, mivel a szimpatectomia gátolja a pineális melatoninképzést.

Körszájúaktól madarakig a pineális szervek *nemvizuális fotoreceptorok*, tehát nem a képlátást szolgálják, hanem mint fényintenzitás mérők a környezet circadián és circannuális megvilágításváltozását detektálják. A circadian és circannuális ritmus szabályozásában fontos szerepet játszik a corpus pineale melatoninképzése: a fény gátolja a melatonin szekréciót, tehát legtöbb éjjel termelődik. A melatoninnak többek közt antigonadotrop hatása van, ami közvetlenül befolyásolja a hormonrendszer működését és a szervezet napi, ill. évszakos ritmusát szabályozza.

A különböző szervek normális napi ritmusát alapfokon önregulációs genetikai órák („slave clocks”) irányítják, amelyek 24 órás diurnális, circadián ritmust diktálnak. Az egyes szervek napi

ritmusát a hypothalamikus nucleus suprachiasmaticus („master clock”) koordinálja. A koordinált működést a föld különböző pontjain lévő biotóp viszonyokhoz állítják be a pineális szervek, ill. a nemvizuális fotoreceptorok.

A retina vizuális fényérzékelése mellett szintén rendelkezik nemvizuális fotorecepcióval, e funkcióban elsősorban kriptokrómokat, pinopszint és OS-2 ellenanyaggal detektálható fényérzékeny molekulákat tartalmazó sejtek vesznek részt.

Hasonló nemvizuális fényérzékeléssel bírnak az ú.n. *mély encephalikus fotoreceptorok*, mint a recessus preopticus liquorkontakt neuronjai, vagy a septális fotoreceptor sejtek submammalia fajokban. E neuronokban pinopszint és egyéb opszinokat mutattak ki, valamint a fotorecepciók kaszkád egyéb molekuláit. Szerepet játszanak a szaporodási periodusok beállításában és a gonádok fotoperiodikus reakcióiban. Feltételezhető, hogy hasonló mély encephalikus fotoreceptorok emlősökben is működnek, elsősorban perinatálisan, pl. egérben encephalopsin található az area preopticában és a nucleus paraventricularisban.

A napi ritmus gyakorlati orvosi jelentőségét az adja, hogy az éjjeli megvilágítás - gátolva a pineális melatonin termelést - megzavarja a szervezet ritmusát. Az éjjeli fény – egyéb rendellenességek mellett – nőkben emlőrákot, férfiakban colorectalis és prostata carcinomát okozhat, amint azt a legutóbbi vizsgálatok bizonyították. Mivel a melatonin termelést elsősorban a rövidhullámú fény gátolja, ennek az éjszakai világításból való kiiktatása, és színszűrő szemüveg éjszakai munkában való alkalmazása indokolt.

A napi és évszagos ritmus beállításért felelős corpus pineale részletes összehasonlító finomszerkezeti és immuncitokémiai vizsgálatát emlősökben és submammáliákban végeztük, különös tekintettel ezen egyedekben található eltérő viszonyokra.

CÉLKITŰZÉSEK

Elsődleges feladatomnak tartottam *a pineális szervek összehasonlító finomszerkezeti vizsgálatát és fejlődését* különös tekintettel a különböző differenciáltságú fajokra, így madarakban és speciális emlősökben található szerkezeti viszonyokra, ill. a szerv szövettani szerkezetének a retina szerkezetével való összehasonlítására.

Munkám másik céljának a *corpus pineale neurális, hormonális és nemszinaptikus kapcsolatainak vizsgálatát* választottam. E témarészben kiemelt szerepet kaptak a pineális szervek meningeális tereiben lévő autonóm rostok, ezek viszonya a pinealis idegszövethez és a pineális erekhez.

A pontosabb finomszerkezet és afferentáció-efferentáció ismerete mellett a pineális szervek molekuláris komponenseinek meghatározása látszik a legfontosabbnak, ami elősegítheti a funkció jobb megismerését. E célt szolgálják *immuncitokémiai vizsgálataink*, amelyeket ugyancsak különböző fajok összehasonlításával végeztem.

Az acervulusok emberi és általános emlős-faji megjelenésén kívül madárfajokban is észlelhetők. E munka kapcsán összehasonlítottam a corpus pineale, a környező agyterületek és a retina viszonyát a kalcifikáció szempontjából, továbbá a kalcifikáció és fotorecepció összefüggését.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

KÍSÉRLETI ÁLLATOK

A **madarak** pineális szervének finomszerkezeti vizsgálatához a következő fajokat használtuk:

Galliformes: házityúk, (fehér leghorn, Gallus domesticus), gyöngytyúk (Numida meleagris), fácán (Phasianus cochicus), fűrj (Coturnix coturnix japonica), pulyka (Meleagris gallopavo);
Columbiformes: parlagi galamb (Columba livia); *Anseriformes*: nyári lúd (Anser anser), tőkésréce (Anas platyrhynchos);
Passeriformes: házi veréb (Passer domesticus), zebraapinty

(*Taeniopygia guttata*), feketerigó (*Turdus merula*) és léprigó (*Turdus viscivorus*), kanári (*Serinus canaria*), széncinege (*Parus major*); *Psittaciformes*: hullámos papagáj (*Melopsittacus undulatus*); *Falconiformes*: egerészölyv (*Buteo buteo*); *Struthioniformes*: strucc (*Struthio camelus*).

A **denevéreken** végzett corpus pineale és retina vizsgálatok az alábbi fajokon történtek: hegyesorrú denevér (*Myotis blythi oxygnatus*); nagy patkósdenevér (*Rhynolophus ferrumequinum*); hosszúszárnjú kriptadenevér (*Taphozous longimanus*); ázsiai sárga denevér (*Scotophylus hethai*); repülő róka (*Pteropus temmincki*); rövidorrú repülőkutya (*Cynopterus sphinx*); nílusi repülőkutya (*Rousettus aegyptiacus*).

A corpus pineale autonóm idegrostjait a következő fajokon vizsgáltuk: **emlősök**: laboratóriumi patkány (*Rattus norvegicus*), szíriai aranyhörcsög; (*Mesocricetus auratus*), menyét (*Mustela nivalis*); **madarak**: házityúk (*Gallus domesticus*), fűrj (*Coturnix coturnix*), egerészölyv (*Buteo buteo*); **hüllők**: fali gyík (*Lacerta muralis*), vízisikló (*Natrix natrix*); **kétéltűek**: kecskebéka (*Rana esculenta*), tarajos göte (*Triturus cristatus*), pettyes göte (*Triturus vulgaris*); **halak**: tövises rája (*Raja clavata*), ezüstkárász (*Carassius auratus*); **körszájúak**: folyami ingola (*Lampetra fluviatilis*).

A denevéreket, a *Myotis* faj kivételével, a benáereszi Zoológiai Intézet denevértenyészetéből kaptuk. A *Myotis* fajt hazai barlangokban gyűjtöttük. A *Rousettus* fajt a budapesti Állatkert tenyészetéből vásároltuk. Az állatokat normál laboratóriumi fényviszonyok mellett tartottuk. A fenti állatok kísérletekre történő felhasználásához az alábbi engedélyekkel rendelkezünk: 22.1/3700/003/2008 (Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal); 43327-2/2008 (Közép-Duna-völgyi Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Felügyelőség), valamint 778/000/2005 (Fővárosi Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás).

ELEKTRONMIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK

A kísérleti állatokon fixálás előtt éter vagy fenobarbitál anesztéziát alkalmaztunk. A perfúziós fixálást az aortán át végeztük,

0.1-2% glutáraldehyd- és 2% paraformaldehyd-tartalmú Millonig pufferrel (0,24M foszfátpuffer). Az eltávolított pineális szerveket és retinát a pufferes mosást követően glutáraldehyddel egy órán át utófixáltuk, etanolban dehidráltuk, majd PolyBed 812-be (Polysciences, St. Goar, Németország) ágyasztuk. A metszeteket Reichert Ultracut S ultramikrotommal készítettük. Az ultravékony metszeteket uranyl acetáttal és ólomcitráttal kontrasztoltuk. A félvékony metszeteket toluidinkék azur II-vel festettük. Az elektronmikroszkópos immunreakciókat nikkell rácstra helyezett, aranyozott ultra vékony metszeteken végeztük (postembedding festés).

TIROZIN-HIDROXILÁZ REAKCIÓ

A vegetatív rostok differenciálásának elősegítésére tirozin-hidroxiláz immunfestést végeztünk, poliklonális és monoklonális ellenanyagokkal (Sigma, St. Louis, MO).

PINOPSZIN IMMUNCITOKÉMIAI KIMUTATÁSA

A csirke-pinopszin specifikus nyúl poliklonális ellenanyag az intézetünkben készült, egy C terminális eredetű, 14 aminosav hosszúságú peptid felhasználásával.

RETINÁLIS OPSZINOK KIMUTATÁSA

A következő, csirke csapok segítségével előállított egér monoklonális ellenanyagokat alkalmaztunk: az OS-2, amely kék és UV érzékeny fotopigmentre specifikus és a COS-1-et, amely zöld és vörös érzékeny pigmentre specifikus. A postembedding reakciót DAB-bal vizualizáltuk.

KALCIUM KIMUTATÁS

Saját vizsgálatainkban a corpus pineálékból készült fénymikroszkópos metszeteket Kossa-féle kalcium-kimutatással festettük. Elektronmikroszkópos célra piroantimonátos kalcium-kimutatást használtunk.

EREDMÉNYEK

A PINEÁLIS SZERVEK ÖSSZEHASONLÍTÓ FINOMSZERKEZETI VIZSGÁLATA

A vizsgált körszájúakban, porcos és csontos halakban a corpus pineale még csak egyszerű megnyúlt, nyélen ülő hólyagszerű kitüremkedése az epithalamus tetőlemezeének. Külső felszínét az epithalamikus agyhártyák borítják, amelyeket a szerv szövetétől a pineális endymasejtek és gliasejtek nyúlványainak végén képződött gliatalpalkotta membrana limitans gliae superficialis választja el.

A corpus pineale belsejében üreg található, amely a harmadik agykamra recessus pineálisának felel meg és a pineális nyélen keresztül közlekedik a kamraüreggel.

A pinealocyták dendritikus nyúlványa az endymán áthaladva belép a pineális üregbe. Az endymát áthaladtában sejtkapcsoló struktúrák kötik a hámsejtekhez. A pineális lumenben a pinealocyták dendritjei megvastagodva beltagot képeznek, amelyből a csilló alapszerkezetű kültag ered.

A szerv differenciáltabb fajokban fokozatosan nagyobbodik. Előbb fala kiboltosulásokat képez, amelyek fokozatosan növekedve szekunder öblöket képeznek. A pineális recessusok között a pineális agyhártya mélyen benyomul a szerv belsejébe, magával vive az ereket és az érköri idegrostokat.

A kültagok fotoreceptor membránjának regresszióját a szerv növekedésével összevetve a fényreceptor struktúrák száma az evolúcióval nem csökkenni, hanem növekedni látszik.

Madarak pineális szervének finomszerkezete

Madarakban a pineális szerv közvetlenül a koponya alatt helyezkedik el és az epithalamusszal hosszabb pineális nyél köti össze. Az általunk vizsgált fajokban a szerv fala zsákszerű kitüremkedéseket képez. Külső felszínét a diencephalikus pia mater és arachnoidea borítja. Az agyhártyák mélyen betérjednek a

recessusok mentén a szervbe, de mindvégig szeparálódnak a pineális idegszövetből a lamina basalisok útján.

A madár **pinealocyták perikaryonja** a pineális folliculusok lumeni felszíne közelében helyezkedik el az ependymasejtek között. Az általános sejtorganellek mellett a plazmában a különböző fajokban eltérő nagyságú és számú szemcsés vesicula található. A pinealocyták, neuronokhoz hasonlóan bipolárisak: receptor és effektor nyúlvánnyal rendelkeznek, amelyek a funkciónak megfelelő citológiai differenciáltságot mutatják.

A pinealocyták **receptor nyúlványa** dendrit-jellegű, cytoplasma organelleket tartalmaz, vége benyúlik az ependymasejtek között a pinealis lumenbe. Az ependymasejtekhez junciós struktúrák kötik. A dendrit terminális megvastagodása, a retinális csapokhoz és pálcikákhoz hasonlóan beltágot képez. A **beltágon** számos mikroboholy és egy szenzoros csilló található, benne számos mitochondrium, bazális test és akcesszórius bazális test helyezkedik el. A szenzoros csilló – a retinális kultag összekötő részéhez hasonlóan - $9 \times 2 + 0$ mikrotubulusképlettel rendelkezik. A pineális "összekötő rész" a vizsgált madarakban hosszú, disztális vége megvastagszik és a retinális fotoreceptorokhoz hasonló kultagot képez. A **pineális kultagok** a csillók körtealakú megvastagodásai, amelyek váltakozó számú fotoreceptor lamellából állnak, közöttük szemcsés cytoplazmával.

A pinealocyták **effektor nyúlványa** axon-jellegű, mitochondriumok mellett párhuzamosan futó mikrotubulusokat és szemcsés vezikulumokat tartalmaz. A pinealocyták axonja elágazódhat és vagy a szekunder pineális neuronokon végződik, vagy neurohormonális terminálist képez a pineális idegszövet felszínén.

A corpus pineáléban a retinához hasonlóan **szekunder neuronok** találhatóak, amelyek egyrésze bipoláris, másrésze multipoláris. A neuronokon nemcsak pinealocyta axonvégzések találhatóak, hanem azok ribbons végződéseitől eltérő axonterminálisok, amelyek interneuronális kapcsolatokat vagy pinealopetális afferenciációt képviselhetnek.

A pinealocyták axonjainak *preszinaptikus terminálisa* a szekunder pineális neuronokon végződik. A pinealocyta axonok mind axodendritikus, mind axoszomatikus szinapszisokat képeznek, amelyek számos szinaptikus vezikulát és szinaptikus ribbont tartalmaznak. A ribbonok a megvastagodott preszinaptikus membránhoz kapcsolódnak.

A pineális lument borító cilindrikus *ependyma* a harmadik agykamra ependymájának folytatása. A sejtek egyrésze eltávolodott a harmadik agykarma divertikulumát képező recessus pineálistól és a pineális idegszövetben, mint *astrocyta* ill. *oligodendrocyta* helyezkedik el.

A corpus pineale vizsgálata denevérben

Az emlősök között a denevér corpus pineáléja, mind pedig retinája speciális felépítésű az állat éjszakai életmódja miatt.

A vizsgált fajok *pinealocytaí* polarizáltak, a “receptor pólust” $9 \times 2 + 0$ szerkezetű csilló jellemzi. Fejlődő retinális kültagokhoz hasonlóan a csillók egyrésze megvastagodhat és benne vesiculumok találhatóak. A csillóhoz két bazális test és csillógyökér tartozik.

A pinealocyták “effektor pólusa” elágazó, axon-jellegű nyúlványt képez, az axonvégződésben szinaptikus és szemcsés vezikulák vannak. A terminálisok szekunder pineális neuronokon végződnek. Egy részük neurohormonális terminálisokat képez, nagyobb részük a corpus pineale vaszkuláris felszínénél végződik a lamina basalisra. Pinealocyta nyúlványok, a recessus pinealis ependymasejtei között, a kamrai lumennel is érintkezhetnek. A lumenben szemcsés vezikulákat tartalmazó vékony axonok helyezkednek el.

A *pineális neuronok* – a pinealocyttal ellentétben – világos citoplazmájúak, jól fejlett endoplazmás retikulumot és szemcsés vezikulákat tartalmaznak. A perikaryonokon hasonló szemcsézettségű szomatodendritikus szinapszisok vannak. A sejtek közötti pineális idegrost-zónákban velőshüvelyű és csupasz axonok és axodendritikus szinapszisok találhatóak.

A CORPUS PINEALE ÉS RETINA ÖSSZEHASONLÍTÓ FINOMSZERKEZETE

A vizsgált *mikrochiroptera* denevérfajok szeme kisméretű és retinája fejletlen. A kültagok pálcika típusúak, a beltágokban számos mitochondrium található. A külső szemcsés réteg viszonylagosan fejlett, míg a ganglionáris rétegben kevés sejt foglal helyet. Néhány nagy ganglionáris sejt a bipoláris rétegben található.

A mikrochiropterákkal ellentétben a gyümölcsevő *megachiropterák*ban a retina fotoreceptor rétege fejlett, sejtjei hosszú kültagokkal rendelkeznek, spherulusai szinaptikus ribbont tartalmazznak. E fajokban a retina jellegzetessége, hogy a fotoreceptor réteg (a kül- és beltágok) redőket és kriptákat képez. A belső szinaptikus zóna, a ganglion sejtek rétege és a látóidegrostok rétege redőzetlen marad.

A CORPUS PINEALE NEURÁLIS, HORMONÁLIS ÉS NEMSZINAPTIKUS KAPCSOLATAI

Perivazális autonóm idegrostok

Az összes vizsgált fajban a vegetatív rostok erek mentén érkeznak a corpus pineáléba. Annak meningeális tokja felől és a szerv interfollikuláris-meningeális sövényeiben jutnak a szerv belsejébe. A legtöbb rost velőtlen, de velős rostok is megfigyelhetők. A kötegeket Schwann sejtek, valamint vékony endo- és perineurális kötőszövet borítja.

Több idegrost található emlősökben, madarakban és hüllőkben, mint kétéltűekben, halakban és körszájúakban. Idegrostok nemcsak a corpus pineálét ellátó artériák mentén érkeznak, hanem a vena cerebri magnába ömlő vénák mentén is (nervus conarii).

Az idegeket sorozatmetszeteken követve megfigyelhető, hogy azok nem lépnek be magába a pineális idegszövetbe, hanem a meningeális sövényekben maradnak és idegvégződéseket képeznek a pineális arteriolák simaizomsejtjein. Axonvégzódások azonban a pineális vénák körül is találhatóak.

Mind a periarteriolaris, mind a perivenalis rostok mutatnak tirozin-hidroxiláz reakciót. Ezen felül a pineális idegszövetben is találhatóak immunreaktív idegrostok, amelyek (sorozatmetszeteken vizsgálva) nincsenek kapcsolatban a meningeális rostokkal, hanem az intrapinealis neuronokból jönnek. Az intrapinealis TH⁺ idegsejtek axonjai a pineális nyélhez futnak.

A corpus pineale neurohormonális efferenciációja

A pinealociták effektor pólusán induló axonális nyúlvány egyrészt a pineális szekunder neuronokon képez axodendritikus és axoszomatikus szinapszist, másik része viszont kifut a szerv felszínére. Itt a végződések a pineális idegszövet lamina basalisához kapcsolódnak a lamina limitans gliae perivascularis gliatalpai között.

A vizsgált *madarakban* számos pineális axon fut a felszínhez, ahol körülírt neurohormonális areát képeznek. A pinealocyták neurohormonális idegvégződései sejtkapcsoló struktúrákkal kötődnek a szomszédos gliatalpakhoz és a felszíni lamina basalison fél-dezmoszómát képeznek. A fél-dezmoszómáknál szinaptikus vezikulák felhalmozódása észlelhető több fajban (galamb, ölyv, strucc).

Emlős fajok corpus pineáléjában is találhatóak neurohormonális terminálisok. Denevérben a pinealocyták axonvégződéseinek nagyrésze képez neurohormonális terminálisokat. Egyes fajokban, mint a *Myotis blythi oxignatus*, a **venae cerebri internae** közvetlenül érintkeznek a corpus pineale lateralis részével. Számos axonterminális – amelyek 60-120 nm átmérőjű granularis és szinaptikus vezikulákat, valamint szinaptikus ribbonokat tartalmaznak – található a vénákkal szemben.

A CORPUS PINEALE NEMSZINAPTIKUS AFFERENCIÁCIÓJA

Pineális liquorkontakt neuronális terminálisok

Alacsonyabbrendűek pineális szerveiben a retinális Landolt bipolárisokhoz hasonló neuronok találhatóak. Porcos halak subependymális neuronjai csillós dendritet küldenek a pineális

lumenbe. A vizsgált kételtűekben a pinealocyták egy csoportja a szerv bázisánál a III. agykamra tetőrészébe nyúlik.

Néhány emlősben a recessus suprapinealis és recessus intrapinealis szintén tartalmaz pinealocyta dendritvégződéseket, amelyek közvetlenül érintkeznek a III. agykamrai liquorral. A sejtek axonjai a habenuláris magokba követhetők. Macskában a kisméretű, GABA-immunreaktív pineális neuronok dendriteket küldenek a recessus intrapinealisba és a recessus suprapineálisba.

Pinealocyta dendritek agykamrai kapcsolata

A pinealocyták „liquorkontakt” nyúlványai a recessus pineális ependymasejtjei között a kamrai lumennel is érintkezhetnek. Ezek egyrésze szerkezete alapján dendritnek tekinthető. A recessus pinealis lumenében szemcsés vezikulákat tartalmazó vékony axonok is találhatóak.

A pineális lumenek a III. agykamra recessus pineálisából képződnek, hasonlóak a retina interfotoreceptor teréhez, amely a III. agykamrai recessus opticusból fejlődik. A retinális interfotoreceptor térrel ellentétben a pineális lumen számos fajban megtartja kapcsolatát a III. agykamrával. Ahol a recessus pinealis és a pineális lumen kapcsolata embrionálisan megszűnik, ott megfigyelhető, hogy nemcsak a pineális lumenbe, hanem a recessus pineálisba is nyúlnak be pinealocyta dendritek.

A pineális intersticiális tér kapcsolatai

A pineális recessusokat bélelő ependyma cilindrikus vagy köbös hámot képez. A hámsejtek a III. agykamra ependymájához hasonlóan – amelynek közvetlen folytatását képezik – szoros sejtkapcsoló struktúrákat nem képeznek. A III. agykamra liquortere a pineális idegszövet sejtközötti terének intersticiális folyadékától nincs izolálva, ami a nemszinaptikus szignáltranszdukció szempontjából jelentős.

A CORPUS PINEALE CITOKÉMIAI VIZSGÁLATA

Citokémiai vizsgálataimban a pineális szervek fotorecepciójában szereplő molekulák, pinopszin és retinális fotopigmentek expresszióját vizsgáltam.

A **pinopszin** a corpus pineáléra specifikus opszin, abszorpciós maximuma 470 nm. Saját készítésű antiszérumunk segítségével a pinopszin finomszerkezeti lokalizációját különböző differenciáltságú gerincesek pineális szerveiben vizsgáltuk. Az immunreakció a pineális kültagok fotoreceptor membránjára lokalizálódott. A vizsgált fajok közül a legerősebb reakciót madarakban és hüllőkben találtuk, míg a differenciáltabb és kevésbé differenciált fajokban (kétéltűek, halak, körszájúak, valamint emlősök) a reakció intenzitása gyengébb volt. Nem találtunk pinopszin immunreakciót a Lampetra (Cyclostoma) pineális és parapineális szervében. Csak közepes-gyenge reakciót kaptunk halak pinealocytaínak kültagjában. A halak parapineális szerve és békák frontális szeme negatív volt.

A vizsgált siklófajt kivéve erős reakciót kaptunk a hüllők egyes pinealocytaiban, de a parietális szem negatívnak bizonyult. Madarakban a pinealocyta többsege pozitív volt, szemben a vizsgált emlősökkel, amelyek pinealocytaí nem reagáltak az antitesttel.

A corpus pinealét a *retinával összehasonlítva* a hüllő retina csap-típusú fotoreceptor kültagjaiban és a madár retina pálcika-típusú kültagjaiban kaptunk pinopszin immunreakciót.

A **retinális fotopigmentek** jelenlétét submammaliák közül a **körszájú** Lampetra pineális szervében, az un. pineális retinában, továbbá a parapineális szerv ventromediális régiójában volt kimutatható. **Porcos és csontos halakban** a pinealocyta kültagok többsége jelölhető *rodopszin* ellenanyaggal. A vizsgált **békafajokban** a corpus pineale és a frontális szerv pálcika-típusú fotoreceptor sejtjei egyaránt jelölődtek rodopszinnal.

Madarokban rodopszin immunreakció az összes pinealocyta fotoreceptor membránjában észlelhető, szemben a retinával, ahol

csak a pálcikák pozitívak. Az elektronmikroszkópos immunreakció jól mutatja a fotoreceptor membránok specifikus jelölődését, és hasonlóságát a pineális és retinális kültagokban. **Emlősökben** egyes pinealocyták perikaryonja mutat rodopszin immunreakciót, míg más perikaryonok negatívak.

Rodopszinon kívül a vizsgált halakban és békafajokban a corpus pineale és a frontális szerv pálcika-típusú fotoreceptor sejtjei jelölődnek az **OS-2** monoklonális ellenanyaggal, valamint **RET-2**-vel is. Lacertiliákban a kisméretű pineális fotoreceptor reagál **COS-1** ellenanyaggal, hasonló reakciót kaptunk retinális pálcika kültagokban is.

PINEÁLIS KALCFIKÁCIÓ ÉS FOTORECEPTÍV FUNKCIÓ

Acervulusokat **submammáliák** közül csak a madarakban figyeltünk meg. **Emlősök** közül patkányban a fiatal (100-200 g) állatokban acervulusokat csak ritkán találtunk. Idősebb, 400-500 g-os állatok már mindegyikében megjelentek a konkrementumok. Elsősorban meningeális típusú acervulusok léptek fel. Hasonló mészszemcsék találhatóak a denevér és nyérc corpus pineálját borító agyhártyában is.

Elektronmikroszkóppal jól megfigyelhető a corpora arenacea koncentrikus szerkezete. Az acervulusok körüli sejtekben kisméretű vezikulákban is találhatóak Ca-piroantimonát szemcséket. A metszeteket EDTA decalcinálásnak vetve alá, a szemcsék elektrondenz anyagukat elvesztik, mutatva kalcium tartalmukat. Magában a pineális szövetben kisméretű mikroacervulusok találhatóak a vizsgált fajokban.

Piroantimonát módszerrel Ca-felhalmozódás mutatható ki a pinealocyták sejtmembránja mentén is a vizsgált emlős fajokban. Hasonló lokalizációt emberi corpus pineáléban is sikerült kimutatni. Egyes területeken a sejtközi térben nagyobb mennyiségű Ca-piroantimonát szemcse gyűlik fel és mikroacervulus jellegű kondenzáció látszik. A sejtmembránon ülő szemcséktől a kisebb-nagyobb konkrementumokig, a folyamatos átmenet minden formája

megtalálható, ezért feltételezzük, hogy a kalcium felhalmozódásnak elsődleges forrása valamilyen pineális sejtmembrán tevékenység.

KÖVETKEZTETÉSEK

A pinealocyttákat az összehasonlító finomszerkezeti vizsgálatok alapján, nem gliasejteknek vagy belsőelválasztású mirigysejteknek, hanem a retinális csapokhoz és pálcikákhoz hasonló szerkezetű és fejlődésű idegelemeknek tekintjük. Emlősökben $9 \times 2 + 0$ -ás típusú érzőcsillóval rendelkeznek, amelyek egyes emlősökben (pl. menyétben) valamint submammáliákban fotoreceptor kültagokká differenciálódnak. A pinealocyták dendritikus nyúlványai megvastagodva – retinális fotoreceptorokhoz hasonló – beltagekat képeznek és a III. agykamra recessus pineálisából képződött pineális lumenekbe nyúlnak.

A legtöbb submammáliában az ún. pineális komplexumot a diencephalon tetőlemezéből képződött két szerv képezi: hullőkben a coprus pineale és a parietális szem, békafajokban a pineális szerv és a frontális szerv (frontális szem), körszájúakban és csontos halakban pedig a pineális és parapineális szerv. A két szerv a folyami ingólához hasonló, feltételezett ősgerinces páros dorzális diencephalikus szeméből eredhet.

Mindkét pineális szerv tartalmaz - ependymális és glia elemeken, valamint neuronokon kívül - csap- és pálcikatípusú pineális fotoreceptorsejteket. A pineális fotoreceptorok polarizált, bipoláris sejtek, receptor pólusukat dendritikus nyúlvány alkotja, amelyen a pineális lumenbe nyúló beltage és kültage található. A kültage képező fotoreceptor az érzőcsillóra jellemző $9 \times 2 + 0$ -ás tubulusképlettel rendelkezik. A vizsgált fajok többségében a kültagecsilló változó mennyiségű fotoreceptor membrán multiplikációt tartalmaz.

A filogenezisben az ősgerinces négy szeme közül a dorsális, parietális szemek „fotodoziméter” jellegű működésre differenciálódtak, szemben a laterális szemek retinájával, amely „lokátor” működésre alakult. A retina redőzetlen maradt, hogy

kivetítő ernyőként fogadhatta a külvilág kétdimenziós képeit, amelyet a szemlencse és cornea vetít rá. A képek a két szem különbsége folytán háromdimenziós információvá alakulnak.

A hüllők parietális szeme is rendelkezik direkcionális fényérzékeléssel, mivel redőzetlen retina-rész, valamint lencse is tartozik hozzá. Ez teszi lehetővé a napsütötte helyek felkeresését a hüllőknél oly fontos testhőmérsékleti reguláció érdekében. Hasonló szerepe van a békák homlokszemének is.

A retinával és a homlok- ill parietális szemmel ellentétben a corpus pineale „redőzött retinává” alakult, ezzel a fotoreceptorok száma és a szerv fényérzékenysége növekedett. A redőket képző follikulusokat gyakran mirigyes szerkezetnek vélik, de valójában a retina fotoreceptor részével analóg terek, a beléjük nyúló fotoreceptor bel- és kültagok jelenléte miatt.

A különböző pineális szervek eltérő fotoreceptorokat tartalmaznak, pl. békában az extrakraniális frontális szem elsősorban csapokat tartalmaz, ami összefügghet a szerv termoregulációs működésével. Az intrakraniális pineális szerv viszont pálcika-típusú fotoreceptorokat tartalmaz és a környezeti megvilágítás cirkadián és cirkannuális változását hivatott detektálni.

A közvetlen napsugárzási helyek felkeresése hasznos lehet hidegvérűekben, de a melegvérű és magas hőmérsékletű madarakban már jelentőségét veszítette. A madarak páratlan pineális szerve a hidegvérűek intrakraniális pineális szervének felel meg. A fűj embriókban látható páros corpus pineale viszont a szerv eredeti, kettőzött telepére utal.

Korábbi és ma is elterjedt irodalmi nézet, hogy az evolúció folyamán a pinealocyták fotoreceptor kültagjainak visszafejlődésével mirigysejteké alakultak át és emlősökben már csak a retinától kapnak fényinformációt, szimpatikus vegetatív idegrostok közvetítésével. E nézettel szemben immuncitokémiai vizsgálatok a retinális fototranszdukciós kaszkádban ismert molekulákat mutattak ki: nemcsak cyclostomatákban, halakban és kétéltűekben, hanem hüllőkben, madarakban és emlősökben is. A differenciáltabb fajok corpus pinealéjának fokozatos mirigyes átalakulása ellen szól, hogy neurohormonális aktivitást jelző neurohormonális axonterminálisok

a legegyszerűbb gerincesekhez tartozó cyclostomákban is megtalálhatók. E neurohormonális idegvégződéseket körszájúakban jól fejlett fotoreceptor kültaggal rendelkező pinealocyták képezik, ami a fényreceptió és neurohormonális tevékenység antagonizmusának is ellene szól.

A madarak helyzete speciális, mert az evolúcióban az emlősökkel párhuzamosan fejlődtek, nem tekinthetők a hullók és emlősök közti átmenetnek. Elektronmikroszkópos vizsgálatok mutatják, hogy madarakban több neurohormonális terminális található a corpus pineáleban mint emlősökben, tehát szekréción tevékenysége erősebb, mint az emlős corpus pinealéjé. Valószínűbb, hogy a corpus pineale „gyors” neurális és „lassúbb” hormonális kijelzése az adott gerinces osztályban, vagy fajban a biotóp specialitásához való adaptációs igény hatására, individuálisan alakult ki.

Foster és munkatársai (1993b) vizsgálata szerint retinális degenerációs tüneteket mutató mutáns egérben fennmarad a csapok és pálcikák circadián fotoreceptiója a kültagok hiányában is, a plazmamembrán opszin tartalma alapján. A kültagmembránok regresszióját kompenzálja, hogy a differenciáltabb fajok nagy és redőzött pineális szervében a pinealocyták száma nagyobb (“redőzött retina”). Hasonlóképpen a fotoreceptor pinopszin molekula hosszabb aktivációs ideje is növeli a fényérzékenységet.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Fejér, Zs.**, Szél, Á., Röhlich, P., Görcs, T., Manzano e Silva, M. J., Vígh, B. (1997) Immunoreactive pinopsin in pineal and retinal photoreceptors of various vertebrates. *Acta Biol. Hung.* 48: 463-471. IF: -
2. **Fejér, Zs.**, Röhlich, P., Szél, Á., Dávid, C., Zádori, A., Manzano, M. J., Vígh, B. (2001) Comparative ultrastructure

- and cytochemistry of the avian pineal organ. *Micr. Res. Techn.* 53: 12-24. IF: 2,165
3. **Fejér, Zs.**, C. Haldar, M. Ghosh, L. Cs. Frank, Zs. Szepessy, Á. Szél, M. J. Manzano e Silva and B. Víg. (2001) Pineal organ-like organization of the retina in megachiropteran bats. *Acta Biol. Hung.* 52:17-27. IF: 0,282
 4. Manzano e Silva, M. J., **Fejér, Zs.**, Debreceni, K., Víg, B. (1996) Neural and hormonal efferentation of pinealocytes. *Cell Biol. Internatl.* 20: 242. IF: -
 5. Víg, B., Röhlich, P., Görös, T., Manzano e Silva, M. J., Szél, Á., **Fejér, Zs.**, Víg-Teichmann, I. (1998a) The pineal organ as a folded retina: immunocytochemical localization of opsins. *Biol. Cell.* 90: 653-659. IF: 1,075
 6. Víg, B., Szél, Á., Debreceni, K., **Fejér. Zs.**, Manzano e Silva, M. J., Víg-Teichmann, I. (1998b) Comparative histology of pineal calcification. *Histol.Histopathol.* 13: 851-870. IF: 1,407
 7. Debreceni, K., **Fejér, Zs.**, Szél, Á., Röhlich, P., Görös, T., Víg, B. (1998) Photoreceptors sensitive for various wavelengths in the pineal complex and retina of reptiles immunocytochemical localization of opsins. *Neurobiol.* 6: 463-465. IF: -
 8. Víg, B., Dávid, Cs., **Fejér, Zs.**, Magyar A., Szabó L., Szél, Á. (2007) Cerebrospinal fluid contacting neurons, the role of their various receptors and axon terminals in the nonsynaptic signal transmission. *Acta Biol. Szeged* 51: Suppl.1. 54. IF: -

Könyvfejezet

Víg, B., **Fejér, Z.**, David, C., Szel, A. Neurosecretory axon terminals: special nerve endings of the central nervous system for release of bioactive molecules. In: Lassau J. A. (ed) *Neural Synapse Research Trends*, pp. 1-24. 2007.

Előadás absztraktok:

1. **Fejér Zs.**, Szabó L., Vígh B. A corpus pineale fejlődése. SFB Fejlődésbiológiai Symposium, Tihany, 1989.
2. Szepessy, Zs., **Fejér, Zs.**, Dávid, Cs., Szél, Á., Vígh, B. Fine structural localization of calcium ions in the pineal organ and retina. Magyar Idegtudományi Társaság VI. Konferenciája, Harkány-Pécs, 1999.
3. Manzano, MJ., **Fejér, Zs.**, Dávid, Cs., Vígh, B. The pineal organ has a neural efferentation working with excitatory amino acids. A comparative immunocytochemical study. 8th Meeting of the European Pineal Society, Tours (France), 1999..
4. Frank, C. L., **Fejér, Z.**, Szepessy, Z. and Vígh, B. Similar organization of the retina and pineal organ in megachiropteran fruit-eating bats. Arbeitstagung der Anat. Ges. Würzburg, 2000.
5. Frank Cs. L., **Fejér Zs.**, Papp M., Vígh B. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the bat, their supposed role in nonsynaptic communication. Magyar Idegtudományi Társaság VIII. Konferenciája, Szeged, 2001.
6. Cs. Frank L., **Fejér Zs.**, Vígh B. A dzsungáriai törpehörcsög (*Phodopus sungarus*) corpus pineáljának postembryonális fejlődése. IX. Sejt- és Fejlődésbiológia Napok, Debrecen, 2001.
7. Cs. Frank L., Dávid Cs., **Fejér Zs.**, Vígh B. A dzsungáriai törpehörcsög (*Phodopus sungarus*) corpus pineáljának finomszerkezete. PhD Tudományos Napok, Budapest, 2001.

Nem az értekezés témköréhez tartozó közlemények:

1. Vígh, B., **Fejér, Zs.**, Manzano e Silva, M. J. (1995) Immunocytochemistry of excitatory amino acids in the pineal organ and related structures of the brain stem. *Clin. Neurosci. Suppl.* 48: 26-27.

2. Víg h B., Debreceni K., **Fejér Zs.** and Víg h-Teichmann I. (1997) Immunoreactive excitatory amino acids in the parietal eye of lizards, a comparison with the pineal organ and retina. *Cell Tissue Res.* 287: 275-283.
3. Debreceni K., **Fejér Zs.**, Manzano e Silva M.J., Víg h B. (1997) Immunoreactive glutamate in the pineal and parapineal organs of the lamprey (*lampetra fluviatilis*). *Neurobiol.* 5: 53-56.